

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 Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Божено, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
А. Г. Платонова, д. м. н. (Киев, Украина)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2021: 0,5

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 8

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Scimago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank

ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2022-01

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

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

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



Подписано в печать 28.02.2022
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 Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

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

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

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2021: 0.5

Scopus

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

SJR
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

WEB OF SCIENCE™

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Five-year h-index is 8

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2022-01

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

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

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



Approved for print 28.02.2022
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<p>Применение дуплекс-специфичной нуклеазы из камчатского краба в методах молекулярной биологии Д. А. Шагин, Д. В. Ребриков</p> <p>Molecular biology applications of the red king crab duplex-specific nuclease Shagin DA, Rebrikov DV</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	12
<p>Динамика концентрации антител к SARS-CoV-2 в течение 12 месяцев после перенесенной инфекции COVID-19 Н. А. Маянский, Е. А. Бржозовская, С. С. Стоянова, А. В. Фролков, Ю. С. Лебедин</p> <p>Dynamic changes in the concentration of anti-SARS-CoV-2 antibodies within 12 months after recovery from COVID-19 Mayanskiy NA, Brzhozovskaya EA, Stoyanova SS, Frolov AV, Lebedin YuS</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	15
<p>Свойства антител к RBD у переболевших COVID-19 и вакцинированных препаратом «Спутник V» Л. В. Генералова, И. В. Григорьев, Д. В. Васина, А. П. Ткачук, И. С. Кружкова, Л. В. Колобухина, О. А. Бургасова, В. А. Гушчин</p> <p>Properties of RBD specific IgG from COVID-19 patients and Sputnik V vaccinated individuals Generalova LV, Grigoriev IV, Vasina DV, Tkachuk AP, Kruzhkova IS, Kolobukhina LV, Burgasova OA, Guschin VA</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	23
<p>Изменения микробиоты кишечника и их связь с тяжестью заболевания и некоторыми показателями цитокинового профиля у пациентов с COVID-19 Л. Н. Гуменюк, М. В. Голод, Н. В. Силаева, Л. Е. Сорокина, С. С. Ильясов, Н. А. Андрощук, О. Р. Кривошапко, А. М. Велияев, Л. Н. Асанова</p> <p>Gut microbiota alterations and their relationship to the disease severity and some cytokine profile indicators in patients with COVID-19 Gumenyuk LN, Golod MV, Silaeva NV, Sorokina LE, Ilyasov SS, Androschuk NA, Krivoschapko OR, Veilyaev AM, Asanova LN</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	31
<p>Меропенем-индуцированное снижение чувствительности к колистину у <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Т. А. Савинова, Ю. А. Бочарова, А. В. Чаплин, Д. О. Коростин, О. В. Шамина, Н. А. Маянский, И. В. Чеботарь</p> <p>Meropenem-induced reduction in colistin susceptibility in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ATCC 27853 Savinova TA, Bocharova YuA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayanskiy NA, Chebotar IV</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	36
<p>Микросателлитная нестабильность в нейроэндокринных новообразованиях толстой кишки М. Ю. Мещерякова, Е. Н. Колесников, В. С. Трифанов, Н. Н. Тимошкина, А. В. Снежко, Д. Ю. Гвалдин</p> <p>Microsatellite instability in colorectal neuroendocrine neoplasms Meshcheryakova MYu, Kolesnikov EN, Trifanov VS, Timoshkina NN, Snezhko AV, Gvaldin DYU</p>	
МЕТОД	43
<p>Сенсоры для анализа лекарственных препаратов, межлекарственных взаимодействий и каталитической активности ферментов Л. Е. Агафонова, Т. В. Булко, А. В. Кузиков, Р. А. Масамрех, В. В. Шумянцева</p> <p>Sensors for analysis of drugs, drug-drug interactions, and catalytic activity of enzymes Agafonova LE, Bulko TV, Kuzikov AV, Masamrekh RA, Shumyantseva VV</p>	

Визуальный анализ нигросомы-1 в дифференциальной диагностике болезни Паркинсона и эссенциального тремора

А. Н. Москаленко, А. С. Филатов, Е. Ю. Федотова, Р. Н. Коновалов, С. Н. Иллариошкин

Visual analysis of nigrosome-1 in the differential diagnosis of Parkinson's disease and essential tremor

Moskalenko AN, Filatov AS, Fedotova EYu, Kononov RN, Illarioshkin SN

Среднесрочные результаты внесуставной корригирующей остеотомии бедра при юношеском эпифизеолизе головки бедренной кости

К. А. Егиазарян, А. В. Григорьев, А. П. Ратьев, А. Б. Бут-Гусаим, И. В. Сиротин

Medium-term outcomes of extraarticular corrective osteotomy for slipped capital femoral epiphysis

Egiazaryan KA, Grigoriev AV, Ratiev AP, But-Gusaim AB, Sirotin IV

Приверженность к лечению лиц с нарушением зрения

М. М. Бикбов, Г. З. Исрафилова, Т. Р. Гильманшин, Р. М. Зайнуллин, Э. М. Якупова

Adherence to treatment in visually impaired individuals

Bikbov MM, Israfilova GZ, Gilmanshin TR, Zainullin RM, Yakupova EM

ПРИМЕНЕНИЕ ДУПЛЕКС-СПЕЦИФИЧНОЙ НУКЛЕАЗЫ ИЗ КАМЧАТСКОГО КРАБА В МЕТОДАХ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Д. А. Шагин¹, Д. В. Ребриков^{1,2} ✉

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Дуплекс-специфичная нуклеаза (ДСН) из гепатопанкреаса краба *Paralithodes camtschaticus* (камчатский краб) обладает уникальным сочетанием свойств. Наряду с термостабильностью и высокой оптимальной температурой катализа, фермент проявляет высокую субстратную избирательность, расщепляя исключительно ДНК в составе дуплексов (ДНК-ДНК или ДНК-РНК). Соответственно, ни одиночные цепи ДНК, ни одноцепочечные участки ДНК, ни цепи РНК с любой вторичной структурой субстратами ДСН не являются. Такие свойства позволяют создавать уникальные молекулярно-биологические протоколы на основе ДСН, которая также представляет собой важный объект фундаментальных исследований в области эволюции нуклеаз. В обзоре рассматриваются различные применения ДСН из камчатского краба в современных методах молекулярной биологии.

Ключевые слова: дуплекс-специфичная нуклеаза, ДСН, гепатопанкреас краба, *Paralithodes camtschaticus*, камчатский краб

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке грантом № 075-15-2019-1789, Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины.

Вклад авторов: Д. А. Шагин — подготовка рукописи; Д. В. Ребриков — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Владимирович Ребриков
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; ncagip4@gmail.com

Статья получена: 22.02.2022 **Статья принята к печати:** 27.02.2022 **Опубликована онлайн:** 28.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.010

MOLECULAR BIOLOGY APPLICATIONS OF THE RED KING CRAB DUPLEX-SPECIFIC NUCLEASE

Shagin DA¹, Rebrikov DV^{1,2} ✉

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Duplex-specific nuclease (DSN) from hepatopancreas of the crab *Paralithodes camtschaticus* (red king crab) has a unique combination of properties. Along with thermal stability and a high optimal temperature of catalysis, this enzyme exhibits high substrate selectivity, cleaving only DNA in duplexes (DNA-DNA or DNA-RNA). Accordingly, it digests neither single strands (nor single-stranded regions) of DNA, nor RNA strands with any secondary structure. Such properties make it possible to create unique protocols based on DSN, which is also an important object of fundamental research in the field of nuclease evolution. The review considers diverse applications of the red king crab DSN in modern methods of molecular biology.

Keywords: duplex-specific nuclease, DSN, crab hepatopancreas, *Paralithodes camtschaticus*, red king crab

Funding: the study was supported by the grant no. 075-15-2019-1789, Center for High Precision Genomic Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.

Author contribution: DA Shagin — preparation of the manuscript; DV Rebrikov — editing of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis V. Rebrikov
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; ncagip4@gmail.com

Received: 22.02.2022 **Accepted:** 27.02.2022 **Published online:** 28.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.010

Дуплекс-специфичная нуклеаза (ДСН) из гепатопанкреаса камчатского краба была впервые охарактеризована в 2002 г. [1]. Фермент с молекулярной массой 41,5 кДа состоит из 407 аминокислотных остатков (Genbank AAN86143) и обладает уникальным набором функциональных свойств [2, 3]:

ДСН проявляет максимальную активность при 60–65 °C pH 6,6;

ДСН сохраняет активность после прогрева при 90 °C или инкубации при pH 4–12;

ДСН является Mn^{2+} , Co^{2+} и Mg^{2+} -зависимой;

ДСН устойчива к действию протеаз (в том числе протеиназы К и папаина);

ДСН расщепляет только двухцепочечную ДНК, оставляя одиночные цепи интактными;

ДСН не проявляет заметной активности в отношении цепей РНК с любой вторичной структурой, при этом эффективно гидролизует цепь ДНК в ДНК-РНК гибридах.

Уникальное сочетание свойств позволяет создавать молекулярно-биологические протоколы на основе ДСН,

которая также представляет собой важный объект фундаментальных исследований в области эволюции нуклеаз [4]. В обзоре рассматриваются различные применения ДСН в современных методах молекулярной биологии.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП, англ. single nucleotide polymorphisms, SNP) применяется в диагностике генетических предрасположенностей, фармакогенетике, криминалистике, молекулярной генеалогии, популяционной генетике и других областях исследований [5–9]. На основании уникального свойства ДСН расщеплять совершенные (т. е. полностью гибридные) короткие двухцепочечные фрагменты ДНК с гораздо большей эффективностью, чем несовершенные, был разработан метод анализа ОНП, известный как DSNP-анализ (от англ. duplex-specific nuclease preference, предпочтительное расщепление дуплексов нуклеазами) [10].

Для выявления ОНП при помощи DSNP-анализа необходимы два сигнальных зонда, представляющих собой 10-членные олигонуклеотиды с флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце — так называемые FRET-меченные пробы (от англ. FRET, fluorescence resonance energy transfer, резонансный перенос энергии флуоресценции). Один из зондов соответствует последовательности ДНК дикого типа, второй зонд соответствует мутантной последовательности. В случае совершенного дуплекса между сигнальным зондом и исследуемым фрагментом ДНК происходит гидролиз сигнального зонда, приводящий к разобщению флуорофора и гасителя; в результате детектируется флуоресценция с определенной длиной волны. В отсутствие гидролиза сигнального зонда флуоресценция не детектируется.

При проведении DSNP-анализа фрагмент ДНК, содержащий исследуемый полиморфный участок, прицельно нарабатывают до высокой концентрации, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со специфичными праймерами. Продукт реакции смешивают с сигнальными зондами и инкубируют в присутствии ДСН при 60 °С в течение 5–10 мин. Во время инкубации происходит амплификация ДНК-субстрата за счет совместной активности ДСН и термостабильной ДНК-полимеразы, привносимой в реакционную смесь в составе неочищенного продукта ПЦР, используемого в качестве матрицы. ДСН расщепляет двухцепочечную ДНК, что приводит к появлению фрагментов, способных служить затравками для ДНК-полимеразы. Одновременно за счет гидролиза ампликонов происходит образование коротких фрагментов ДНК, способных к эффективной гибридизации с сигнальными зондами. На заключительном этапе анализа реакционную смесь инкубируют при 30–35 °С, что обеспечивает гибридизацию зондов с ДНК-мишенью и эмиссию флуоресценции за счет активности ДСН.

Диапазон длин ПЦР продукта для DSNP-анализа проверяли эмпирически. Фрагменты ДНК различной длины, содержащие С- или Т-вариант полиморфной последовательности митохондриальной ДНК человека *COX1* C7028T, гибридизовали с Т-специфичным зондом. Для всех тестируемых продуктов были получены четкие и однозначные результаты, доказывающие возможность применения ДСНП для ампликонов разного размера.

Существует несколько различных подходов к генотипированию SNP, основанных на особенностях физико-химических свойств ДНК в зависимости от варианта [11, 12]. По сравнению с другими опубликованными протоколами DSNP имеет несколько преимуществ, во-первых, возможность использования свежего неочищенного продукта ПЦР; более того, анализ не требует разделения, очистки или центрифугирования реакционных смесей и занимает час от завершения ПЦР. Во-вторых, протокол позволяет анализировать оба аллеля одновременно в одной пробирке. В-третьих, детекцию флуоресцентного сигнала проводят с помощью стандартного лабораторного оборудования. Наконец, протокол DSNP подходит для практически любой длины продукта ПЦР, содержащего полиморфное положение.

Исследование двух или нескольких аллельных вариантов в одной пробирке предполагает использование зондов с флуорофорами, излучающими на разных длинах волн. Тип флуорофора не влияет на эффективность гидролиза, во всяком случае, если неспаренные нуклеотиды не находятся слишком близко к краям зонда.

Эффективность гидролиза несовершенных дуплексов, содержащих неспаренный нуклеотид в средней части, не зависит от типа флуорофора. Важно отметить, что при использовании зондов для разных аллелей, меченных одинаковыми флуорофорами, анализ необходимо проводить в отдельных пробирках.

DSNP анализ был успешно применен для генотипирования вариантов, вовлеченных в ряд заболеваний или предрасположенностей, в том числе *TP53* C309T; *F2* G20210A, *MTHFR* C677T; *KRAS* G34A, G35T, G35A, и G38A; *NRAS* G34A, G35C, и G35A; *HRAS* G35T; *APOE* C388T; *F5* G1698A; *BRCA1* 5382insC. Аллельный статус исследуемых образцов подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Результаты модельных экспериментов показали, что DSNP-метод позволяет надежно различать мутантные аллели и аллели дикого типа, как в гомозиготных, так и в гетерозиготных образцах. Кроме того, на примере *BRCA1* 5382insC было продемонстрировано, что метод позволяет определять не только точечные замены, но также однонуклеотидные делеции и инсерции. Следует подчеркнуть, что для исследования разных положений использовали одни и те же стандартные условия реакции, что позволяет говорить об универсальности метода DSNP в отношении широкого спектра генетических вариантов.

Хорошо известно, что некоторые участки генома подвержены кластерному мутагенезу [13]. Большинство существующих методов анализа ОНП не позволяют проводить точное определение таких близкорасположенных мутаций. На модели гена *KRAS*, для которого описано несколько мутаций в положениях 34 и 35 (G34A, G35A и G35T [14]) было продемонстрировано, что DSNP можно успешно применять в анализе близкорасположенных точечных мутаций даже мультиплексно. При одновременном использовании до четырех сигнальных зондов включительно флуоресцентный сигнал детектируется, только если зонд полностью комплементарен последовательности-мишени.

Иногда бывает важно не просто обнаружить тот или иной генетический вариант, но и определить соотношение аллелей в образце. Такие задачи возникают при работе с образцами опухолевой ткани или исследовании объединенных (пулированных) образцах геномной ДНК от нескольких доноров [12, 15]. Эксперименты с *KRAS* G35A в качестве модели доказали возможность применения DSNP для полуколичественного определения мутантного аллеля в сложных образцах.

Таким образом, природные свойства фермента ДСН легли в основу нового метода генотипирования, достаточно простого и легко автоматизируемого. К наиболее существенным преимуществам данного метода относят:

- 1) возможность использования неочищенных ПЦР продуктов с произвольным размером ампликонов;
- 2) отсутствие этапов очистки и разделения;
- 3) высокая скорость анализа (менее часа с момента получения продуктов ПЦР);
- 4) возможность оценки соотношения аллелей в образце;
- 5) универсальность: метод подходит для определения однонуклеотидных замен и инделей, в том числе близко расположенных, независимо от контекста.

Протокол не требует специального оборудования, за исключением повсеместно используемого при оснащении молекулярно-биологических лабораторий. Считывание флуоресценции (например, для флуоресцеина) можно

проводить в системах гель-документирования с УФ-лампами.

Недостатками DSNP по сравнению с ПЦР в режиме реального времени являются:

- 1) наличие подготовительного этапа (препаративная ПЦР амплификация целевого фрагмента);
- 2) детекция по конечной точке;
- 3) риск контаминации, обусловленный необходимостью открывать пробирки с ампликонами.

Нормализация кДНК

Гетерогенные уровни экспрессии генов в клетке усложняют полномасштабный анализ транскриптомов и идентификацию новых генов. Нормализация библиотек кДНК перед анализом позволяет повысить чувствительность к редким транскриптам.

Классический принцип нормализации кДНК основан на кинетике гибридизации. Поскольку скорость гибридизации пропорциональна квадрату концентрации молекул в образце, высококопийные фрагменты ренатурируют быстрее, чем малокопийные фрагменты [16]. Отделение реассоциированных двухцепочечных фрагментов после денатурации сложного образца кДНК позволяет получить библиотеку с выровненными концентрациями обильных и редких транскриптов [17–19].

Существующие протоколы нормализации отличаются способом разделения нормализованных одноцепочечных (оц) и двухцепочечных (дц) фракций. Возможности включают в себя физическое разделение фракций с использованием хроматографии на гидроксипатите [17, 20] или парамагнитных шариков [19, 21], расщепление дц ДНК эндонуклеазами рестрикции [18] и амплификацию оц ДНК с использованием эффекта супрессии ПЦР [22]. К сожалению, большинство предложенных способов не годится для нормализации образцов кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями.

Уникальные свойства ДСН позволили разработать высокоэффективный и простой в исполнении метод, известный как ДСН-нормализация, ставший рутинным во многих лабораториях России и мира, универсально применимый для нормализации как фрагментированных, так и полноразмерных кДНК. Как и большинство его предшественников и аналогов, метод основан на кинетике реассоциации, но отличается способом отделения нормализованной фракции одноцепочечной ДНК [23].

По окончании гибридизации реакцию смесь обрабатывают ДСН для удаления нецелевой фракции дц ДНК. Поскольку ДСН представляет собой термостабильный фермент, активный при температуре 70 °С, гидролиз происходит при той же температуре, что и гибридизация. Такая оптимизация протокола позволяет избежать неспецифической гибридизации и за счет этого уменьшить потери транскриптов, склонных к образованию вторичных структур. Оставшуюся нормализованную фракцию оц кДНК амплифицируют с помощью ПЦР.

Метод хорошо подходит и для неамплифицированной первой цепи кДНК. Элиминация мажорных последовательностей осуществляется в ходе ренатурации первой цепи кДНК с поли(А)+ РНК, служившей матрицей для ее синтеза. Данный протокол применим лишь в случаях, когда доступно большое количество биоматериала и возможно выделение поли(А)+ РНК фракции из суммарной РНК. Следует отметить, что в нормализованных библиотеках содержание клонов, соответствующих некоторым высоко

представленным транскриптам, иногда оказывается ниже, чем количество клонов, соответствующих редким транскриптам. Подобная «сверхнормализация» объясняется сохраняющимся доминированием мажорных последовательностей РНК, которые служат своеобразной наводкой для вытравливания комплементарных молекул ДНК. Высвобождаясь после ДСН-опосредованного гидролиза комплементарной цепи ДНК, мажорные РНК могут образовывать новые гибриды с одноцепочечными молекулами кДНК, тем самым способствуя их гидролизу, и так далее.

Для последующего использования нормализованный продукт должен быть амплифицирован. Поэтому подготовка первой цепи кДНК к ДСН-нормализации всегда включает в себя лигирование адаптерных последовательностей, которые обеспечат сайты отжига олигонуклеотидных затравок (праймеров) при последующей ПЦР амплификации. Как известно, в ходе ПЦР короткие фрагменты амплифицируются более эффективно, чем длинные. Соответственно, амплификация нормализованного пула кДНК сопровождается значительными потерями длинных транскриптов. Для сохранения фракции длинных молекул кДНК при наработке библиотек, в дизайн адаптеров заложены короткие инвертированные повторы. При наработке библиотек с праймером, идентичным фрагменту инвертированного повтора, происходит преимущественная амплификация длинных молекул кДНК на фоне подавления амплификации коротких молекул [24]. Согласно полученным данным нормализация амплифицированной кДНК в целом менее эффективна, чем нормализация первой цепи кДНК, но также обеспечивает значительное снижение концентрации высоко представленных транскриптов, которое позволяет существенно повысить эффективность поиска редких генов в обстоятельствах, когда доступна только суммарная РНК.

На сегодняшний день ДСН-нормализация является наиболее простым и эффективным методом нормализации кДНК. В отличие от ряда других методов, ДСН-нормализация не включает в себя трудоемких и малоэффективных стадий физического разделения ДНК-фракций, может быть применена для нормализации как амплифицированной кДНК, так и первой цепи кДНК, обогащенных полноразмерными молекулами. В ходе нормализации не происходит изменения средней длины кДНК в образцах, и распределение клонов по длине содержащихся в них вставок в нормализованных кДНК библиотеках сходно с распределением в ненормализованных библиотеках.

Специфичное обогащение и нормализация библиотек геномной ДНК

Разработана методика обогащения минорными аллелями (в частности, мутациями, имеющими клиническое или биологическое значение) за счет селективной элиминации аллелей дикого типа в смешанных (пулированных) клинических образцах (Nuclease-Assisted Minor-Allele enrichment using Overlapping Probes, NaME-PrO) [25]. Одновременное удаление избытка ДНК дикого типа для практически неограниченного количества геномных последовательностей-мишеней выполняется до проведения амплификации. Свойства ДСН гарантируют приоритетное расщепление ДНК дикого типа независимо от геномного контекста.

Для каждой последовательности-мишени, проверяемой на наличие мутации, подбирают пару олигонуклеотидных

Таблица. Представленность различных семейств повторяющихся элементов в геномной ДНК человека до и после ДСН-нормализации

Семейства повторяющихся элементов	Контрольный образец ДНК (без нормализации)			Образец ДНК после ДСН-нормализации		
	п.н.	%	Средняя дивергенция последовательностей, %	п.н.	%	Средняя дивергенция последовательностей, %
Общее число нуклеотидов	6 643 277	100	–	6 269 460	100	–
LINE L1P	371 253	5,6	9	69 670	1,1	15
ERV-K	20 597	0,3	8	6 575	0,1	12
SSR	68 367	1	10	18 499	0,3	11
Alu	631 112	9,5	12	6 572	0,1	16
Последовательности-сателлиты	293 827	4,4	15	7 915	0,1	20
ERV1	165 461	2,5	15	105 155	1,7	17
ERV-L	323 437	4,9	19	245 039	3,9	22
LINE L1M/HAL	496 398	7,5	19	605 965	9,7	21
ДНК транспозоны	161 304	2,4	19	170 331	2,7	21
MIR	118 927	1,8	27	142 060	2,3	27
LINE L2	104 535	1,6	28	147 241	2,3	28
LINE CR1/L3	10 226	0,1	29	13 318	0,2	29
LINE L4-L5	3 508	0,05	33	3 701	0,05	30

зондов, комплементарных области-мишени на противоположных (комплементарных) цепях ДНК, с перекрытием в 10–15 нуклеотидов. Избыток зондов добавляют к фрагментированной геномной ДНК, прогретой при 98 °С. При снижении температуры до 67 °С ДНК остается одноцепочечной из-за низкой концентрации и медленной кинетики реассоциации. Зонды отжигаются; если сайт отжига содержит мутацию, из-за точечных несовпадений между последовательностью-мишенью и зондом образуются несовершенные дуплексы. При добавлении ДСН, которая предпочитает совершенные дуплексы, ДНК дикого типа расщепляется, тогда как ДНК с мутацией сохраняет свою целостность. Поскольку два зонда отжигаются на комплементарные участки, расщепляются обе цепи ДНК дикого типа. Если хотя бы одна цепь ДНК содержит мутацию, она сохраняется после обработки ДСН и становится субстратом экспоненциальной амплификации с мультиплексным обогащением по всем мутантным аллелям одновременно. Данный подход представляет собой эффективную альтернативу высокопроизводительному геномному секвенированию для обнаружения редких мутаций. Как продемонстрировали авторы, NaME-PrO обеспечивает 50–200-кратное обогащение образца по клинически значимым целевым мутациям (на примере мутаций KRAS).

В связи со стремительным развитием технологий, секвенирование нового поколения (англ. next generation sequencing, NGS), в частности, полногеномное секвенирование (англ. whole-genome sequencing), становится все более распространенным подходом в фундаментальной науке и клинической лабораторной диагностике. В геномах эукариот значительная часть ДНК состоит из высоко гомологичных повторяющихся элементов, наличие которых не только удорожает процедуру секвенирования, но и крайне затрудняет биоинформатическую обработку и интерпретацию данных.

Для решения этой проблемы предложено несколько подходов. В частности, при секвенировании геномов высших растений можно использовать выраженную склонность повторяющихся последовательностей к гиперметилированию. Yuan и соавт. (2002) использовали селективный гидролиз гиперметилированных участков

с помощью эндонуклеаз рестрикции, чувствительных к 5'-метилированию цитозина [26, 27]. Аналогичным образом Палмер и соавт. (2003) использовали метилационно-зависимую эндонуклеазу MsrBC из штамма *E. coli* K-12 при конструировании геномных библиотек кукурузы, тем самым ограничивая клонирование ДНК с высоким уровнем метилирования [28]. Такие технические решения, однако, не применимы к организмам с другими паттернами метилирования, не избирательными в отношении повторяющихся элементов.

Альтернативное решение проблемы, так называемая C0t-фильтрация, основано на кинетике ренатурации ДНК. Геномную ДНК фрагментируют, денатурируют нагреванием и охлаждают. Поскольку низкокопийные последовательности ДНК ренатурируют медленнее, чем высокоповторяющиеся, за определенное время происходит обогащение одноцепочечной фракции низкокопийными последовательностями [29, 30]. Далее двухцепочечную фракцию, содержащую повторяющиеся элементы, отделяют от одноцепочечной фракции (в классическом варианте, посредством хроматографии на гидроксипатите). Хотя C0t-фильтрация применима к любой сложной смеси неоднородно представленных последовательностей ДНК, ее использование требует точного знания кинетики реассоциации для конкретного генома.

Была исследована возможность применения ДСН-нормализации для удаления высокогетерогенных повторяющихся элементов из геномных библиотек для секвенирования. ДНК подвергают фрагментации, лигируют с адаптерными последовательностями и денатурируют прогревом. В процессе ренатурации образец обрабатывают ДСН. Уцелевшую после обработки одноцепочечную фракцию геномной ДНК, обогащенную низкокопийными последовательностями, амплифицируют с праймерами, соответствующими адаптерным последовательностям [31].

Метод был апробирован в модельном эксперименте по нормализации геномной ДНК человека перед секвенированием в системе 454 GS FLX (Roche). Чтобы повысить эффективность вычитывания нецелевых последовательностей, гибридизацию проводили в присутствии избытка Cot-1 фракции геномной ДНК

человека. Для нормализованного и контрольного образцов было получено 29 240 и 31 789 прочтений с общим покрытием 6 269 460 и 6 643 277 нуклеотидов, соответственно. Уровни представленности различных повторяющихся элементов в данных секвенирования определяли с помощью программного обеспечения Repeat-Masker (repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker). Согласно полученным результатам, содержание повторяющихся элементов при нормализации снижалось с 40% до 25%.

В таблице приведены данные о представленности последовательностей различных семейств повторяющихся элементов в нормализованном и контрольном образцах геномной ДНК человека. Отмечается значительное снижение уровней Alu, LINE L1P, ERV-K и ERV1 повторов, а также сателлитных последовательностей. В то же время некоторые семейства повторяющихся элементов проявляют устойчивость к нормализации данным методом.

Контрольные образцы (без нормализации) содержали около 10% последовательностей, совпадающих на 100–91%, и около 20% последовательностей, совпадающих на 90–71%, тогда как оставшиеся 70% последовательностей совпадали менее чем по 71% нуклеотидных положений. ДСН-нормализация воспроизводимо приводила к уменьшению содержания низкодивергентных повторяющихся элементов (идентичных на 100–91%) в 15 раз и среднедивергентных повторяющихся элементов (идентичных на 90–81%) в 2 раза. Концентрация прочих последовательностей в образцах с ДСН-нормализацией не уменьшалась. Сохранность однокопийных геномных последовательностей в процессе ДСН-нормализации была продемонстрирована методом ПЦР в реальном времени на панели из 11 уникальных генов.

На основании полученных данных был сделан вывод, что ДСН-нормализация может эффективно снижать содержание эволюционно молодых низкодивергентных повторяющихся элементов в образцах геномной ДНК. Порог отсечки можно снизить, используя более мягкие условия реассоциации (например, снизив температуру и/или повысив концентрацию катионов), хотя и с риском частичной потери уникальных последовательностей из-за усиления неспецифических взаимодействий.

Изучение микроРНК

Молекулы микроРНК все чаще рассматриваются в качестве перспективных биомаркеров для диагностики и мониторинга различных патологий, включая онкологические и аутоиммунные заболевания. Они обнаруживаются в плазме крови как в свободно

циркулирующем виде, так и в составе экзосомной фракции. МикроРНК легко выделить, они устойчивы к деградации и обладают воспроизводимыми характеристическими паттернами экспрессии.

Уникальные свойства ДСН, в частности индифферентность к РНК субстратам, могут быть использованы в разработке специфичных хемилюминесцентных и флуоресцентных сенсоров для микроРНК [32, 33]. Метод, разработанный Shen с соавт. (2015), основан на использовании биотинилированных молекул ДНК (зондов), меченных флуоресцеином и иммобилизованных на магнитных шариках. Кроме микроРНК-мишени и шариков с ДНК, в систему добавлена ДСН, которая узнает и расщепляет дуплексы, образующиеся при связывании микроРНК с зондом. В результате расщепления от магнитного носителя отделяется в раствор наружный фрагмент зонда с флуоресцентной меткой, а молекула микроРНК связывается со следующим иммобилизованным зондом, и весь цикл повторяется. Флуоресцентно-меченные продукты расщепления зондов накапливаются в растворе. После окончания инкубации частицы с иммобилизованными непрореагировавшими зондами отделяют от раствора с помощью магнита. В растворе остаются микроРНК и продукты расщепления зондов для измерения флуоресценции по конечной точке. Чувствительность системы позволяет детектировать фемтомольные концентрации микроРНК. Примечательно, что, в отличие от протоколов с использованием количественной ПЦР, амплификация сигнала осуществляется изотермически при 40 °С, что делает предложенный метод еще более привлекательным [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дуплекс-специфичная нуклеаза из гепатопанкреаса камчатского краба обладает уникальным сочетанием свойств, включая исключительную субстратную специфичность (избирательно расщепляет двухцепочечную ДНК, не затрагивая одноцепочечную ДНК или РНК), высокую оптимальную температуру катализа (60–65 °С) и термостабильность (сохраняет активность при 90 °С). Начиная с 2002 г., нуклеаза краба используется в различных молекулярно-биологических методиках, которые продолжают развиваться и постоянно обновляются. Фермент успешно применяется для решения широкого спектра задач, включая генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (в том числе в клинических образцах), нормализацию кДНК и геномной ДНК, селективное удаление нецелевых последовательностей и исследование профилей микроРНК.

Литература

- Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.* 2002; 12 (12): 1935–42. DOI: 10.1101/gr.547002.
- Anisimova VE, Rebrikov DV, Shagin DA, Kozhemyako VB, Menzorova NI, Staroverov DB, Ziganshin R, Vagner LL, Rasskazov VA, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Isolation, characterization and molecular cloning of duplex-specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab. *BMC Biochem.* 2008; 9: 14. DOI: 10.1186/1471-2091-9-14.
- Anisimova VE, Rebrikov DV, Zhulidov PA, Staroverov DB, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Renaturation, activation, and practical use of recombinant duplex-specific nuclease from Kamchatka crab. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 513–9. DOI: 10.1134/s0006297906050075.
- Anisimova VE, Shcheglov AS, Bogdanova EA, Rebrikov DV, Nekrasov AN, Barsova EV, Shagin DA, Lukyanov SA. Is crab duplex-specific nuclease a member of the Serratia family of non-specific nucleases? *Gene.* 2008; 418: 41–8. DOI: 10.1016/j.gene.2008.04.005.
- Vodolazhsky DI, Mayakovskaya AV, Kubyshev AV, Aliev KA, Fomochkina II. Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of

- literature). *Klin Lab Diagn.* 2021; 66 (12): 760–67. English. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767.
6. Yan M, Fan X, Si H, Wang X, Wang Z, Wang Z, Lv X, Yin H, Jia Y, Jiang L, Xia Y, Liu Y. Association between gene polymorphism and adverse effects in cancer patients receiving docetaxel treatment: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2022; 89 (2): 173–181. DOI: 10.1007/s00280-021-04374-3.
 7. Hadrill PR. Developments in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci.* 2021; 5 (3): 381–393. DOI: 10.1042/ETLS20200304.
 8. Kling D, Phillips C, Kennett D, Tillmar A. Investigative genetic genealogy: Current methods, knowledge and practice. *Forensic Sci Int Genet.* 2021; 52: 102474. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102474.
 9. Боринская С. А., Гуреев А. С., Орлова А. А., Санина Е. Д., Ким А. А., Гасемианродсари Ф., Ширманов В. И., Балановский О. П., Ребриков Д. В., Кошечкин А. В., Янковский Н. К. Распределение частот аллелей по полиморфизму -174G/C регуляторного участка гена интерлейкина 6 (IL6) в населении России и мира. *Генетика.* 2013; 49 (1): 113–24. DOI: 10.7868/s0016675813010037.
 10. Альтшулер И. М., Жулидов П. А., Богданова Е. А., Мудрик Н. Н., Шагин Д. А. Использование метода DSNP для изучения точечных мутаций генов человека. *Биоорганическая химия.* 2005; 31 (6): 627–36.
 11. Syvänen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet.* 2001; 2 (12): 930–42. DOI: 10.1038/35103535.
 12. Syvänen AC, Taylor GR. Approaches for analyzing human mutations and nucleotide sequence variation: a report from the Seventh International Mutation Detection meeting, 2003. *Hum Mutat.* 2004; 23 (5): 401–5. DOI: 10.1002/humu.20031.
 13. Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res.* 2004; 14 (6): 1176–87. DOI: 10.1101/gr.2188104.
 14. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol.* 2004; 10 (4): 471–5. DOI: 10.3748/wjg.v10.i4.471.
 15. Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T, Masuda T. Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes. *Int J Oncol.* 2004; 24 (3): 687–96.
 16. Young BD, Anderson MLM. Quantitative analysis of solution hybridisation. In: Hames BD, Higgins SJ, eds. *Nucleic acid hybridisation: a practical approach.* Pp. 47–71. Oxford: IRL Press Limited, 1985.
 17. Ko MS. An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18 (19): 5705–11. DOI: 10.1093/nar/18.19.5705.
 18. Coche T, Dewez M. Reducing bias in cDNA sequence representation by molecular selection. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 25; 22 (21): 4545–6. DOI: 10.1093/nar/22.21.4545.
 19. Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res.* 2000; 10 (10): 1617–30. DOI: 10.1101/gr.145100.
 20. Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91 (20): 9228–32. DOI: 10.1073/pnas.91.20.9228.
 21. Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi M. Construction of a normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22 (6): 987–92. DOI: 10.1093/nar/22.6.987.
 22. Лукьянов К. А., Гурская Н. Г., Матц М. В., Хаспеков Г. Л., Дьяченко Л. Б., Ченчик А. А., Ильевич-Стучков С. Г., Лукьянов С. А. Метод получения нормализованных библиотек кДНК, основанный на эффекте супрессии полимеразной цепной реакции. *Биоорганическая химия.* 1996; 22 (9): 686–90.
 23. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (3): e37. DOI: 10.1093/nar/gnh031.
 24. Shagin DA, Lukyanov KA, Vagner LL, Matz MV. Regulation of average length of complex PCR product. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27 (18): e23. DOI: 10.1093/nar/27.18.e23.
 25. Song C, Liu Y, Fontana R, Makrigiorgos A, Mamon H, Kulke MH, Makrigiorgos GM. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (19): e146. DOI: 10.1093/nar/gkw650.
 26. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. Methylation-spanning linker libraries link gene-rich regions and identify epigenetic boundaries in Zea mays. *Genome Res.* 2002; 12 (9): 1345–9. DOI: 10.1101/gr.185902.
 27. Emberton J, Ma J, Yuan Y, SanMiguel P, Bennetzen JL. Gene enrichment in maize with hypomethylated partial restriction (HMPPR) libraries. *Genome Res.* 2005; 15 (10): 1441–6. DOI: 10.1101/gr.3362105.
 28. Palmer LE, Rabinowicz PD, O'Shaughnessy AL, Balija VS, Nascimento LU, Dike S, de la Bastide M, Martienssen RA, McCombie WR. Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science.* 2003; 302 (5653): 2115–7. DOI: 10.1126/science.1091265.
 29. Peterson DG, Schulze SR, Sciara EB, Lee SA, Bowers JE, Nagel A, Jiang N, Tibbitts DC, Wessler SR, Paterson AH. Integration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res.* 2002; 12 (5): 795–807. DOI: 10.1101/gr.226102.
 30. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. High-Cot sequence analysis of the maize genome. *Plant J.* 2003; 34 (2): 249–55. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2003.01716.x.
 31. Shagina I, Bogdanova E, Mamedov IZ, Lebedev Y, Lukyanov S, Shagin D. Normalization of genomic DNA using duplex-specific nuclease. *Biotechniques.* 2010; 48 (6): 455–9. DOI: 10.2144/000113422.
 32. Deng H, Ren Y, Shen W, Gao Z. An ultrasensitive homogeneous chemiluminescent assay for microRNAs. *Chem Commun (Camb).* 2013; 49 (82): 9401–3. DOI: 10.1039/c3cc44824j.
 33. Shen W, Yeo KH, Gao Z. A simple and highly sensitive fluorescence assay for microRNAs. *Analyst.* 2015; 140 (6): 1932–8. DOI: 10.1039/c4an02146k.

References

1. Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.* 2002; 12 (12): 1935–42. DOI: 10.1101/gr.547002.
2. Anisimova VE, Rebrikov DV, Shagin DA, Kozhemyako VB, Menzorova NI, Staroverov DB, Ziganshin R, Vagner LL, Rasskazov VA, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Isolation, characterization and molecular cloning of duplex-specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab. *BMC Biochem.* 2008; 9: 14. DOI: 10.1186/1471-2091-9-14.
3. Anisimova VE, Rebrikov DV, Zhulidov PA, Staroverov DB, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Renaturation, activation, and practical use of recombinant duplex-specific nuclease from Kamchatka crab. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 513–9. DOI: 10.1134/s0006297906050075.
4. Anisimova VE, Shcheglov AS, Bogdanova EA, Rebrikov DV, Nekrasov AN, Barsova EV, Shagin DA, Lukyanov SA. Is crab

- duplex-specific nuclease a member of the Serratia family of non-specific nucleases? *Gene*. 2008; 418: 41–8. DOI: 10.1016/j.gene.2008.04.005.
5. Vodolazhsky DI, Mayakovskaya AV, Kubyshev AV, Aliev KA, Fomochkina II. Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of literature). *Klin Lab Diagn*. 2021; 66 (12): 760–67. English. DOI: 10.5162/0869-2084-2021-66-12-760-767.
 6. Yan M, Fan X, Si H, Wang X, Wang Z, Wang Z, Lv X, Yin H, Jia Y, Jiang L, Xia Y, Liu Y. Association between gene polymorphism and adverse effects in cancer patients receiving docetaxel treatment: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2022; 89 (2): 173–181. DOI: 10.1007/s00280-021-04374-3.
 7. Haddrill PR. Developments in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci*. 2021; 5 (3): 381–393. DOI: 10.1042/ETLS20200304.
 8. Kling D, Phillips C, Kennett D, Tillmar A. Investigative genetic genealogy: Current methods, knowledge and practice. *Forensic Sci Int Genet*. 2021; 52: 102474. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102474.
 9. Borinskaya SA, Gureev AS, Orlova AA, Sanina ED, Kim AA, Gasemianrodsari F, Shirmanov VI, Balanovsky OP, Rebrikov DV, Koshechkin AV, Yankovsky NK. [Allele frequency distributions of -174G/C polymorphism in regulatory region of interleukin 6 gene (IL6) in Russian and worldwide populations]. *Genetika*. 2013; 49 (1): 113–24. Russian. DOI: 10.7868/s0016675813010037.
 10. Al'tshuler IM, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Mudrik NN, Shagin DA. [Application of the duplex-specific nuclease preference method to the analysis of point mutations in human genes]. *Bioorg Khim*. 2005; 31 (6): 627–36. Russian.
 11. Syvänen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet*. 2001; 2 (12): 930–42. DOI: 10.1038/35103535.
 12. Syvänen AC, Taylor GR. Approaches for analyzing human mutations and nucleotide sequence variation: a report from the Seventh International Mutation Detection meeting, 2003. *Hum Mutat*. 2004; 23 (5): 401–5. DOI: 10.1002/humu.20031.
 13. Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrashhev AM, Coghill P, Dunham I, Forbes I, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res*. 2004; 14 (6): 1176–87. DOI: 10.1101/gr.2188104.
 14. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol*. 2004; 10 (4): 471–5. DOI: 10.3748/wjg.v10.i4.471.
 15. Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T, Masuda T. Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes. *Int J Oncol*. 2004; 24 (3): 687–96.
 16. Young BD, Anderson MLM. Quantitative analysis of solution hybridisation. In: Hames BD, Higgins SJ, eds. *Nucleic acid hybridisation: a practical approach*. Pp. 47–71. Oxford: IRL Press Limited, 1985.
 17. Ko MS. An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18 (19): 5705–11. DOI: 10.1093/nar/18.19.5705.
 18. Coche T, Dewez M. Reducing bias in cDNA sequence representation by molecular selection. *Nucleic Acids Res*. 1994 Oct 25; 22 (21): 4545–6. DOI: 10.1093/nar/22.21.4545.
 19. Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res*. 2000; 10 (10): 1617–30. DOI: 10.1101/gr.145100.
 20. Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (20): 9228–32. DOI: 10.1073/pnas.91.20.9228.
 21. Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi M. Construction of a normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22 (6): 987–92. DOI: 10.1093/nar/22.6.987.
 22. Luk'ianov KA, Gurskaia NG, Matts MV, Khaspekov GL, D'iachenko LB, Chenchik AA, Il'evich-Stuchkov SG, Luk'ianov SA. Metod polucheniiia normalizovannykh bibliotek kDNK, osnovannyi na éffekte supressii polimeraznoi tseproi reaktsii [A method for obtaining the normalized cDNA libraries based on the effect of suppression of polymerase chain reaction]. *Bioorg Khim*. 1996; 22 (9): 686–90. Russian.
 23. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32 (3): e37. DOI: 10.1093/nar/gnh031.
 24. Shagin DA, Lukyanov KA, Vagner LL, Matz MV. Regulation of average length of complex PCR product. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27 (18): e23. DOI: 10.1093/nar/27.18.e23.
 25. Song C, Liu Y, Fontana R, Makrigiorgos A, Mamon H, Kulke MH, Makrigiorgos GM. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44 (19): e146. DOI: 10.1093/nar/gkw650.
 26. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. Methylation-spanning linker libraries link gene-rich regions and identify epigenetic boundaries in *Zea mays*. *Genome Res*. 2002; 12 (9): 1345–9. DOI: 10.1101/gr.185902.
 27. Emberton J, Ma J, Yuan Y, SanMiguel P, Bennetzen JL. Gene enrichment in maize with hypomethylated partial restriction (HMPR) libraries. *Genome Res*. 2005; 15 (10): 1441–6. DOI: 10.1101/gr.3362105.
 28. Palmer LE, Rabinowicz PD, O'Shaughnessy AL, Balija VS, Nascimento LU, Dike S, de la Bastide M, Martienssen RA, McCombie WR. Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science*. 2003; 302 (5653): 2115–7. DOI: 10.1126/science.1091265.
 29. Peterson DG, Schulze SR, Sciara EB, Lee SA, Bowers JE, Nagel A, Jiang N, Tibbitts DC, Wessler SR, Paterson AH. Integration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res*. 2002; 12 (5): 795–807. DOI: 10.1101/gr.226102.
 30. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. High-Cot sequence analysis of the maize genome. *Plant J*. 2003; 34 (2): 249–55. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.2003.01716.x.
 31. Shagina I, Bogdanova E, Mamedov IZ, Lebedev Y, Lukyanov S, Shagin D. Normalization of genomic DNA using duplex-specific nuclease. *Biotechniques*. 2010; 48 (6): 455–9. DOI: 10.2144/000113422.
 32. Deng H, Ren Y, Shen W, Gao Z. An ultrasensitive homogeneous chemiluminescent assay for microRNAs. *Chem Commun (Camb)*. 2013; 49 (82): 9401–3. DOI: 10.1039/c3cc44824j.
 33. Shen W, Yeo KH, Gao Z. A simple and highly sensitive fluorescence assay for microRNAs. *Analyst*. 2015; 140 (6): 1932–8. DOI: 10.1039/c4an02146k.

ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ К SARS-COV-2 В ТЕЧЕНИЕ 12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19

Н. А. Маянский¹✉, Е. А. Бржозовская¹, С. С. Стоянова¹, А. В. Фролков¹, Ю. С. Лебедин²

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

² Общество с ограниченной ответственностью «ХЕМА», Москва, Россия

Формирование и поддержание иммунитета против SARS-CoV-2 является важным условием преодоления пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19. Целью работы было охарактеризовать динамику уровня антител IgG к рецептор-связывающему домену (RBD) SARS-CoV-2 с использованием набора для иммуноферментного анализа (ИФА), откалиброванного при помощи Международного стандарта анти-SARS-CoV-2-иммуноглобулинов (IS-SARS-CoV-2). Концентрацию анти-RBD-IgG измеряли в когорте лиц после выздоровления от COVID-19 с интервалом в месяц в течение 6 месяцев и в точке 12 месяцев с использованием наборов ИФА, откалиброванных IS-SARS-CoV-2; результаты представляли в единицах связывания антител (BAU) на 1 мл. Всего исследовали 97 образцов сыворотки крови от 20 человек с ПЦР-подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2. К первому месяцу после заражения средний геометрический титр (GMT) анти-RBD-IgG составил 433 BAU/мл (диапазон 36–25900 BAU/мл). Со временем концентрация IgG против RBD постепенно снижалась, достигая GMT в 68 BAU/мл к 12 месяцу; анти-RBD-IgG сохранялись у 13 из 14 (93%) лиц, обследованных через 12 месяцев после инфицирования. Стандартизированные количественные серологические данные играют важную роль в мониторинге иммунного ответа и облегчают сравнение между исследованиями, создавая основу для поиска общего серологического коррелята иммунной защиты против SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, анти-RBD IgG, динамика, концентрация, BAU/мл

Вклад авторов: Н. А. Маянский — концепция, обработка результатов, написание текста; Е. А. Бржозовская — сбор образцов, выполнение ИФА, обработка результатов, подготовка иллюстраций; С. С. Стоянова — сбор образцов, обработка результатов, подготовка иллюстраций; А. В. Фролков — обработка результатов, подготовка рукописи; Ю. С. Лебедин — концепция, выполнение ИФА, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 197 от 21 мая 2020 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Николай Андреевич Маянский
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, Россия; mayanskiy.nikolay@gmail.com

Статья получена: 01.02.2022 **Статья принята к печати:** 14.02.2022 **Опубликована онлайн:** 20.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.007

DYNAMIC CHANGES IN THE CONCENTRATION OF ANTI-SARS-COV-2 ANTIBODIES WITHIN 12 MONTHS AFTER RECOVERY FROM COVID-19

Mayanskiy NA¹✉, Brzhozovskaya EA¹, Stoyanova SS¹, Frolkov AV¹, Lebedin YuS²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² XEMA LLC, Moscow, Russia

Generation and maintenance of immunity to SARS-CoV-2 is essential for overcoming the pandemic of the novel coronavirus infection COVID-19. The study was aimed to assess the dynamic changes in the levels of IgG antibodies against the SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) with the use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, calibrated using the International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (IS-SARS-CoV-2). The concentrations of anti-RBD-IgG were measured in the cohort of individuals, who had recovered from COVID-19, with an interval of a month for 6 months, and at a time point of 12 months, using the ELISA kits, calibrated with the use of IS-SARS-CoV-2; the results were expressed in binding antibody units (BAU) per 1 mL. A total of 97 blood serum samples, obtained from 20 individuals with SARS-CoV-2 infection, confirmed by PCR, were collected. The geometric mean titer (GMT) of anti-RBD-IgG was 433 BAU/mL (range 36–25,900 BAU/mL) within a month after the infection. The concentration of anti-RBD-IgG gradually decreased with time and reached the GMT value of 68 BAU/mL by the 12th month; anti-RBD-IgG persisted in 13 individuals (93%) out of 14, examined 12 months after the infection. The standardized quantitative serological data play a vital part in monitoring the immune response and make it easier to compare the studies, providing the basis for seeking the common serological correlate of the protective immunity to SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2, anti-RBD IgG, dynamic changes, concentration, BAU/mL

Author contribution: Mayanskiy NA — concept, data processing, manuscript writing; Brzhozovskaya EA — sample collection, ELISA, data processing, making illustrations; Stoyanova SS — sample collection, data processing, making illustrations; Frolkov AV — data processing, manuscript preparation; Lebedin YuS — concept, ELISA, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 197 dated May 21, 2020).

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikolay A. Mayanskiy
Ostrovitianova, 1, Moscow, Russia; mayanskiy.nikolay@gmail.com

Received: 01.02.2022 **Accepted:** 14.02.2022 **Published online:** 20.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.007

Естественное инфицирование и вакцинация против COVID-19 приводят к выработке антител против вирусных антигенов, играющих важную роль в мониторинге иммунного ответа [1]. Хотя ожидается, что приобретенный естественным путем иммунитет к SARS-CoV-2 будет длительным [2–3], серологический эквивалент защиты от вируса еще не установлен. Одним из препятствий для определения такого коррелята является отсутствие

стандартизации лабораторных анализов, что, вероятно, объясняет противоречивые литературные данные о серологических исследованиях при SARS-CoV-2-инфекции. Недавно ВОЗ ввела Международный стандарт анти-SARS-CoV-2-иммуноглобулинов (IS-SARS-CoV-2), который позволяет унифицировать результаты измерения уровня антител к SARS-CoV-2, используя единицы IS-SARS-CoV-2, а именно единицы связывания антител

(binding antibody units, BAU) [1]. Целью исследования было измерить концентрацию IgG к рецепторсвязывающему домену (RBD) SARS-CoV-2 в разные моменты времени в течение 12-месячного периода в когорте медицинских работников, переболевших SARS-CoV-2-инфекцией, с использованием наборов для иммуноферментного анализа (ИФА), откалиброванных по IS-SARS-CoV-2.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании, продолжавшемся с мая 2020 г. по июнь 2021 г., приняли участие сотрудники Российской детской клинической больницы РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Критерии включения в исследование: наличие положительного ПЦР-теста на COVID-19. Критерии исключения: отсутствовали.

В апреле и мае 2020 г. лица с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2 после возвращения на работу сдавали образец сыворотки с интервалом в месяц для измерения анти-RBD-IgG. Образцы собирали ежемесячно в течение 6 месяцев, а последняя проба была получена через 12 месяцев после положительного результата ПЦР; от каждого участника было получено 4–7 образцов. Собранные образцы хранили при температуре -80°C .

Все образцы были проанализированы в одной серии в июле 2021 г. с использованием набора ИФА для количественного определения анти-RBD-IgG (XEMA; Россия) [4], откалиброванного при помощи IS-SARS-CoV-2. Аналитический диапазон составлял 15–240 BAU/мл; образцы с концентрацией анти-RBD-IgG >240 BAU/мл дополнительно разводили в 10–100 раз и повторно измеряли в отдельной серии. Положительными считали образцы при уровне анти-RBD-IgG ≥ 15 BAU/мл.

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ IBM SPSS Statistics 27.0 (IBM Corp.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в ходе исследования было получено 97 образцов сыворотки у 20 индивидов, в том числе у 14 (70%) женщин, с подтвержденной ПЦР SARS-CoV-2-инфекцией. Медиана возраста составила 50 лет (Q_1 – Q_3 , 40–57 лет). Течение COVID-19 у всех участников было легкой или средней степени тяжести, тяжелые случаи отсутствовали.

У трех человек образцы сыворотки были получены за месяц до заражения SARS-CoV-2; в этих образцах анти-RBD-IgG не обнаружены. Через месяц после положительного результата ПЦР SARS-CoV-2 у всех участников присутствовали анти-RBD-IgG в концентрации выше порогового значения, равного 15 BAU/мл, со средним геометрическим титром (GMT) 433 BAU/мл (95% ДИ, 123–1527 BAU/мл; диапазон — 36–25900 BAU/мл) (см. рисунок). В точке 2 месяца медиана GMT имела близкое значение — 456 BAU/мл (95% ДИ, 154–1353 BAU/мл). В дальнейшем концентрация анти-RBD-IgG постепенно снижалась, достигнув медианы GMT 68 BAU/мл (95% ДИ, 35–131 BAU/мл) к 12 месяцу. В промежутке между первым и шестым месяцами все образцы были анти-RBD-IgG-положительными. Из 14 человек, обследованных через 12 месяцев после заражения SARS-CoV-2, 13 (93%) индивидов сохраняли серопозитивность в отношении анти-RBD-IgG с GMT выше 15 BAU/мл. Медиана концентрации анти-RBD-IgG была в 6,7 раза ниже (95% ДИ, 4,4–10,3 раз) через 12 месяцев по сравнению с самой высокой медианой GMT, выявленной на втором месяце после инфицирования SARS-CoV-2.

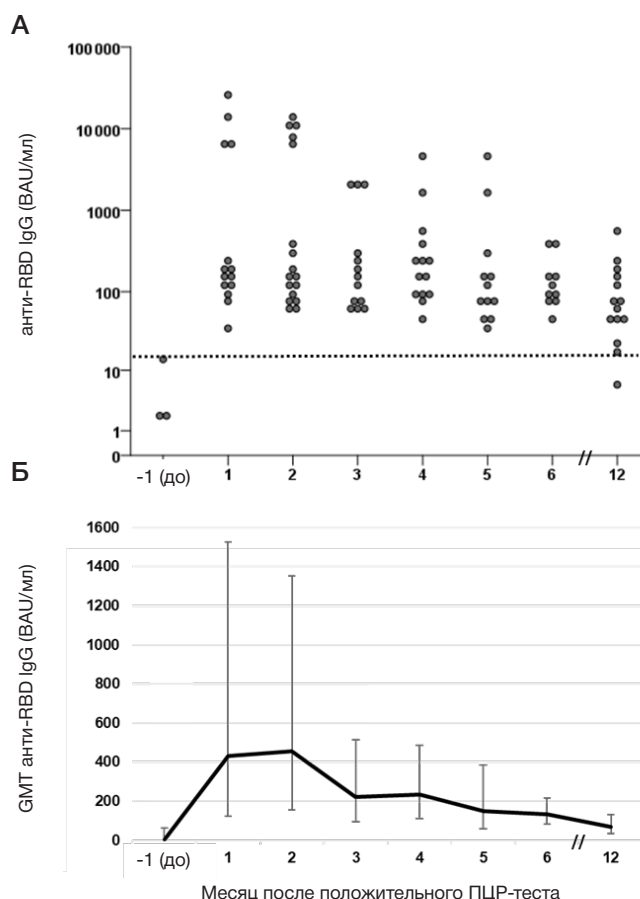


Рис. Концентрация анти-RBD-IgG в зависимости от времени после положительного ПЦР-теста на SARS-CoV-2. (А) Индивидуальные значения 97 образцов и (Б) средние геометрические титры (GMT) с 95%-м ДИ анти-RBD-IgG, выраженные в BAU/мл; пунктирная линия в (А) на уровне 15 BAU/мл указывает порог положительных значений

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До сих пор было опубликовано лишь несколько исследований, в которых использованы стандартизированные значения количества антител против SARS-CoV-2 после естественной инфекции и/или вакцинации [5–7]. Так, при помощи метода нейтрализации живого вируса показано, что анти-RBD-IgG в концентрации ≥ 100 BAU/мл через год после заражения полностью нейтрализовали три вызывающих опасения варианта SARS-CoV-2, что снизило риск повторного заражения этими штаммами вируса [5]. В другом сообщении у вакцинированных м-РНК-вакциной на 14-й день после вакцинации GMT анти-RBD-IgG составлял 7756 BAU/мл [6]. Таким образом, количественные результаты дают основание для поиска общего серологического коррелята иммунной защиты против SARS-CoV-2. Более того, такие данные важны для мониторинга естественного иммунитета и облегчают сравнение иммунного ответа на различные вакцины [1]. Значительные различия и системная погрешность в числовых результатах, выраженных в BAU/мл, при использовании различных тест-систем [7] оправдывают дальнейшие усилия по унификации серологических тестов, выявляющих антитела против SARS-CoV-2.

ВЫВОДЫ

В работе проведена оценка динамики антительного ответа на SARS-CoV-2-инфекцию в ходе формирования естественного иммунитета. Применение IS-SARS-CoV-2

для калибровки ИФА-тест-системы позволило продемонстрировать изменение концентрации анти-RBD IgG в широком диапазоне от 36 до 25900 BAU/мл с максимальным разбросом значений в первые два месяца

после инфицирования. С течением времени уровень анти-RBD-IgG постепенно снижался, однако положительные значения сохранялись на протяжении всех 12 месяцев наблюдения у большинства обследованных.

Литература

1. Kristiansen PA, Page M, Bernasconi V, Mattiuzzo G, Dull P, Makar K, et al. WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. *Lancet*. 2021; 397: 1347–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00527-4.
2. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Fink S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*. 2021; 595: 426–31. DOI: 10.1038/s41586-021-03696-9.
3. De Giorgi V, West KA, Henning AN, Chen LN, Holbrook MR, Gross R, et al. Naturally acquired SARS-CoV-2 immunity persists for up to 11 months following infection. *J Infect Dis*. 2021; jiab295. DOI: 10.1093/infdis/jiab295.
4. SARS-CoV-2-IgG EIA instruction manual. <https://xema-medica.com/eng/sets/ifu/Archive/>. (kit K153GQIE v2018). (Assessed 20 September 2021).
5. Gallais F, Gantner P, Bruel T, Velay A, Planas D, Wendling MJ, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*. 2021; 71: 103561. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103561.
6. Borobia AM, Carcas AJ, Pérez-Olmeda M, Castaño L, Bertran MJ, García-Pérez J, et al. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021; 398: 121–30. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01420-3.
7. Kim Y, Lee JH, Ko GY, Ryu JH, Jang JH, Bae H, et al. Quantitative SARS-CoV-2 Spike Antibody Response in COVID-19 Patients Using Three Fully Automated Immunoassays and a Surrogate Virus Neutralization Test. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11: 1496. DOI: 10.3390/diagnostics11081496.

References

1. Kristiansen PA, Page M, Bernasconi V, Mattiuzzo G, Dull P, Makar K, et al. WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. *Lancet*. 2021; 397: 1347–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00527-4.
2. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Fink S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*. 2021; 595: 426–31. DOI: 10.1038/s41586-021-03696-9.
3. De Giorgi V, West KA, Henning AN, Chen LN, Holbrook MR, Gross R, et al. Naturally acquired SARS-CoV-2 immunity persists for up to 11 months following infection. *J Infect Dis*. 2021; jiab295. DOI: 10.1093/infdis/jiab295.
4. SARS-CoV-2-IgG EIA instruction manual. <https://xema-medica.com/eng/sets/ifu/Archive/>. (kit K153GQIE v2018). (Assessed 20 September 2021).
5. Gallais F, Gantner P, Bruel T, Velay A, Planas D, Wendling MJ, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*. 2021; 71: 103561. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103561.
6. Borobia AM, Carcas AJ, Pérez-Olmeda M, Castaño L, Bertran MJ, García-Pérez J, et al. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021; 398: 121–30. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01420-3.
7. Kim Y, Lee JH, Ko GY, Ryu JH, Jang JH, Bae H, et al. Quantitative SARS-CoV-2 Spike Antibody Response in COVID-19 Patients Using Three Fully Automated Immunoassays and a Surrogate Virus Neutralization Test. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11: 1496. DOI: 10.3390/diagnostics11081496.

СВОЙСТВА АНТИТЕЛ К RBD У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОМ «СПУТНИК V»

Л. В. Генералова¹, И. В. Григорьев², Д. В. Васина², А. П. Ткачук², И. С. Кружкова², Л. В. Колобухина², О. А. Бургасова^{1,2}, В. А. Гушчин²✉

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Исследование свойств антител, участвующих в нейтрализации вируса, после перенесенного заболевания COVID-19 и применения профилактических препаратов, остается актуальной задачей, от которой зависит выработка стратегий первичной и повторной иммунизации. Измерение уровня антител к антигенам SARS-CoV-2 — один из основных способов оценки иммунитета, однако не дает достаточной информации о количественных и качественных показателях иммунного ответа. Целью работы было исследовать свойства антител IgG к RBD у переболевших COVID-19 и вакцинированных препаратом «Спутник V». На когортах пациентов (18–80 лет; соотношение мужчин и женщин — 47 : 53), переболевших COVID-19, и вакцинированных добровольцев изучена динамика созревания аффинности и изменения нейтрализующей активности IgG к RBD. Нейтрализующая активность сывороток крови у добровольцев через 4–6 месяцев после вакцинации снизилась по сравнению с образцами переболевших пациентов (медианы — 57,4 и 86,4% соответственно). Индекс avidности у вакцинированных добровольцев, напротив, был значительно выше, чем у перенесших COVID-19 (76,7 и 61,4% соответственно). В острую фазу заболевания (14–16 дней от появления симптомов) ранее вакцинированные пациенты имели более высокий индекс avidности, чем первичные пациенты (43,5 и 20,4% соответственно). В долгосрочной перспективе степень созревания аффинности вирусспецифичных IgG после вакцинации может быть выше, чем после естественно перенесенной инфекции. Показано, что вакцинация «Спутником V» приводит к формированию высокоавидных IgG, сохраняющихся по крайней мере 6 месяцев. Продemonстрировано наличие уровней антител, коррелирующих с протективным иммунитетом, на протяжении 4–6 месяцев после вакцинации или перенесенной инфекции.

Ключевые слова: avidность антител, вирус-нейтрализация, SARS-CoV-2, иммунная память, вакцинация, «Спутник V»

Финансирование: исследование проведено при поддержке гранта Министерства здравоохранения РФ, № AAAA - A20-120113090054-6, профессору О. А. Бургасовой было выделено финансирование по программе стратегического академического лидерства РУДН.

Вклад авторов: Л. В. Генералова и И. В. Григорьев — планирование исследования, подготовка и проведение экспериментов, интерпретация данных и написание статьи; И. С. Кружкова и Л. В. Колобухина — интерпретация данных, написание статьи; Д. В. Васина, А. П. Ткачук, О. А. Бургасова, В. А. Гушчин — планирование исследования и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Первой московской инфекционной больницы (протокол № 11/А от 16 ноября 2020 г.); всеми участниками исследования было подписано информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин
ул. Гамалеи, 18, стр. 9, г. Москва, Россия; wowaniada@gmail.com

Статья получена: 23.01.2022 **Статья принята к печати:** 08.02.2022 **Опубликована онлайн:** 16.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.005

PROPERTIES OF RBD SPECIFIC IGG FROM COVID-19 PATIENTS AND SPUTNIK V VACCINATED INDIVIDUALS

Generalova LV¹, Grigoriev IV², Vasina DV², Tkachuk AP², Kruzhkova IS², Kolobukhina LV², Burgasova OA^{1,2}, Gushchin VA²✉

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

² Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

SARS-CoV-2 specific antibody response is a generally accepted measure of postinfection and vaccination-induced immunity assessment. The dynamics of avidity maturation and neutralizing activity of virus-specific immunoglobulins G during the SARS-CoV-2-associated coronavirus infection was studied in cohorts of vaccinated volunteers and COVID-19 patients. 4–6 months after vaccination, neutralization activity was low compared to hospitalized patients (medians 57.4% vs 86.4%). On the opposite, the avidity indices in vaccinated volunteers were significantly higher (median 76.7%) than among hospitalized patients (median 61.4%). During the acute phase of the disease (14–16 days PI), post-vaccination patients have also higher avidity indices than primary patients (medians 43.5% vs 20.4%). Our results suggest that in long-term perspective antibody affinity maturation rate is higher after vaccination than after a natural infection. We demonstrated that Sputnik V vaccination leads to formation of high-avidity IgG, which persists for at least 6 months of observation. These results also indicate the presence of protective efficacy markers for at least 4–6 months after the vaccination or a previous illness and gives grounds for the half-year time period chosen for booster immunization with Sputnik V in Russia.

Keywords: antibody avidity, virus neutralization, SARS-CoV-2, immune memory, vaccination, Sputnik-V

Funding: this research was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation, Government assignments number № AAAA - A20-120113090054-6, Prof. Olga A. Burgasova was also supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Author contribution: LV Generalova, IV Grigoriev — research planning, experiments preparation and execution, data interpretation and paper draft preparation; IS Kruzhkova, LV Kolobukhina — data interpretation and paper draft preparation; DV Vasina, AP Tkachuk, OA Burgasova, VA Gushchin — research planning, data interpretation and paper draft preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the First Moscow Infectious Diseases Hospital (protocol № 11/A dated November 16, 2020); informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir A. Gushchin
Gamaleya, 18, str. 9, Moscow, Russia; wowaniada@gmail.com

Received: 23.01.2022 **Accepted:** 08.02.2022 **Published online:** 16.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.005

Измерение специфических к SARS-CoV-2 антител является общепризнанным способом оценки иммунитета после вакцинации или перенесенного заболевания. Эффективность антител и их способность предотвращать повторное инфицирование зависят не только от их количества (титра), но и от качественных характеристик антител, включающих нейтрализующую активность и avidность. Эти свойства антител, вырабатываемых после вакцинации «Спутником V» или перенесения COVID-19, в настоящее время охарактеризованы недостаточно. Показано, что avidность (% высокоаффинных антител в крови) к SARS-CoV-2 коррелировала с временем от момента заболевания и с ростом титра вирус-нейтрализации [1]. Благоприятные клинические исходы у пациентов с COVID-19 были ассоциированы с высокой avidностью антител, но не с их количеством [2]. В настоящее время отсутствуют научные публикации о динамике созревания аффинности антител после вакцинации «Спутником V» и перенесенного COVID-19, а также об изменении функциональной активности антител в течение длительного периода наблюдения. Целью исследования было изучить долгосрочную динамику выработки антител у пациентов, перенесших COVID-19 и у вакцинированных «Спутником V» добровольцев, часть из которых после вакцинации перенесла инфекцию, и охарактеризовать особенности формирования продолжительной иммунологической памяти.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

В исследовании приняли участие 41 человек, которые были разделены на три группы (табл. 1). Возраст участников исследования находился в диапазоне 18–80 лет. Группа госпитализированных в стационар была набрана с ноября по декабрь 2020 г. из числа пациентов Первой московской инфекционной больницы (Москва); вакцинированные пациенты, потребовавшие госпитализации (медианное время с момента прохождения полного курса вакцинации до госпитализации составило 56 дней), были набраны там же в период с марта по апрель 2021 г. Здоровые добровольцы, вакцинированные «Спутником V», были отобраны в период с сентября по декабрь 2020 г. У 23 пациентов, госпитализированных в стационар г. Москвы с различной степенью тяжести заболевания, сыворотку крови брали дважды: при поступлении в больницу (острая фаза) и через 4–6 месяцев после выписки; забор крови у девяти вакцинированных пациентов был произведен во время госпитализации, а у девяти здоровых вакцинированных добровольцев — в различные сроки после полной вакцинации. Медиана времени от наступления симптомов до первого забора крови составила 14 дней у невакцинированных пациентов и 10 дней у ранее вакцинированных. У вакцинированных добровольцев отсутствие COVID-19 было подтверждено отсутствием специфических антител к белку нуклеокапсида (Nc) SARS-CoV-2.

Критерии включения для всех пациентов: диагноз COVID-19 был подтвержден методом ОТ-ПЦР на РНК вируса в назофарингеальных мазках либо по результатам КТ легких; тяжесть заболевания госпитализированных пациентов определяли в соответствии со шкалой NEWS [3]. Критерии включения вакцинированных пациентов: госпитализация в стационар участников с подтвержденным диагнозом COVID-19, получивших

вторую дозу вакцины не менее чем за две недели до появления симптомов заболевания. Критерии включения здоровых добровольцев: наличие вакцинации двумя дозами «Спутника V» и отсутствие симптомов COVID-19 в течение двух недель перед взятием образцов. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании.

Сбор и хранение образцов крови

Венозную кровь собирали в вакутейнеры с активатором свертывания и разделительным гелем и доставляли в лабораторию при +4 °С. Сыворотку отделяли центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 3000 об./мин, аликвотировали и хранили при –30 °С до дальнейшего использования.

Определение IgG к нуклеокапсидному белку (Nc) и рецептор-связывающему домену шиповидного белка (S1 RBD) SARS-CoV-2

Измерение IgG к Nc и RBD проводили с помощью лабораторных тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА), результат выражали в виде индекса позитивности (ИП) в signal/cut-off (S/CO). Для проведения ИФА использовали рекомбинантный фрагмент рецептор-связывающего домена (RBD) S1 шиповидного белка SARS-CoV-2 (RBD №8COV1, Хайтест; Россия), экспрессированный в эукариотических клетках, и рекомбинантный белок нуклеокапсида (Nc), экспрессированный в *Escherichia coli* и очищенный в нашей лаборатории. Для сорбции в 96-луночные ИФА-планшеты (Costar 2592, Corning; США) вносили по 100 мкл раствора 1 мкг/мл рекомбинантного белка в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали ночь при 4 °С. На следующий день планшеты блокировали 2 ч при комнатной температуре буфером с 0,5% казеина S002X (XEMA; Россия). Образцы исследуемых сывороток разводили в соотношении 1:100 в ИФА-дилюэнте S011 (XEMA; Россия). В качестве положительного контроля использовали сыворотки реконвалесцентов с диагнозом COVID-19, подтвержденным ОТ-ПЦР, а в качестве отрицательного — архивные образцы сывороток, собранные до 2020 г. ИФА-планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С и трижды отмывали фосфатным буфером с 0,1% Твин-20. После отмывки в лунки вносили по 100 мкл раствора поликлональных антител к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (ПХ) (Novex A18823; США) и инкубировали 1 час при 37 °С. Затем планшеты отмывали 6 раз и добавляли в лунки по 100 мкл раствора субстрата 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (R055, XEMA; Россия). Через 10 мин останавливали реакцию, внося в лунки по 100 мкл 10% HCl. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм с помощью Multiscan FC (Thermo Scientific; США).

ИФА-нейтрализация (конкурентный ИФА)

Выявление IgG, нейтрализующих связывание RBD вируса с рецептором ACE2, проводили с помощью коммерческой тест-системы «SARS-CoV-2-ИФА-анти-RBD» (MT-I-C1-04.192, МедипалТех; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого образцы исследуемых сывороток смешивали с биотинилированным рекомбинантным человеческим рецептором ACE-2 и вносили смесь в лунки ИФА-планшет, сорбированных рекомбинантным RBD. После инкубации и отмывки в лунки

Таблица 1. Исследуемые когорты. Представлены медианные значения, в скобках указан диапазон

Характеристика	Пациенты (n = 23)	Вакцинированные пациенты (n = 9)	Вакцинированные добровольцы (n = 9)
Медианный возраст, лет (межквартильный диапазон)	59 (54–65)	72 (69–79)	34 (33–39)
Пол, %	52% мужчин, 48% женщин	33% мужчин, 67% женщин	56% мужчин, 44% женщин
Время от начала симптомов до первой точки, дни. Медианное значение (мин-макс)	14 (9–17)	10 (5–19)	NA
Время от начала симптомов до второй точки, дни. Медианное значение (мин-макс)	135 (116–159)	16 (11–24)	NA
Время от первой вакцинации до первой точки исследования, дни. Медианное значение (мин-макс)	NA	62 (30–88)	147 (100–263)
Время от первой вакцинации до второй точки исследования, дни. Медианное значение (мин-макс)	NA	68 (35–95)	261 (161–349)

добавляли ПХ, конъюгированную со стрептавидином. Для визуализации реакции использовали субстратный раствор ТМБ. Оптическая плотность в лунках была обратно пропорциональна концентрации в образце антител, способных блокировать связывание ACE-2 с RBD. Коэффициент ингибирования (КИ) вычисляли по формуле $КИ = (1 - \text{ОПобр}/\text{ОПотр}) \times 100\%$, где ОПобр — ОП исследуемого образца, а ОПотр — ОП отрицательного контроля, не содержащего антител. Нейтрализующую способность антител считали высокой, если образец сыворотки ингибировал связывание RBD с ACE-2 более чем на 30%; промежуточной, если КИ составлял 20–30% и низкой для образцов с КИ менее 20%.

Измерение avidности антител

Авидность IgG, специфичных к RBD SARS-CoV-2, измеряли с помощью набора «SARS-CoV-2-ИФА-IgG плюс» (MT-I-C1-03.192, МедипалТех; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого образцы положительных сывороток в дубликатах вносили в лунки планшет, сорбированных RBD. После инкубации и отмывки в лунки вносили либо ФСБ (нативные условия), либо раствор мочевины (денатурирующие условия). Далее проводили реакцию как обычный непрямой ИФА. Индекс avidности (ИА), пропорциональный устойчивости антител к денатурации, рассчитывали как соотношение ОП при 450 нм в лунках с денатурирующим агентом (4М мочевины) и в контрольных лунках, содержащих ФСБ. Антитела в образцах с ИА >50% считали высокоавидными, с ИА между 40 и 50% — с переходной avidностью, с ИА <40% — низкоавидными.

Статистический анализ данных

Результаты измерений представлены в виде медианных значений с указанием диапазона минимум–максимум. Сравнение групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, сравнение результатов, полученных для различных временных точек, проводили с помощью рангового критерия Уилкоксона. Статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$.

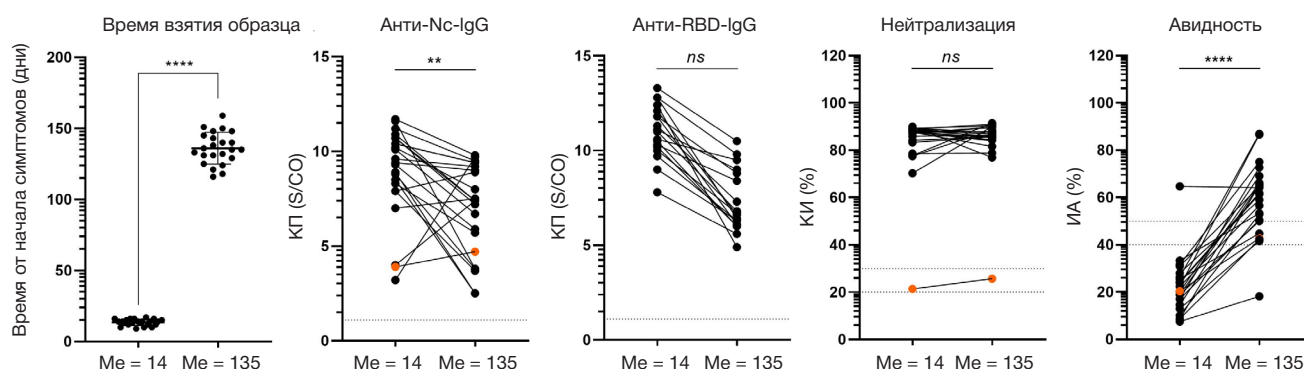
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы нами были охарактеризованы антитела у трех исследуемых групп. Во всех образцах сывороток определяли наличие IgG к RBD и Nc SARS-CoV-2, а также

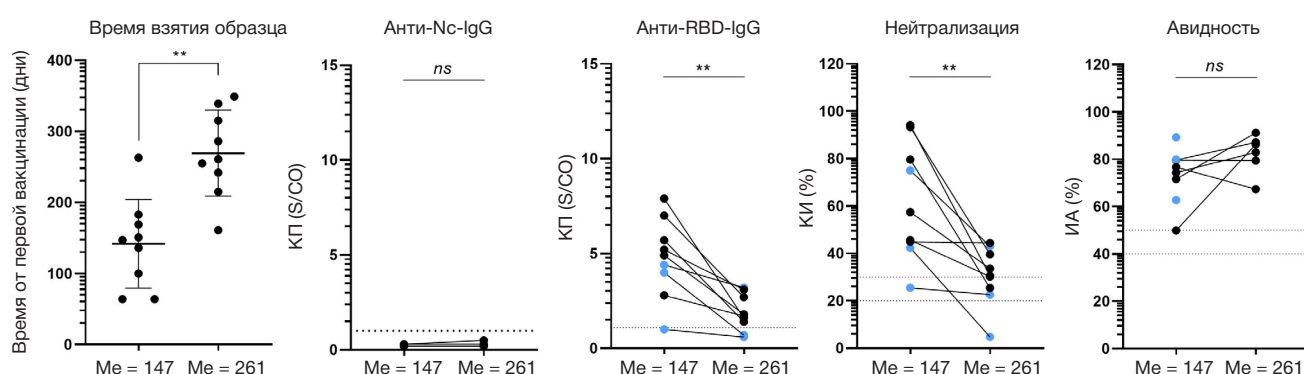
уровень avidности и нейтрализующей способности IgG к RBD. Образцы 23 госпитализированных пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 продемонстрировали сходную динамику изменения уровня антител. Спустя две недели после появления симптомов все образцы были IgG-положительными как для RBD (медианный S/CO — 10,5; мин-макс — 1,1–13,3), так и для Nc (медианный 9,4; мин-макс 3,2–11,7) (рис. 1; табл. 2). Из 23 образцов 22 (95,6%) продемонстрировали высокую нейтрализующую активность в тесте на ингибирование связывания ACE2 с RBD и низкую avidность с медианой 20% (7,5; 37,3%) антител IgG против RBD. Только один образец в этой когорте имел уровень avidности 64,7%, вероятно, из-за предыдущего незарегистрированного контакта с вирусом. Как и ожидалось, эти результаты свидетельствуют о наличии не прошедших процесс созревания аффинитета вирусспецифичных IgG [4]. Для анализа длительности персистенции антител к SARS-CoV-2 у пациентов, перенесших COVID-19, образцы крови были повторно собраны через 4–6 месяцев после выздоровления. Все образцы оставались положительными на анти-RBD- и анти-Nc-IgG (рис. 2; табл. 2). Медианные значения ИП для анти-RBD-IgG снизились с 10,5 до 6,8 S/CO, а для анти-Nc IgG — с 9,4 до 7,4 S/CO. Образцы с низкими уровнями IgG к RBD (S/CO <5) в первой точке были собраны на 10–12-й дни болезни. Таким образом, пик концентрации антител не был достигнут, что может быть связано с вариабельностью инкубационного периода SARS-CoV-2 и индивидуальной динамикой выработки антител. Тем не менее четыре месяца спустя все пациенты, кроме одного, имели схожие уровни анти-RBD IgG (медиана ИП — 6,8, межквартильный диапазон — 6,3–8,9).

Несмотря на выявленное в данной группе 1,5-кратное снижение уровня IgG к RBD, нейтрализующая активность антител при этом оставалась высокой без значимых различий между первой и второй точками. Это позволяет предположить, что количество антител не является единственным фактором, определяющим нейтрализующую активность. С одной стороны, сохранение высокого уровня нейтрализации при снижении концентрации антител может быть обусловлено качественными изменениями антител, в том числе возрастанием их специфичности и аффинности за этот период, с другой стороны — особенностями тест-системы, используемой в исследовании, поскольку полученные значения близки к верхнему пределу количественного измерения данной тест-системы, что не позволяет надежно оценить изменения нейтрализующей активности. В течение того же периода avidность анти-

А

Пациенты ($n = 23$)

Б

Вакцинированные добровольцы ($n = 9$)

В

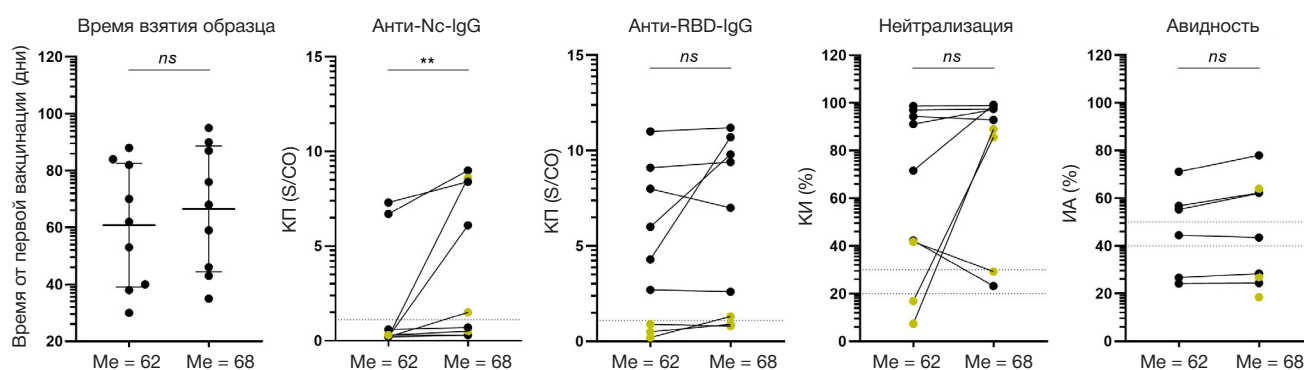
Вакцинированные пациенты ($n = 9$)

Рис. 1. Иммунный ответ к SARS-CoV-2 в исследуемых группах. (А) Когорта госпитализированных пациентов. (Б) Когорта вакцинированных пациентов. (В) Когорта здоровых добровольцев. Звездочкой отмечены достоверные различия (Т — критерий Уилкоксона). Ме — медианное время забора образцов в группах от начала симптомов или от первой вакцинации указано в подписях к осям графиков

RBD-IgG значительно возросла, достигнув высокого уровня ($IA > 50\%$) у 78% пациентов. Медианное значение avidности во второй точке составило 61,4% (мин-макс — 18,2–86,9%). Оставшиеся шесть пациентов (22%) имели среднюю (40–50%, «зона созревания») или низкую ($< 40\%$) avidность анти-RBD-IgG. Важно отметить, что у пяти пациентов с низкой и средней степенью avidности заболевание проходило со средней степенью тяжести или носило тяжелый характер (рис. 3). У одного пациента (рис. 1А; оранжевые точки) низкие уровни анти-RBD-IgG и нейтрализующей активности сохранялись во всех точках исследования, однако avidность его анти-RBD-IgG увеличилась с 20,4 до 42,7%. К концу периода

госпитализации большинство пациентов обладали высоким уровнем IgG к антигену SARS-CoV-2, которые были эффективны в предотвращении связывания RBD происходило с человеческим ACE-2. В течение следующих месяцев созревание аффинности анти-RBD IgG и, хотя общая концентрация анти-RBD- и анти-Nc-IgG снижалась, нейтрализующая активность антител оставалась на высоком уровне.

В группе здоровых добровольцев, вакцинированных «Спутником V» (рис. 1Б), восемь из девяти образцов были положительными по анти-RBD-IgG в первой точке исследования (медиана составила 147 дней после первой вакцинации) с ИГ, равным 4,9 S/CO (мин-макс —

Таблица 2. Уровни антител и их характеристика у когорт пациентов с различной степенью тяжести заболевания

		Пациенты			
		Всего (n = 23)	Лёгкие (n = 10)	Средней тяжести (n = 6)	Тяжелые (n = 7)
Острая фаза, медиана (межквартильный диапазон)					
1	Анти-RBD-IgG, S/CO	10.5 (7.8–11.8)	10.4 (7.6–11.9)	8.9 (1.5–11.5)	11.3 (10.2–12.8)
	Отрицательные, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	Положительные, n (%)	22 (95.6)	10 (100)	5 (80)	7 (100)
2	Анти-Nc-IgG, S/CO	9.4 (7.9–10.7)	9.9 (8.8–11.3)	7.45 (3.7–8.55)	10.4 (8.8–10.7)
	Отрицательные, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Положительные, n (%)	23 (100)	10 (100)	6 (100)	7 (100)
3	Нейтрализация, %	87.7 (83.3–88.7)	87.5 (78.4–88.9)	87.1 (58.1–88.5)	87.8 (87.3–89.0)
	Низкая, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	Высокая, n (%)	22 (95.6)	10 (100)	5 (80)	7 (100)
4	Авидность, %	20.4 (14.6–26.3)	19.5 (15.28–25.7)	22.2 (17.4–25.95)	22.4 (8.7–31.6)
	Низкая, n (%)	22 (95.6)	9 (90)	6 (100)	7 (100)
	Высокая, n (%)	1 (4.3)	1 (10)	0 (0)	0 (0)
4–6 месяцев после выздоровления, медиана (межквартильный диапазон)					
1	Анти-RBD-IgG, S/CO	6.8 (6.1–9.0)	6.5 (6.1–8.7)	6.6 (4.7–9.2)	7.3 (6.8–9.8)
	Отрицательные, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Положительные, n (%)	23 (100)	10 (100)	6 (100)	7 (100)
2	Анти-Nc-IgG, S/CO	7.4 (4.7–9.2)	7.3 (3.5–9.3)	6.7 (5.5–9.1)	7.4 (3.8–9.4)
	Отрицательные, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Положительные, n (%)	23 (100)	10 (100)	6 (100)	7 (100)
3	Нейтрализация, %	86.4 (84.3–89.5)	86.2 (80.9–88.8)	87.1 (69.7–90.1)	85.8 (85.3–89.5)
	Низкая, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
	Высокая, n (%)	22 (95.6)	10 (100)	5 (80)	7 (100)
4	Авидность, %	61.4 (50.0–66.2)	64.7 (52.3–70.0)	55.7 (42.4–62.6)	59.0 (42.2–75.0)
	Низкая, n (%)	6 (26.1)	1 (10)	3 (50)	2 (28.6)
	Высокая, n (%)	17 (73.9)	9 (90)	3 (50)	5 (71.4)

1–7,9). Четыре месяца спустя (медиана — 261 день после первоначальной вакцинации) анти-RBD-IgG-ИП значительно снизился до медианного уровня 1,7 S/CO, хотя у семи из девяти добровольцев оставались положительными по анти-RBD-IgG. У всех вакцинированных добровольцев IgG к Nc у SARS-CoV-2 отсутствовали, что исключает заражение SARS-CoV-2 в данной группе. Нейтрализующая активность антител коррелировала с динамикой изменения общего количества IgG и достоверно снизилась во всех образцах с медианного значения KI 57,4% в первой точке исследования до медианы 30,6% во второй точке. Авидность антител при этом оставалась высокой, из чего можно заключить, что уже в первой точке исследования (147 дней после вакцинации) созревание аффинитета завершилось у всех вакцинированных. Стоит отметить, что для трех образцов (33%) во второй точке исследования было невозможно оценить авидность из-за низкого уровня анти-RBD-IgG (рис. 1Б; показаны синим).

В группе вакцинированных «Спутником V» пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 (рис. 1В, табл. 1) медиана времени с момента получения первой дозы вакцины составила 62 дня (30–88), а среднее время забора проб с момента появления симптомов составило 10 дней (5–19). В это время шесть из девяти образцов были положительными на анти-RBD-IgG с медианой 4,3 S/CO

и только два были положительными на анти-Nc-IgG. Все анти-RBD-положительные образцы и один отрицательный образец были положительными в ИФА нейтрализации (медиана — 71,6%, мин-макс — 7,4–98,6%). Большая часть образцов (66,7%) имела антитела с низкой авидностью: медианное значение ИА — 27,6% (мин-макс — 0–71,1%). Повторный забор сыворотки в этой группе осуществляли приблизительно на 16-й день после появления симптомов. Через неделю после первого анализа медиана S/CO анти-RBD-IgG в целом существенно не изменилась (медиана — 7 S/CO, мин-макс — 0,8–11,2), однако семь из девяти пациентов были серопозитивными после инфекции и/или вакцинации. Нейтрализующая активность также существенно не изменилась (медиана — 92,9%, мин-макс — 23,2–99,2%), то же самое наблюдалось и для авидности антител. В двух образцах с низкими уровнями анти-RBD-IgG нейтрализующая активность значительно возросла до 85 и 89%, вероятно, из-за выработки анти-RBD-IgM (рис. 1, желтые точки).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У переболевших COVID-19 титры вируснейтрализующих антител коррелируют с тяжестью заболевания [5, 6], и такие антитела могут вырабатываться даже при низком уровне

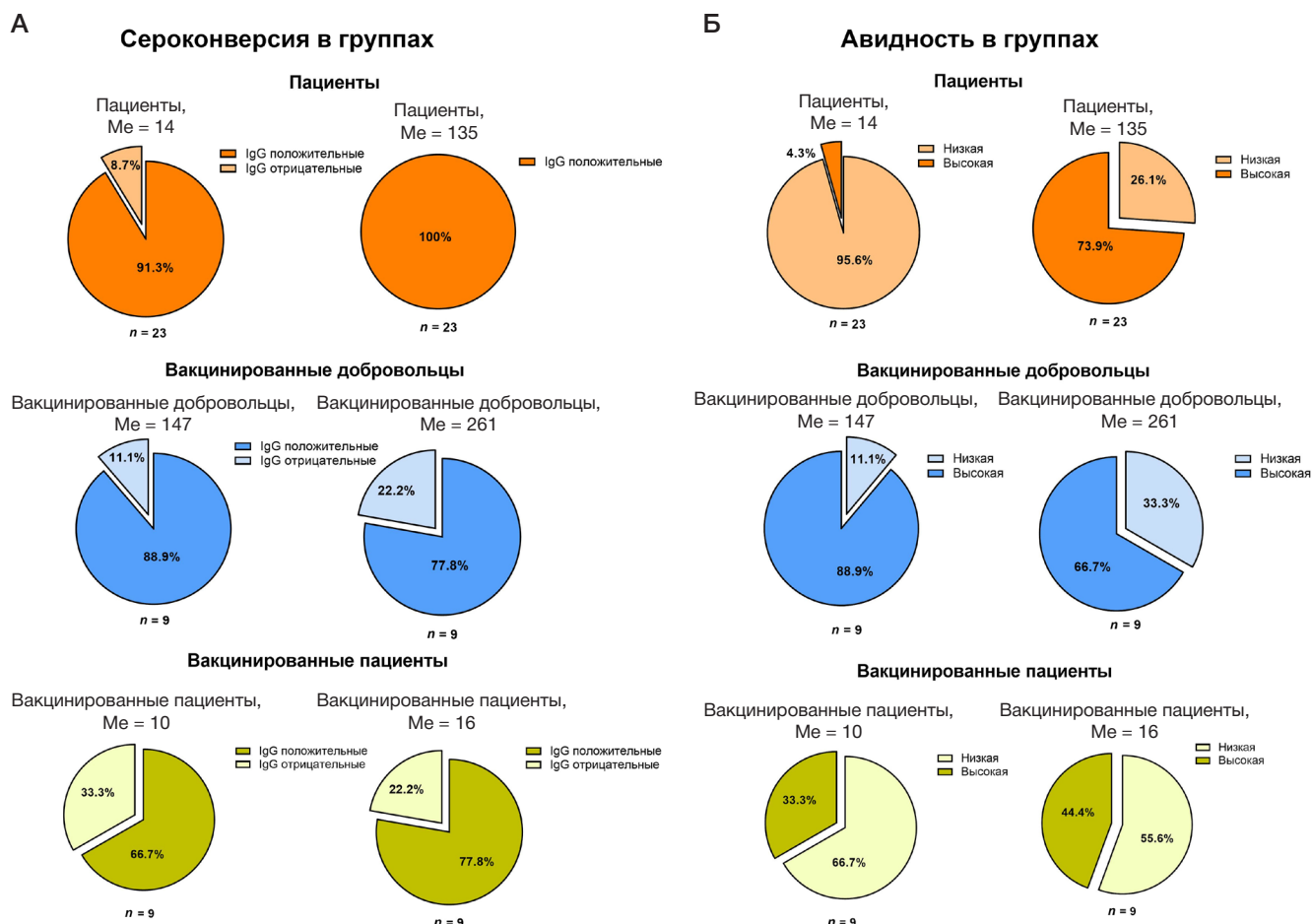


Рис. 2. Конверсия ИП анти-RBD-IgG (А) авидности анти-RBD-IgG (Б) в исследованных группах. Me — медианное время от начала симптомов или от первой вакцинации (дни)

соматической гипермутации [7, 8]. Рецепторсвязывающий домен (RBD) является иммунодоминантным и служит мишенью приблизительно для 90% нейтрализующих антител, обнаруживаемых в крови после перенесенной инфекции. Было показано, что титры анти-RBD-IgG снижаются после выздоровления с периодом полувыведения 49 дней. В то же время авидность антител со временем возрастала за счет проходящего процесса «созревания аффинитета» (соматической гипермутации с последующей селекцией на связывание с антигеном). Количество IgG к S-белку и RBD было выше в сыворотках госпитализированных в стационар пациентов в сравнении с больными, перенесшими COVID-19 в легкой или бессимптомной форме [9]. Известно, что авидность антител возрастает в ходе инфекции и сохраняется высокой после выздоровления [1]. В донорских плазмах реконвалесцентов корреляция высокой нейтрализующей активности с авидностью анти-RBD-IgG была выше, чем с авидностью анти-Nc. Это позволяет предположить, что антитела к RBD являются основными вируснейтрализующими антителами после COVID-19.

В проведенном нами исследовании сравнение образцов от госпитализированных пациентов и вакцинированных добровольцев спустя 4–6 месяцев после заболевания или вакцинации показало, что у вакцинированных добровольцев наблюдается достоверно более низкий уровень анти-RBD-IgG и нейтрализующей активности, но при этом достоверно более высокая авидность анти-RBD-IgG (рис. 4А, Б). Все госпитализированные пациенты оставались положительными по анти-RBD-IgG, в то время

как у одного из госпитализированных добровольцев уровень антител опустился ниже порога обнаружения (рис. 4В).

Сравнение образцов, полученных от невакцинированных и полностью вакцинированных «Спутником V» пациентов в острой фазе заболевания, показало, что у вакцинированных пациентов уровни антител к RBD и Nc были достоверно ниже, чем у невакцинированных (рис. 4Б). Тем не менее авидность анти-RBD-IgG в группе вакцинированных пациентов была достоверно выше, из чего можно заключить, что, несмотря на низкие уровни антител, вакцинация «Спутником V» приводила к развитию первичного иммунного ответа и формированию В-клеток памяти, а выработка антител в ходе инфицирования демонстрирует свойства вторичного иммунного ответа. В долгосрочном периоде степень созревания аффинности антител после вакцинации оказывается выше, чем после перенесенной инфекции. Хотя предполагается, что созревание антител повышает их нейтрализующую активность [10], в нашей работе корреляция между этими параметрами не выявлена.

Стоит отметить, что исследование имеет ряд ограничений, которые необходимо учитывать. Во-первых, выборка образцов, используемая для анализа, достаточно небольшая. Во-вторых, включенные группы пациентов имели ограниченный спектр клинических проявлений COVID-19. В частности, в исследовании не участвовали бессимптомные пациенты и пациенты с легким течением, доля которых наибольшая по сравнению с остальными клиническими формами. Кроме того, исследование

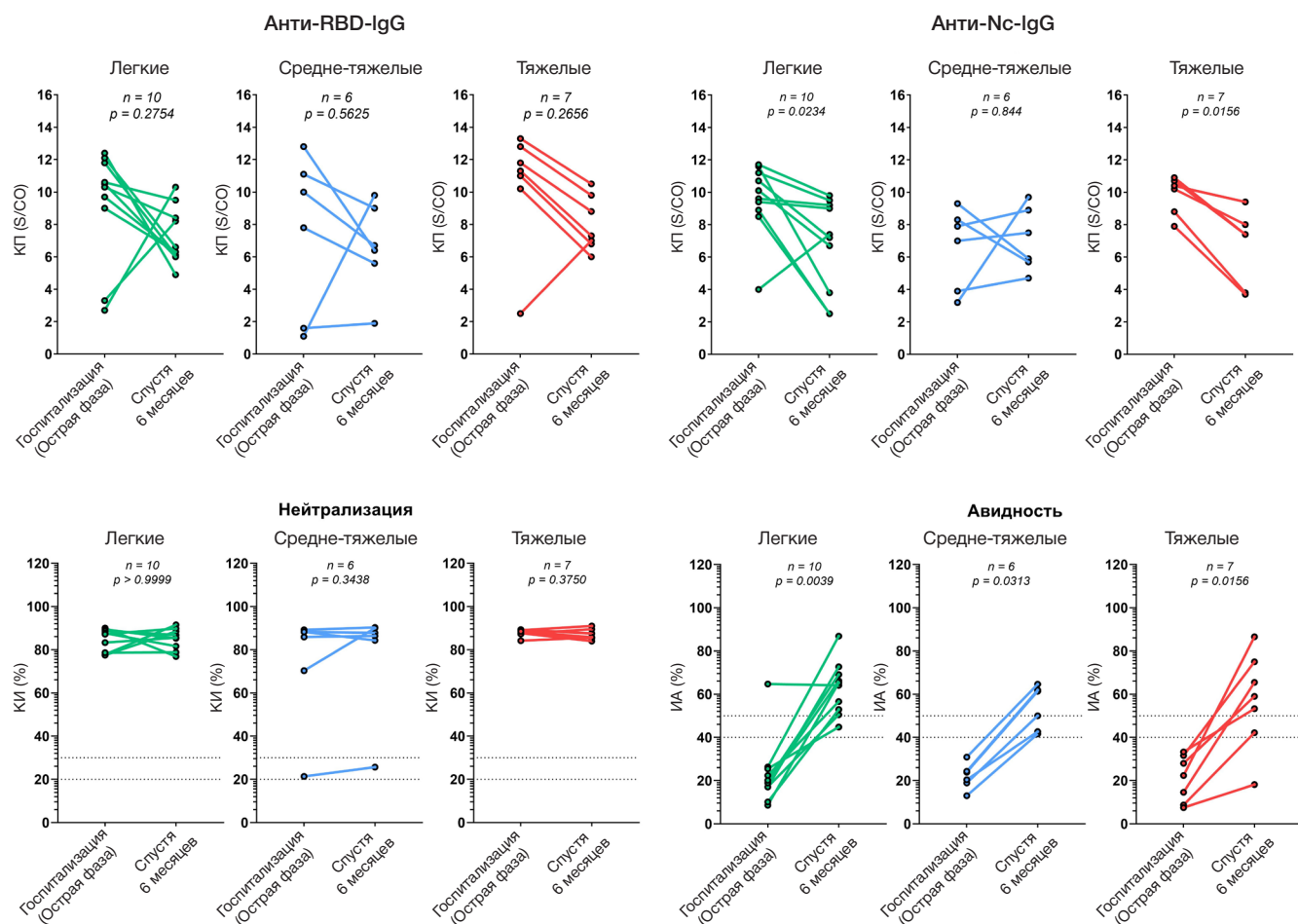


Рис. 3. Сравнение антительного ответа у пациентов с различной тяжестью заболевания

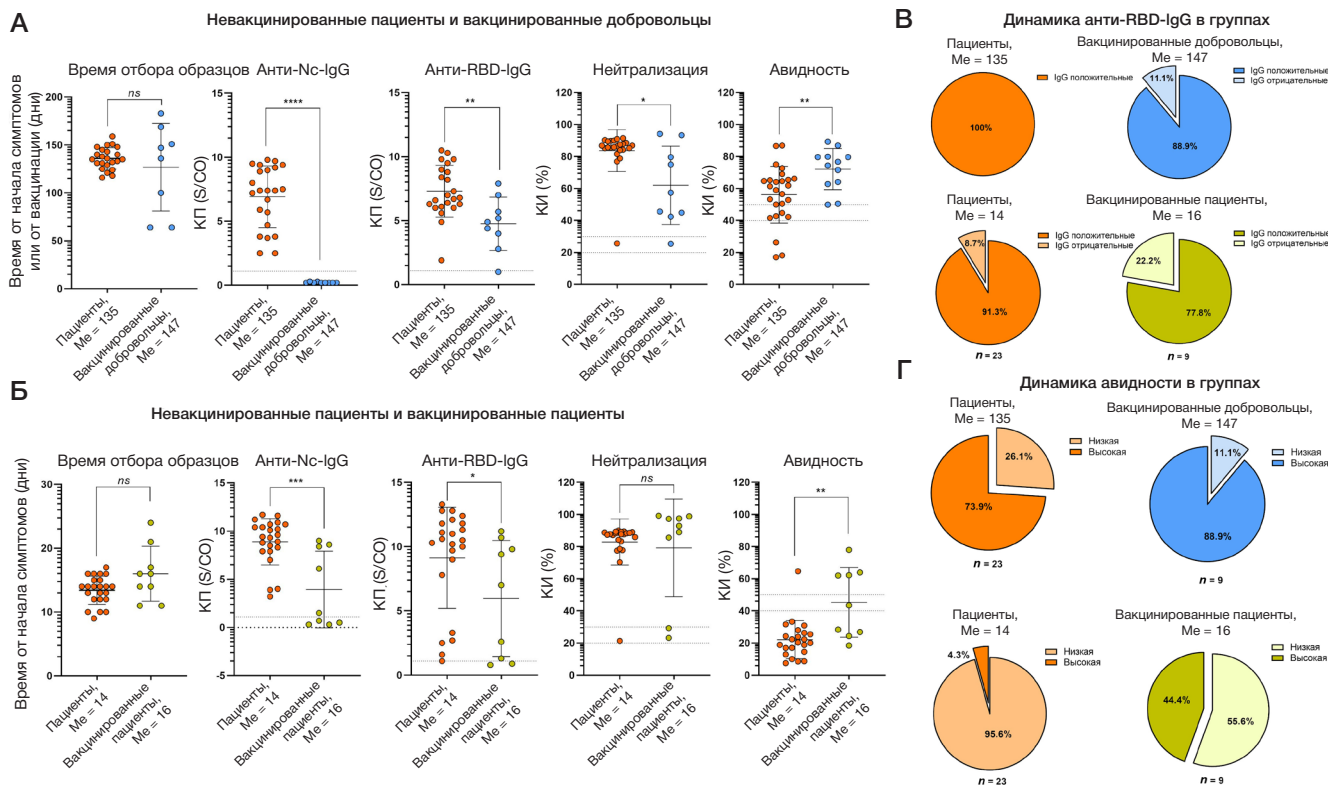


Рис. 4. Сравнение иммунного ответа в различных группах. (А) Сравнение невакцинированных пациентов и здоровых вакцинированных добровольцев через 4–6 месяцев после инфицирования/вакцинации. (Б) Сравнение вакцинированных и невакцинированных пациентов в острой фазе инфекционного процесса (2–3 недели от начала симптомов). (В) Сравнение сероконверсии по анти-RBD-IgG в исследованных группах. (Г) Сравнение динамики изменения avidности анти-RBD-IgG в исследованных группах. Звездочкой отмечены достоверные различия (U-критерий Манна-Уитни)

лимитировано лишь двумя временными точками, в которых были проведены наблюдения, что не позволяет оценить, когда именно наступает пик ответа по исследуемым нами параметрам.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволяет оценить основные характеристики антительного ответа. Так, у переболевших мы наблюдали ожидаемую картину, где после острой фазы заболевания, достигнутый уровень антител к RBD неизбежно снижается, но по меньшей мере в течение полугодия вируснейтрализующая активность сохраняется, что, вероятно, достигается повышением качества антител и ростом avidности. Нами показано, что вакцинация «Спутником V» также приводит к формированию высокоавидных антител, которые сохраняются на протяжении по меньшей мере 6 месяцев наблюдения. Это свидетельствует о наличии

маркеров защитной эффективности по крайней мере в течение 4–6 месяцев после вакцинации или ранее перенесенного заболевания и адекватности срока, выбранного для повторной иммунизации «Спутником V» на территории России. Наше исследование не позволяет оценить, для каких групп защитная эффективность может составлять меньший срок, чем 6 месяцев, однако исследование группы вакцинированных заболевших показывает наличие низкой avidности у вакцинированных заболевших и это резко контрастирует с группой здоровых вакцинированных, которые на заболели в течение полугодия наблюдения. Мы предполагаем, что низкая avidность анти-RBD-IgG, спустя два месяца после вакцинации, может служить не только прогностическим фактором тяжести заболевания, но и одним из потенциальных маркеров для ранней ревакцинации. Дальнейшие исследования на больших группах позволят подтвердить или опровергнуть данную гипотезу.

Литература

1. Benner SE, Patel EU, Laeyendecker O, et al. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J Infect Dis.* 2020; 222: 1974–84.
2. Tang J, Grubbs G, Lee Y, et al. Impact of convalescent plasma therapy on SARS-CoV-2 antibody profile in COVID-19 patients. *Clin Infect Dis.* 2021; ciab317.
3. Baker KF, Hanrath AT, Schim van der Loeff I, et al. National Early Warning Score 2 (NEWS2) to identify inpatient COVID-19 deterioration: a retrospective analysis. *Clin Med (Lond).* 2021; 21 (2): 84–89.
4. Paul KS Chan, Pak-Leong Lim, Esther YM Liu, et al. Antibody Avidity Maturation during Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. *J Infect Dis.* 2005; 192 (1): 166–9.
5. Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 2251.
6. Long Q, Liu B, Deng H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26 (6): 845–8.
7. Kreer C, Zehner M, Weber T, et al. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients. *Cell.* 2020; 182 (4): 843–54.
8. Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369 (6504): 650–5.
9. Piccoli L, Park Y, Tortorici M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 2020; 183 (4): 1024–42.
10. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021; 591, 639–44.

References

1. Benner SE, Patel EU, Laeyendecker O, et al. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J Infect Dis.* 2020; 222: 1974–84.
2. Tang J, Grubbs G, Lee Y, et al. Impact of convalescent plasma therapy on SARS-CoV-2 antibody profile in COVID-19 patients. *Clin Infect Dis.* 2021; ciab317.
3. Baker KF, Hanrath AT, Schim van der Loeff I, et al. National Early Warning Score 2 (NEWS2) to identify inpatient COVID-19 deterioration: a retrospective analysis. *Clin Med (Lond).* 2021; 21 (2): 84–89.
4. Paul KS Chan, Pak-Leong Lim, Esther YM Liu, et al. Antibody Avidity Maturation during Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. *J Infect Dis.* 2005; 192 (1): 166–9.
5. Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 2251.
6. Long Q, Liu B, Deng H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26 (6): 845–8.
7. Kreer C, Zehner M, Weber T, et al. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients. *Cell.* 2020; 182 (4): 843–54.
8. Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369 (6504): 650–5.
9. Piccoli L, Park Y, Tortorici M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 2020; 183 (4): 1024–42.
10. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021; 591, 639–44.

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ИХ СВЯЗЬ С ТЯЖЕСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ И НЕКОТОРЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Л. Н. Гуменюк, М. В. Голод, Н. В. Силаева, Л. Е. Сорокина[✉], С. С. Ильясов, Н. А. Андрощук, О. Р. Кривошапко, А. М. Велиляев, Л. Н. Асанова

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

Важной составляющей поддержания иммунного гомеостаза в том числе при COVID-19 является микробиота кишечника. Целью работы было изучить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и характер их взаимосвязи с тяжестью заболевания, содержанием IL6, IL10, IL17 и TNF α у пациентов с COVID-19. В одномоментном сравнительном исследовании приняли участие 110 пациентов с COVID-19 (основная группа) и 98 лиц, не инфицированных COVID-19 (контрольная группа). Оценку состава микробиоты кишечника проводили методом шотган-секвенирования. Уровень IL6, IL10, IL17 и TNF α в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Обнаружены статистически значимые изменения в составе кишечной микробиоты у пациентов с COVID-19 в отличие от контрольной группы: снижение численности *B. adolescentis* ($p = 0,048$), *E. rectale* ($p = 0,036$), *F. prausnitzii* ($p = 0,0002$), *B. dorei* ($p < 0,001$) и повышение численности *R. gnavus* ($p = 0,012$), *Cl. hathewayi* ($p = 0,003$), *E. faecium* ($p = 0,0003$). Установлена корреляция численности *B. dorei* с показателем IL6 ($r = 0,49$; $p = 0,034$), численности *F. prausnitzii* и показателей IL10, IL17 ($r = 0,44$; $p = 0,001$ и $r = -0,52$; $p < 0,001$ соответственно). Численность *R. gnavus* коррелировала с показателем TNF α , а численность *E. faecium* — с IL6 ($r = 0,47$; $p = 0,002$) и TNF α ($r = 0,56$; $p = 0,001$). Также выявлена сопряженность численности *B. dorei*, *F. prausnitzii* и *E. faecium* с более высокими баллами по шкале оценки клинического состояния ШОКС-КОВИД ($r = -0,54$; $p = 0,001$, $r = -0,60$; $p < 0,001$ и $r = 0,67$; $p = 0,005$ соответственно). Направленная коррекция кишечной микробиоты может улучшить эффективность лечения COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, микробиота кишечника, цитокиновый статус

Вклад авторов: Л. Н. Гуменюк, Л. Е. Сорокина — существенный вклад в замысел и дизайн исследования; М. В. Голод, Н. В. Силаева, Н. А. Андрощук — сбор, анализ и интерпретация данных; С. С. Ильясов — статистическая обработка данных; О. Р. Кривошапко, А. М. Велиляев, Л. Н. Асанова — подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Крымской медицинской академии им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 11 от 23 ноября 2021 г.), спланировано и проведено в соответствии с Хельсинской декларацией. Все лица, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Лейа Евгеньевна Сорокина
бул. Ленина, 5/7, г. Симферополь, 295006, Республика Крым; leya.sorokina@mail.ru

Статья получена: 18.01.2022 **Статья принята к печати:** 02.02.2022 **Опубликована онлайн:** 19.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.006

GUT MICROBIOTA ALTERATIONS AND THEIR RELATIONSHIP TO THE DISEASE SEVERITY AND SOME CYTOKINE PROFILE INDICATORS IN PATIENTS WITH COVID-19

Gumenyuk LN, Golod MV, Silaeva NV, Sorokina LE[✉], Ilyasov SS, Androschuk NA, Krivoschapko OR, Velilyaev AM, Asanova LN

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

Gut microbiota is an essential element of maintaining the immune homeostasis, including in individuals with COVID-19. The study was aimed to assess taxonomic changes in the gut microbiota and their relationship with the disease severity and the levels of IL6, IL10, IL17, and TNF α in patients with COVID-19. A total of 110 patients with COVID-19 (index group) and 98 individuals with no COVID-19 (control group) were enrolled to the comparative cross-sectional study. The gut microbiota composition was determined by shotgun sequencing. Blood serum levels of IL6, IL10, IL17, and TNF α were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. The following significant changes in the gut microbiota composition were observed in patients with COVID-19 in contrast to controls: decreased abundance of *B. adolescentis* ($p = 0.048$), *E. rectale* ($p = 0.036$), *F. prausnitzii* ($p = 0.0002$), *B. dorei* ($p < 0.001$), and increased abundance of *R. gnavus* ($p = 0.012$), *Cl. hathewayi* ($p = 0.003$), *E. faecium* ($p = 0.0003$). Correlations were established between the abundance of *B. dorei* and the IL6 levels ($r = 0.49$; $p = 0.034$), the abundance of *F. prausnitzii* and the levels of IL10, IL17 ($r = 0.44$; $p = 0.001$ and $r = -0.52$; $p < 0.001$, respectively). The abundance of *R. gnavus* correlated with the TNF α levels, and the abundance of *E. faecium* was related to the levels of IL6 ($r = 0.47$; $p = 0.002$) and TNF α ($r = 0.56$; $p = 0.001$). The relationship between the abundance of *B. dorei*, *F. prausnitzii*, *E. faecium* and the higher SHOKS-COVID clinical assessment scale scores was also revealed ($r = -0.54$; $p = 0.001$, $r = -0.60$; $p < 0.001$ and $r = 0.67$; $p = 0.005$, respectively). Targeted correction of gut microbiota may improve the COVID-19 treatment efficacy.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, gut microbiota, cytokine status

Author contribution: Gumenyuk LN, Sorokina LE — significant contribution to the study concept and design; Golod MV, Silaeva NV, Androschuk NA — data acquisition, analysis, and interpretation; Ilyasov SS — statistical data processing; Krivoschapko OR, Velilyaev AM, Asanova LN — manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University (protocol № 11 dated November 23, 2021), planned and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Leya E. Sorokina
Bulvar Lenina, 5/7, Simferopol, 295006, Republic of Crimea; leya.sorokina@mail.ru

Received: 18.01.2022 **Accepted:** 02.02.2022 **Published online:** 19.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.006

В связи с новой коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 и получившей название COVID-19, Всемирной организацией здравоохранения была объявлена пандемия [1]. Тяжелые формы течения этого заболевания сопровождаются развитием прогрессирующей вирусной пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). В патофизиологии COVID-19 значимую роль

играет нарастающее системное воспаление. С тяжестью заболевания тесно связано избыточное продуцирование цитокинов, вызванное вирусом SARS-CoV-2, известное как «цитокиновый шторм» [2]. У пациентов с COVID-19 обнаруживают высокие уровни интерлейкинов IL1 β , IL1RA, IL6, IL8, IL9, IL10, IL17, С-реактивного белка (CRP), фактора некроза опухоли (TNF α) [3–5].

Накопленные данные в исследованиях *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) тоже восприимчив к инфекции COVID-19. Например, на модели *in vitro*, имитирующей клеточные и пространственные структуры кишечника, была продемонстрирована способность вируса SARS-CoV-2 инфицировать энтероциты [6]. Частота возникновения гастроинтестинальных симптомов у пациентов с COVID-19 достигает 20% [7]. Причина этого в способности SARS-CoV-2 проникать в клетки путем связывания с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), который активно экспрессируется на поверхности энтероцитов подвздошной и толстой кишки, что и приводит к гастроинтестинальным симптомам путем вызванного вирусом иммуноопосредованного повреждения [8]. Кроме того, вирусная РНК SARS-CoV-2 может быть обнаружена в образцах кала спустя более 30 дней после начала заболевания [9]. В данном аспекте в литературе активно обсуждают роль микробиоты кишечника. Как известно, микробиота кишечника является важной составляющей поддержания иммунного гомеостаза. В свою очередь дисбиотические нарушения микробиоты кишечника напрямую связаны с многочисленными воспалительными заболеваниями [10]. Представлены убедительные данные о качественных изменениях микробиоты кишечника у пациентов, инфицированных COVID-19 [11]. В целом, у пациентов с COVID-19 отмечена тенденция к уменьшению видового разнообразия бактерий, истощению полезных комменсалов и обогащению патобионтами [12], однако сведения о видовом составе микробиоты кишечника фрагментарны и противоречивы. Учитывая, что взаимодействия, реализуемые посредством оси «кишечник–легкие», потенциально могут повышать восприимчивость организма хозяина к вирусной инфекции и снижать функциональную активность иммунных клеток, что способствует развитию системного гипервоспаления с синдромом «цитокинового шторма», является актуальным дальнейшее изучение изменений микробиоты кишечника и характера их взаимосвязи с показателями цитокинового статуса у пациентов с COVID-19.

Цель исследования — изучение изменений таксономического состава микробиоты кишечника и характера их взаимосвязи с тяжестью заболевания, IL6, IL10, IL17 и TNF α у пациентов с COVID-19.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Методом сплошной выборки в сравнительное одномоментное исследование было включено 110 пациентов с COVID-19 (женщины — 66 (60,0%), мужчины — 44 (40,0%); средний возраст — $28,6 \pm 8,4$ лет), поступивших на стационарное лечение в больницы, работающие в системе обязательного медицинского страхования г. Симферополя (основная группа, ОГ) и 98 здоровых добровольцев, не инфицированных COVID-19 (женщины — 61 (62,2%), мужчины — 37 (37,8%); средний возраст — $29,2 \pm 7,6$ лет), проходивших ежегодный профилактический медицинский

осмотр на базе медицинского центра «Гемокод» г. Симферополя (контрольная группа, КГ).

Критерии включения пациентов в ОГ: возраст 18–45 лет; подтвержденная COVID-19 на основании положительной полимеразой цепной реакции (ПЦР) на РНК вируса SARS-CoV-2 и/или типичной картины вирусной пневмонии при мультиспиральной компьютерной томографии (КТ); легкое, среднетяжелое и тяжелое течение COVID-19.

Критерии невключения в ОГ: крайне тяжелое течение COVID-19; сахарный диабет I и II типа; ожирение; инфаркт миокарда, тяжелые нарушения ритма сердца, сердечная недостаточность; гипертоническая болезнь, инсульт, транзиторная ишемическая атака в анамнезе; острое нарушение мозгового кровообращения (за предшествующие шесть месяцев до начала исследования); тяжелые или декомпенсированные сопутствующие соматические заболевания, которые могут затруднять участие больного в исследовании и влиять на его результаты; синдром раздраженного кишечника; хронические заболевания ЖКТ, печени; гематологические и онкологические заболевания; психические расстройства, алкоголизм или наркомания в анамнезе; прием антибиотиков, пробиотиков, пребиотиков, противовирусных, симбиотических или кислотоподавляющих препаратов в предшествующие три месяца до начала исследования; прием препаратов, влияющих на стул в предшествующий месяц до начала исследования; отказ от участия в исследовании.

Критерии включения здоровых добровольцев: возраст 18–45 лет; не подтвержденная COVID-19 на основании проведенной ПЦР на РНК вируса SARS-Co; отсутствие хронических заболеваний и аллергических реакций; отсутствие инфекционных и острых заболеваний в течение двух месяцев перед исследованием; отсутствие психических расстройств, алкоголизма или наркомании в анамнезе; отсутствие нарушений стула (запоров/диареи) в предшествующий месяц до начала исследования; не принимавшие антибиотики, пробиотики, пребиотики, противовирусные и симбиотические препараты в предшествующие три месяца до начала исследования; не принимавшие препараты, влияющие на стул в предшествующий месяц до начала исследования.

Критерии невключения здоровых добровольцев: температура тела выше $36,9^{\circ}\text{C}$; отказ от участия в исследовании.

Характеристика пациентов с COVID-19 и здоровых добровольцев представлена в табл. 1. Группы были сопоставимы по полу ($p = 0,96$; χ^2), возрасту ($p = 0,92$; χ^2) и индексу массы тела ($p = 0,054$; χ^2).

Клиническая характеристика пациентов с COVID-19 представлена в табл. 2. Среди пациентов преобладали лица со среднетяжелым течением COVID-19 — 80 ($72,7 \pm 0,68\%$). Наиболее частыми симптомами заболевания были лихорадка — 103 ($94,2\%$) и кашель — 96 ($86,9 \pm 0,61\%$). По данным КТ вирусная пневмония диагностирована у 95 ($67,1 \pm 0,38\%$) пациентов.

Диагноз COVID-19 у всех пациентов был подтвержден с помощью ПЦР на вирус SARS-CoV-2 (материал получен с помощью мазка из носоглотки и ротоглотки) и/или типичной

Таблица 1. Характеристика пациентов с COVID-19 и здоровых добровольцев

Показатель	Основная группа ($n = 110$)	Контрольная группа ($n = 98$)
Женщины / мужчины (n , %)	66 (60,0) / 44 (40,0)	61 (62,2) / 37 (37,8)
Средний возраст, лет ($M \pm CD$)	$28,6 \pm 8,4$	$29,2 \pm 7,6$
Индекс массы тела, $\text{кг}/\text{м}^2$ ($M \pm CD$)	$23,4 \pm 4,2$	$23,7 \pm 3,6$

Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов с COVID-19

Показатель	Основная группа (n = 110)
Легкое течение (n, %)	7 (6,3)
Среднетяжелое течение (n, %)	80 (72,7)
Тяжелое течение (n, %)	23 (21,0)
Лихорадка	103 (94,2)
Боль в горле	68 (61,8)
Кашель	96 (86,9)
Одышка	63 (56,9)
Тошнота	37 (33,6)
Диарея	24 (22,1)
Температура, медиана [25%; 75%]	37,8 [36,7; 37,9]
ЧДД в 1 мин, медиана [25%; 75%]	20,0 [17,0; 22,0]
ЧСС, уд./мин (m ± SD)	89,9 ± 16,1
САД, мм. рт. ст., медиана [25%; 75%]	120 [120; 132]
SO ₂ , %, медиана [25%; 75%]	96,0 [94,0; 98,0]
Оценка тяжести состояния по шкале ШОКС-КОВИД, баллы, Me [25%; 75%]	3,4 [1,6; 6,1]
Стадия по КТ– 0 (n, %)	25 (22,6)
Стадия по КТ КТ–1 (n, %)	41 (37,4)
Стадия по КТ КТ–2 (n, %)	32 (29,1)
Стадия по КТ КТ–3 (n, %)	12 (10,9)

Примечание: ЧДД — частота дыхательных движений, ЧСС — частота сердечных сокращений, САД — систолическое артериальное давление, SO₂ — сатурация кислорода, КТ — компьютерная томография

картины вирусной пневмонии при мультиспиральной КТ. Диагностику и степень тяжести COVID-19, распространенность пневмонии по результатам КТ оценивали согласно Временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) Минздрава РФ 6–9-й версий.

С целью объективизации тяжести клинического состояния мы использовали оригинальную шкалу оценки клинического состояния больных с коронавирусной инфекцией (ШОКС-КОВИД) [13].

Для анализа таксономического состава микробиоты кишечника у пациентов в первый день госпитализации (в утреннее время с 8.00 до 10.00) были взяты образцы кала, которые замораживали и хранили в одноразовых пластиковых контейнерах при температуре –80 °C до проведения метагеномного анализа. Выделение тотальной ДНК проводили методом фенольной экстракции. Нуклеотидная последовательность выделенной ДНК была установлена методом шотган-секвенирования с использованием высокопроизводительного секвенатора SOLiD5500 Wildfire (AppliedBiosystems; США) [14].

Фильтрацию прочтений по качеству и их таксономическую классификацию проводили с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 [15]. Для определения таксономической принадлежности прочтений применяли подход, включающий в себя использование двух таксономических баз данных. На первом этапе осуществляли подбор референсного набора операционных таксономических единиц (OTE) бактерий на основании сравнения полученных прочтений генов 16S rRNA с базой данных GreenGenes версии 13.5 [16]. На втором этапе с использованием алгоритма RDP определение таксономической принадлежности данных OTE проводили на основе специализированной базы данных кишечной микробиоты человека HITdb [17].

Изучение качественного и количественного состава микробиоты кишечника осуществляли на основании

определения видов, родов и фил микроорганизмов. Оценку α -разнообразия сообщества путем расчета индекса Chao1, показателя числа обнаруженных таксонов (Sobs), показателя, оценивающего реальное количество таксонов (ACE), проводили с помощью программы Mothur v.1.22.0 (<http://www.mothur.org>).

В качестве маркеров цитокинового профиля нами выбраны IL6, IL10, IL17 и TNF α , что обусловлено их значимой ролью в патогенезе «цитокинового шторма» и ОРДС [3–5].

Забор крови из периферической вены выполняли в первый день госпитализации натощак в утренние часы (7.00–9.00) в состоянии покоя (не менее 15 мин). Пробирки с сывороткой крови хранили в замороженном состоянии при температуре –20 °C. Уровень IL6, IL10, IL17 и TNF α в сыворотке крови изучали с помощью тест-системы твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (Вектор-Бест; Новосибирск, Россия) на автоматическом ИФА-анализаторе «Elisys Quattro» (Human GmbH; Германия).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc.; США). При нормальном распределении показателей определяли среднее значение и стандартное отклонение, при распределении, отличном от нормального, — медиану, 25-й и 75-й проценти. Нормальность распределения проверяли при помощи распределения Гаусса. Для качественных признаков определяли долю и абсолютное число значений. Сравнительный анализ для нормально распределенных количественных признаков проводили с помощью параметрического t -критерия Стьюдента, при распределении, отличном от нормального, — с помощью U -критерия Манна–Уитни, для количественных признаков — с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат). Для оценки взаимосвязи признаков рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Применяли также

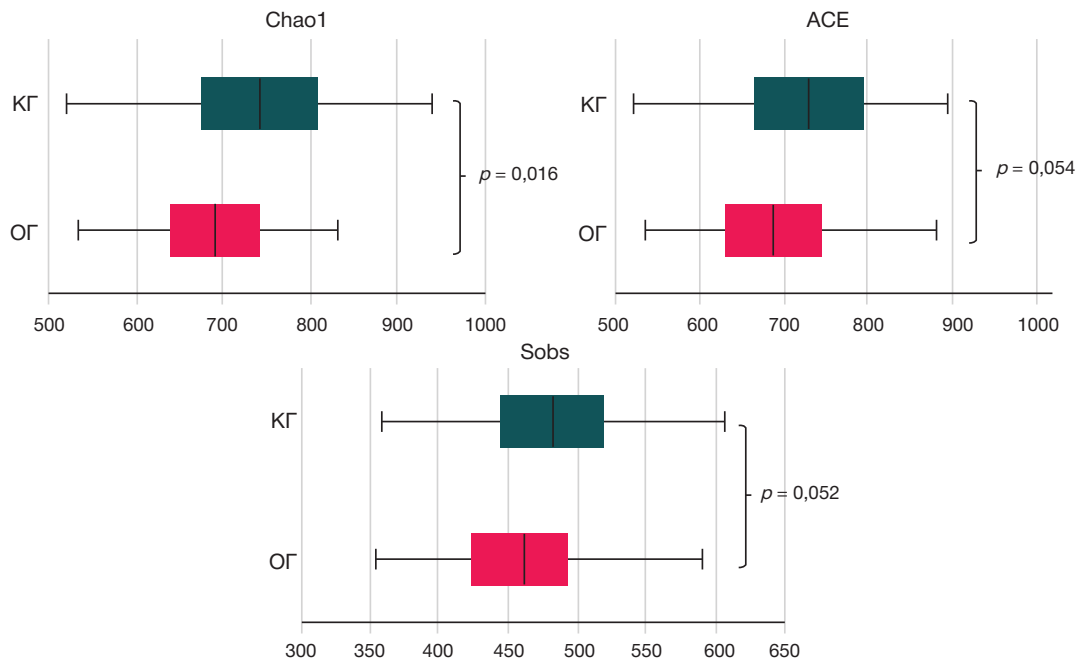


Рис. 1. Сравнительный анализ филогенетического состава микробиоты кишечника пациентов с COVID-19 и здоровых добровольцев. О — основная группа, КГ — контрольная группа

корреляционный анализ и множественную ранговую корреляцию, достоверность корреляционных связей проверяли при помощи таблиц сопряженности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изучении таксономического состава микробиоты кишечника у пациентов с COVID-19 по сравнению с лицами КГ обнаружено статистически значимое снижение α -разнообразия бактериального сообщества (индекс Chao1; $p = 0,016$). Индексы ACE и Sobs в группе пациентов с COVID-19 по сравнению с КГ также были несколько

снижены, при этом статистически значимых различий не найдено ($p = 0,054$; $p = 0,052$ соответственно) (рис. 1).

При сравнении видового состава кишечной микробиоты в группах обследованных у пациентов с COVID-19 по сравнению с КГ установлено статистически значимое снижение численности *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005-A ($p = 0,048$), *Eubacterium rectale* ATCC 33656 ($p = 0,036$), *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 ($p = 0,0002$), *Bacterioides dorei* DSM 17855 ($p = 0,001$) и выявлено повышение численности *Ruminococcus gnavus* ATCC 29149 ($p = 0,012$), *Clostridium hathewayi* DSM-13479 ($p = 0,003$) и *Enterococcus faecium* W54 ($p = 0,0003$) (рис. 2).

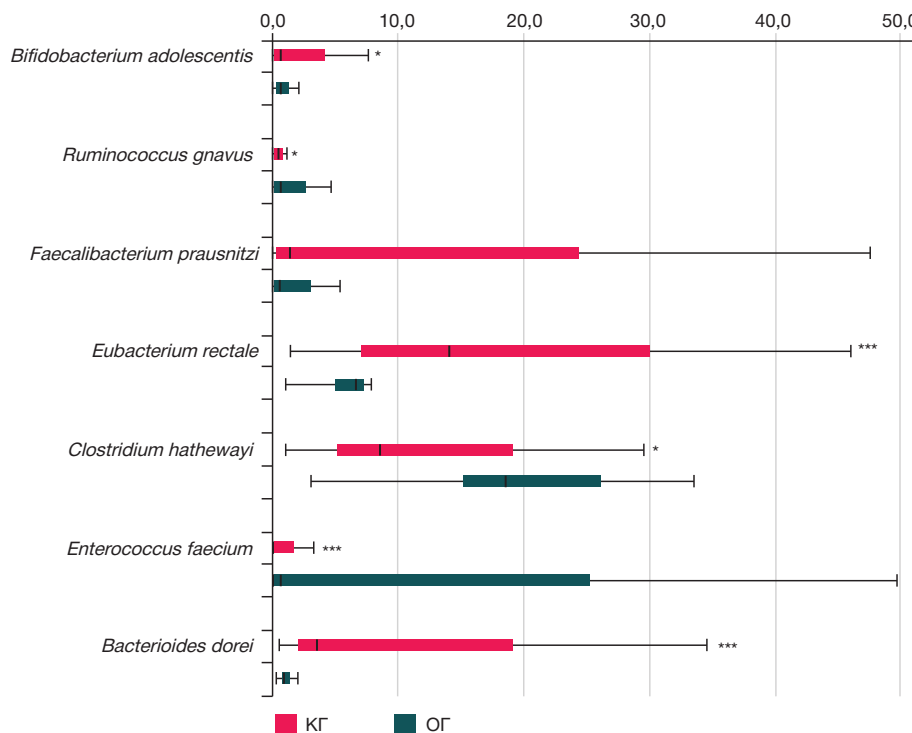


Рис. 2. Сравнительный анализ родового состава микробиоты кишечника у лиц с COVID-19 и здоровых добровольцев. ОГ — основная группа, КГ — контрольная группа

Таблица 3. Сравнительный анализ цитокинового профиля у пациентов с COVID-19 и здоровых добровольцев ($m \pm CD$)

Показатель	Основная группа $n = 110$	Контрольная группа $n = 98$	p
IL6, пг/мл	$10,5 \pm 6,6$	$3,8 \pm 1,8$	$p = 0,036$
IL10, пг /мл	$9,3 \pm 5,4$	$2,9 \pm 1,1$	$p = 0,021$
IL17, пг /мл	$4,9 \pm 2,2$	$2,4 \pm 1,1$	$p = 0,046$
TNF α , пг /мл	$17,9 \pm 8,6$	$5,2 \pm 2,4$	$p = 0,012$

Показатели IL6, IL10, IL17 и TNF α в сыворотке крови у пациентов с COVID-19 по сравнению с показателями КГ статистически значимо выше (табл. 3).

В ходе уточнения взаимосвязи изменений микробиоты кишечника с некоторыми показателями цитокинового профиля у пациентов с COVID-19 получены статистически значимые корреляционные связи численности бактерий *B. dorei* с показателем IL6 ($r = -0,49$; $p = 0,034$), численности бактерий *F. prausnitzii* и показателей IL10, IL17 ($r = -0,44$; $p = 0,001$ и $r = -0,52$; $p < 0,001$ соответственно). Численность бактерий *R. gnavus* коррелировала с показателем TNF α ($r = 0,51$; $p = 0,036$), а численность *E. faecium* — с IL6 ($r = 0,47$; $p = 0,002$) и TNF α ($r = 0,56$; $p = 0,001$). В ходе корреляционного анализа выявлена также сопряженность численности бактерий *B. dorei*, *F. prausnitzii* и *E. faecium* с более высокими баллами по ШОКС-КОВИД ($r = -0,54$ и $p = 0,001$; $r = -0,60$ и $p < 0,001$; $r = 0,67$ и $p = 0,005$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ряде ранее выполненных работ сообщается об изменении состава микробиоты кишечника у пациентов с COVID-19 [7, 11, 12]. Результаты настоящего исследования тоже показали, что состав микробиоты кишечника у пациентов с COVID-19 значительно отличается от такового у лиц, не инфицированных COVID-19. По нашим данным, у пациентов с COVID-19 по сравнению с лицами, не инфицированными COVID-19, более низкое бактериальное α -разнообразие, что подтверждается статистически более низким индексом Chao1 и согласуется с результатами ранее выполненных исследований [11]. У пациентов с COVID-19 дисбиотические изменения кишечника характеризовались снижением численности бактерий с иммуномодулирующим потенциалом — представителей типа *B. adolescentis*, *E. rectale*, *F. prausnitzii*, *B. dorei*, которые, как известно, являются основными продуцентами бутирата (мощного противовоспалительного метаболита). В то же время мы обнаружили повышенную численность потенциальных патобионтов — бактерий *R. gnavus*, *Cl. hathewayi* и *E. faecium*. Среди них стоит отметить наличие *E. faecium*, которые ранее были обнаружены в образцах фекалий пациентов с COVID-19 итальянскими исследователями [18]. Высокое содержание *E. faecium* в микробиоте кишечника у пациентов в критическом состоянии может иметь клиническое значение, в связи с ее патогенным потенциалом, резистентностью ко многим широко используемым противомикробным препаратам и способностью к стремительному приобретению генетического материала или изменению генной экспрессии, позволяющей ей приобретать детерминанты устойчивости практически ко всем антибактериальным средствам [19, 20]. Независимо от штамма рода *Enterococcus*, кишечная микробиота у пациентов с COVID-19 способна, таким образом, действовать как резервуар условно-патогенных микроорганизмов, потенциально устойчивых к антибиотикам, с возможностью

миграции через поврежденные эпителиальные барьеры в системный кровоток, как уже было продемонстрировано в контексте других заболеваний [20]. Полученные нами результаты частично соотносятся с данными ряда других ранее выполненных работ. Например, в одной из работ, для пациентов с COVID-19 были характерны снижение численности *B. dorei* и повышение численности *E. faecium* [18]. В другом исследовании для пациентов с COVID-19 были характерны снижение численности *B. adolescentis*, *E. rectale*, *F. prausnitzii* и повышение численности бактерий *R. gnavus* [21]. Контрастирование полученных данных может быть обусловлено тем, что наблюдения выполняли в различных географических регионах и использовали различные критерии включения в исследование. Группы значительно различались по возрасту: $28,6 \pm 8,4$ года в нашем исследовании против $73,0$ [59,0; 85,0] в ранее описанном [18] и $36,4 \pm 18,7$ года — в исследовании [21]. Кроме того, в отличие от вышеуказанных авторов мы не включали в наблюдение пациентов, имеющих коморбидные соматические заболевания и принимающих антибактериальные и/или противовирусные препараты с целью нивелирования их влияния на результаты исследования.

Несмотря на то что некоторые идентифицированные нами бактерии могут быть общими для ряда других заболеваний, как кишечных, так и системных, установленная в нашей работе сопряженность сниженного содержания бактерий *B. dorei*, *F. prausnitzii* и повышенного содержания бактерий *E. faecium* с более высокими баллами по ШОКС-КОВИД позволяет предположить, что изменения численности этих бактерий могут быть характерными для данной когорты пациентов с COVID-19. Обнаруженные ассоциации мы сопоставили с результатами ранее выполненных исследований. Так, у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии, наблюдалось истощение представителей рода *Bacteroides* [18]. Интересно, что в другой работе [7] представленность *B. dorei* обратно коррелировала с фекальной нагрузкой SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19. Авторы отметили, что с учетом ассоциированности этой бактерии с пониженной экспрессией рецепторов АПФ2 в ободочной кишке мышей, *B. dorei* может быть потенциально протективной в отношении вируса SARS-CoV-2. Представлены данные об обратной корреляции бактерий *F. prausnitzii*, известной своими противовоспалительными эффектами, и степенью тяжести инфекции COVID-19 [7]. В то же время у пациентов с COVID-19 из отделения интенсивной терапии по сравнению с пациентами из отделения общей терапии отмечена более высокая численность штаммов рода *Enterococcus* ($p = 0,0001$) [18]. Можно предположить, что терапевтическое повышение численности *B. dorei*, *F. prausnitzii* и снижение численности *E. faecium* эффективны в отношении смягчения тяжести заболевания, однако для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных исследований с соответствующим дизайном. Ряд авторов отмечает, что пробиотические и/или пребиотические препараты могут быть использованы

в качестве потенциального (дополнительного) вектора терапии COVID-19 с целью снижения тяжести инфекции и минимизации риска вторичных бактериальных осложнений [22, 23].

В ряде исследований доказано влияние микробиоты кишечника на восприимчивость к инфекционным и неинфекционным заболеваниям [24]. Отмечено, что иммуномодулирующее действие кишечной микрофлоры реализуется посредством активации генов ряда цитокинов в иммунных и эпителиальных клетках, что определяет гетерогенность их иммуномодулирующих свойств [25]. Сообщалось, что как для доминантных микросимбионтов, так и для ассоциантов характерна гетерогенность в проявлении иммунорегуляторных эффектов [26]. Так, суммарные эффекты воздействия представителей нормофлоры на секрецию цитокинов иммунными клетками человека в условиях эубиоза обеспечивают цитокиновый баланс, характеризующийся умеренным уровнем провоспалительных цитокинов (IL6, TNF α) и контролируемый супрессивным воздействием антифлогенных цитокинов. В условиях нарастания антигенной нагрузки при дисбиозе через активацию toll-like-рецепторов усиливается продукция целого спектра провоспалительных цитокинов, которые способствуют развитию как локального воспаления, так и эффекторных иммунных реакций в лимфоидных образованиях кишечника, защищающих организм от патогенов [27].

Как указывалось ранее, при инфекции COVID-19 содержание цитокинов IL6, IL10, IL17 и TNF α повышается [4]. В настоящем исследовании у пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми добровольцами также установлены статистически значимые различия в уровне IL6, IL10, IL17 и TNF β .

Предполагается, что тяжесть COVID-19 является следствием «цитокинового шторма» [4]. Примечательно, что некоторые из вышеперечисленных цитокинов коррелируют с паттерном микробиоты кишечника, специфический профиль которой способен инициировать «цитокиновый шторм». В настоящем исследовании у пациентов с COVID-19 установлена корреляция между численностью бактерий *B. dorei* и уровнем IL6.

Выявлена сопряженность численности бактерий *F. prausnitzii* и показателей IL10, что может быть опосредовано снижением секреции метаболитов, блокирующих активацию транскрипционного фактора NF-kB и продуцирование IL8. Например, в исследовании *in vivo* показано, что активация мононуклеарных клеток периферической крови посредством *F. prausnitzii* вызывала значительное снижение секреции IL12 и TNF α и увеличение секреции IL10 [28]. Кроме того, численность бактерий *F. prausnitzii* обратно коррелировала с уровнем IL17. В ходе анализа литературных данных мы не встретили работ, посвященных изучению связи между микробиотой

кишечника и IL17 у пациентов с COVID-19. Вместе с тем, показано, что *F. prausnitzii* подавляет продукцию IL17 у крыс [29]. На модели экспериментального колита было продемонстрировано, что бактерии *F. prausnitzii*, проявляя свой противовоспалительный эффект за счет продукции бутирата, поддерживающего баланс между противовоспалительными Т-хелперными клетками 17 типа (Th17) и иммунорегуляторными (T_{reg}) Т-клетками посредством ингибирования гистондеацетилазы 1. В свою очередь, нарушение баланса между Th17 и T_{reg} способствует развитию аутоиммунного воспаления [30].

Нами также выявлена сопряженность численности бактерий *Ruminococcus gnavus* и показателей TNF α . Эти данные согласуются с результатами ранее опубликованной работы [31], в которой установлено, что более высокое содержание бактерий *R. gnavus* у пациентов с COVID-19 коррелирует с всплеском провоспалительных цитокинов IFN γ и TNF α , что обуславливает цитокиновый шторм и активацию Т-хелперных клеток 1-го типа.

Мы обнаружили, что численность бактерий *E. faecium* коррелировала с уровнем IL6 и TNF α . В литературе нами были найдены подобные корреляции у пациентов с язвенным колитом [32] и у пациентов со СПИДОМ/ВИЧ [33].

Таким образом, в условиях кишечного дисбиоза на фоне COVID-19 у представителей нормофлоры ограничивается направленность иммунорегуляторных эффектов на противовоспалительные цитокины, что способствует нарушению гомеостаза и развитию воспалительных и аутоиммунных реакций.

ВЫВОДЫ

У пациентов с COVID-19 установлена сопряженность сниженного содержания бактерий *B. dorei*, *F. prausnitzii* и повышенного содержания бактерий *E. faecium* с более высокими баллами по ШОКС-КОВИД, что свидетельствует о патогномичности данных таксономических изменений микрофлоры кишечника для лиц, инфицированных SARS-CoV-2. У пациентов с SARS-CoV-2-инфекцией обнаружены статистически значимые корреляционные связи численности кишечных бактерий *B. dorei*, *F. prausnitzii*, *R. gnavus*, *E. faecium* с показателем IL6, IL10, IL17, TNF α , что подтверждает способность микробиоты кишечника участвовать в системных воспалительных реакциях и поддерживать толерантность иммунного ответа при COVID-19. Полученные данные в совокупности с имеющимися в мировой литературе указывают на значимую роль микробиоты в патогенезе COVID-19. Более системное и детальное исследование в этом направлении позволит разработать новые подходы, препараты селективных пробиотиков для коррекции микробиоты при протекании COVID-19 и лечении постковидных последствий.

Литература

1. Statement on the second meeting of the International Health Regulations Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). World Health Organization (WHO), 2020. Available from: [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)) (assessed Dec 15, 2021).
2. Tao W, Zhang G, Wang X, et al. Analysis of the intestinal microbiota in COVID-19 patients and its correlation with the inflammatory factor IL18. *Med Microecol.* 2020; 5: 100023. DOI:10.1016/j.medmic.2020.100023.
3. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20 (6): 363–74. DOI: 10.1038/s41577-020-0311-8.

4. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020; 54: 62–75. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.06.001.
5. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395: 1054–62. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
6. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020; 369 (6499): 50–54. DOI: 10.1126/science.abc1669.
7. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology.* 2020; 159 (3): 944–55.e8. DOI:10.1053/j.gastro.2020.05.048.
8. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; 382 (18): 1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
9. Chan KH, Poon LL, Cheng VC, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10 (2): 294–9. DOI: 10.3201/eid1002.030610.
10. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes.* 2012; 3 (1): 4–14. DOI: 10.4161/gmic.19320.
11. Gu S, Chen Y, Wu Z, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis.* 2020; 71 (10): 2669–78. DOI: 10.1093/cid/ciaa709.
12. Zuo T, Liu Q, Zhang F, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut.* 2021; 70 (2): 276–84. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322294.
13. Мареев В. Ю., Беграмбекова Ю. Л., Мареев Ю. В. Как оценивать результаты лечения больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)? Шкала Оценки Клинического Состояния (ШОКС–КОВИД). *Кардиология.* 2020; 60 (11): 35–41.
14. Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics.* 2013; 14 (5): 16.
15. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010; 7 (5): 335–6. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
16. DeSantis, TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5069–72.
17. Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics.* 2015; 16 (1): 1056. DOI: 10.1186/s12864-015-2265-y.
18. Gaibani P, D'Amico F, Bartoletti M, et al. The Gut Microbiota of Critically Ill Patients With COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 670424. DOI: 10.3389/fcimb.2021.670424.
19. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
20. Tamburini FB, Andermann TM, Tkachenko E, Senchyna F, Banaei N, Bhatt AS. Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome. *Nat Med.* 2018; 24 (12): 1809–14. DOI: 10.1038/s41591-018-0202-8.
21. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut.* 2021; 70 (4): 698–06. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323020.
22. Danilenko VN, Devyatkin AV, Marsova MV, et al. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: the role of microbiome, probiotics and postbiotics in their prevention. *Journal of Inflammation Research.* 2021; 14, 6349–81. DOI: 10.2147/JIR.S333887.
23. Poluektova E, Yunes R, Danilenko V. The Putative Antidepressant Mechanisms of Probiotic Bacteria: Relevant Genes and Proteins. *Nutrients.* 2021; 13 (5): 1591. DOI: 10.3390/nu13051591.
24. West CE, Renz H, Jenmalm MC, et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135 (1): 3–14. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.012.
25. Sun Z, Song ZG, Liu C, et al. Gut microbiome alterations and gut barrier dysfunction are associated with host immune homeostasis in COVID-19 patients. *BMC Med.* 2022; 24: 20. DOI: 10.1186/s12916-021-02212-0.
26. Бухарин О. В., Чайникова И. Н., Иванова Е. В. и др. Иммунорегуляторный профиль микросимбионтов кишечного биотопа человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 4: 42–51.
27. Hursitoglu M, Isiksacan N, Erismis B, et al. In-vitro cytokine production and nasopharyngeal microbiota composition in the early stage of COVID-19 infection. *Cytokine.* 2022; 149: 155757. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155757.
28. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105 (43): 16731–6. DOI: 10.1073/pnas.0804812105.
29. Zhang M, Qiu X, Zhang H, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e109146. DOI: 10.1371/journal.pone.0109146.
30. Zhou L, Zhang M, Wang Y, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflamm Bowel Dis.* 2018; 24 (9): 1926–40. DOI: 10.1093/ibd/izy182.
31. van der Lelie D, Taghavi S. COVID-19 and the Gut Microbiome: More than a Gut Feeling. *mSystems.* 2020; 5 (4): e00453-20. DOI: 10.1128/mSystems.00453-20.
32. Li L, Zhong Q. Correlation of intestinal microflora with cytokines and Toll-like receptors expression in patients with ulcerative colitis. *Infect Dis Inf.* 2017; 30 (6): 361–4. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2017.06.012.
33. Lu J, Ma SS, Zhang WY, Duan JP. Changes in peripheral blood inflammatory factors (TNF α and IL6) and intestinal flora in AIDS and HIV-positive individuals. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2019; 20 (10): 793–802. DOI: 10.1631/jzus.B1900075.

References

1. Statement on the second meeting of the International Health Regulations Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). World Health Organization (WHO), 2020. Available from: [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)) (assessed Dec 15, 2021).
2. Tao W, Zhang G, Wang X, et al. Analysis of the intestinal microbiota in COVID-19 patients and its correlation with the inflammatory factor IL18. *Med Microecol.* 2020; 5: 100023. DOI:10.1016/j.medmic.2020.100023.
3. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20 (6): 363–74. DOI: 10.1038/s41577-020-0311-8.
4. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020; 54: 62–75. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.06.001.
5. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395: 1054–62. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
6. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020; 369 (6499): 50–54. DOI: 10.1126/science.abc1669.
7. Zuo T, Zhang F, Lui GCY, et al. Alterations in Gut Microbiota

- of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*. 2020; 159 (3): 944–55.e8. DOI:10.1053/j.gastro.2020.05.048.
8. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; 382 (18): 1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
 9. Chan KH, Poon LL, Cheng VC, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10 (2): 294–9. DOI: 10.3201/eid1002.030610.
 10. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012; 3 (1): 4–14. DOI: 10.4161/gmic.19320.
 11. Gu S, Chen Y, Wu Z, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis*. 2020; 71 (10): 2669–78. DOI: 10.1093/cid/ciaa709.
 12. Zuo T, Liu Q, Zhang F, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*. 2021; 70 (2): 276–84. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322294.
 13. Mareev VYu, Begrambekova YuL, Mareev YuV. Kak ocenivat' rezul'taty lecheniya bol'nyh s novoy koronavirusnoj infekciej (COVID-19)? Shkala Ocenki Klinicheskogo Sostojaniya (ShOKS-KOVID). *Kardiologija*. 2020; 60 (11): 35–41. Russian.
 14. Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
 15. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335–6. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
 16. DeSantis, TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 5069–72.
 17. Ritar J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056. DOI: 10.1186/s12864-015-2265-y.
 18. Gaibani P, D'Amico F, Bartoletti M, et al. The Gut Microbiota of Critically Ill Patients With COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 670424. DOI: 10.3389/fcimb.2021.670424.
 19. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
 20. Tamburini FB, Andermann TM, Tkachenko E, Senchyna F, Banaei N, Bhatt AS. Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome. *Nat Med*. 2018; 24 (12): 1809–14. DOI: 10.1038/s41591-018-0202-8.
 21. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 2021; 70 (4): 698–06. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323020.
 22. Danilenko VN, Devyatkin AV, Marsova MV, et al. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: the role of microbiome, probiotics and postbiotics in their prevention. *Journal of Inflammation Research*. 2021; 14: 6349–81. DOI: 10.2147/JIR.S333887.
 23. Poluektova E, Yunes R, Danilenko V. The Putative Antidepressant Mechanisms of Probiotic Bacteria: Relevant Genes and Proteins. *Nutrients*. 2021; 13 (5): 1591. DOI: 10.3390/nu13051591.
 24. West CE, Renz H, Jenmalm MC, et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135 (1): 3–14. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.012.
 25. Sun Z, Song ZG, Liu C, et al. Gut microbiome alterations and gut barrier dysfunction are associated with host immune homeostasis in COVID-19 patients. *BMC Med*. 2022; 24: 20. DOI: 10.1186/s12916-021-02212-0.
 26. Buharin OV, Chajnikova IN, Ivanova EV, i dr. Immunoregulyatornyj profil' mikrosimbiontov kishchnogo biotopa cheloveka. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*. 2018; 4: 42–51. Russian.
 27. Hursitoglu M, Isiksacan N, Erismis B, et al. In-vitro cytokine production and nasopharyngeal microbiota composition in the early stage of COVID-19 infection. *Cytokine*. 2022; 149: 155757. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155757.
 28. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105 (43): 16731–6. DOI: 10.1073/pnas.0804812105.
 29. Zhang M, Qiu X, Zhang H, et al. Faecalibacterium prausnitzii inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e109146. DOI: 10.1371/journal.pone.0109146.
 30. Zhou L, Zhang M, Wang Y, et al. Faecalibacterium prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflamm Bowel Dis*. 2018; 24 (9): 1926–40. DOI: 10.1093/ibd/izy182.
 31. van der Lelie D, Taghavi S. COVID-19 and the Gut Microbiome: More than a Gut Feeling. *mSystems*. 2020; 5 (4): e00453-20. DOI: 10.1128/mSystems.00453-20.
 32. Li L, Zhong Q. Correlation of intestinal microflora with cytokines and Toll-like receptors expression in patients with ulcerative colitis. *Infect Dis Inf*. 2017; 30 (6): 361–4. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2017.06.012.
 33. Lu J, Ma SS, Zhang WY, Duan JP. Changes in peripheral blood inflammatory factors (TNF α and IL6) and intestinal flora in AIDS and HIV-positive individuals. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2019; 20 (10): 793–802. DOI: 10.1631/jzus.B1900075.

МЕРОПЕНЕМ-ИНДУЦИРОВАННОЕ СНИЖЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КОЛИСТИНУ У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853

Т. А. Савинова ✉, Ю. А. Бочарова, А. В. Чаплин, Д. О. Коростин, О. В. Шамина, Н. А. Маянский, И. В. Чеботарь

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

Нечувствительные к антибиотикам штаммы *Pseudomonas aeruginosa* представляют собой глобальную проблему в здравоохранении. Исследование механизмов возникновения резистентности лежит в основе разработки способов борьбы с *P. aeruginosa*. Целью работы было исследовать возникновение кросс-резистентности у *P. aeruginosa* в процессе адаптации к популярному антибиотику меропенему. Объектами исследования были образцы *P. aeruginosa*, полученные при росте референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 на среде с возрастающей концентрацией меропенема. Чувствительность изолятов к карбапенемам и колистину определяли при помощи разведения в агаре, чувствительность к колистину оценивали методом серийных разведений. Было получено 93 изолята *P. aeruginosa*, два из которых имели сниженную чувствительность одновременно к карбапенемам (меропенем, имипенем) и колистину. Геномы изолятов секвенировали на полногеномном секвенаторе MGISEQ-2000; обнаружены миссенс-мутации в генах *oprD* и *mexD* и нонсенс-мутация в *phoQ*. Полученные результаты показывают, что при воздействии меропенема на штаммы *P. aeruginosa* может развиваться кросс-резистентность к колистину — препарату резерва для лечения синегнойной инфекции.

Ключевые слова: антибиотики, резистентность, *Pseudomonas aeruginosa*, меропенем, колистин

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Благодарности: авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ за консультации по методической части исследования.

Вклад авторов: Т. А. Савинова — формальный анализ данных секвенирования, подготовка рукописи; Ю. А. Бочарова — методология, формальный анализ; А. В. Чаплин — формальный анализ данных секвенирования; Д. О. Коростин — методология, валидация данных; О. В. Шамина — методология; Н. А. Маянский, И. В. Чеботарь — концептуализация, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Александровна Савинова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; tania.savina@gmail.com

Статья получена: 27.12.2021 **Статья принята к печати:** 10.01.2022 **Опубликована онлайн:** 19.01.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.001

MEROPENEM-INDUCED REDUCTION IN COLISTIN SUSCEPTIBILITY IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAIN ATCC 27853

Savinova TA ✉, Bocharova YuA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayansky NA, Chebotar IV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Antibiotic-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* are a global threat to public health. The knowledge of mechanisms underlying antibiotic resistance is essential to counter *P. aeruginosa* infections. This study describes the phenomenon of meropenem-induced cross-resistance to colistin in the ATCC 27853 strain of *P. aeruginosa*. The study was conducted in the specimens of *P. aeruginosa* grown from the reference ATCC 27853 strain in the medium containing meropenem gradients. Susceptibility of the isolates to carbapenems and colistin was assessed using the agar dilution method; susceptibility to colistin was assessed using the broth microdilution method. A total of 93 *P. Aeruginosa* isolates were analyzed; of them two demonstrated reduced susceptibility to carbapenems (meropenem, imipenem) and colistin. Whole-genome sequencing of the isolates was performed on a MGISEQ-2000 platform. Missense mutations in the *oprD* and *mexD* genes and a nonsense mutation in the *phoQ* gene were detected. We conclude that exposure of *P. aeruginosa* to meropenem can lead to cross-resistance to colistin, a last resort drug for *P. aeruginosa* infections.

Keywords: antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, meropenem, colistin

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Project 20-15-00235).

Acknowledgements: the authors thank the Center of Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of Pirogov Russian National Research Medical University for their advice on the methodology of the study.

Author contribution: Savinova TA — formal analysis of sequencing data, manuscript preparation; Bocharova YuA — methodology, formal analysis; Chaplin AV — formal analysis of sequencing data; Korostin DO — methodology, data validation; Shamina OV — methodology; Mayansky NA, Chebotar IV — concept; manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Savinova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; tania.savina@gmail.com

Received: 27.12.2021 **Accepted:** 10.01.2022 **Published online:** 19.01.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.001

Pseudomonas aeruginosa является одним из важнейших оппортунистических патогенов, который наносит человечеству серьезный урон в медицинской и экономической сферах [1]. Особенно опасны устойчивые к карбапенемам штаммы *P. aeruginosa*, которые эксперты ВОЗ расценивают как критически опасные патогены [2]. В связи с этим исследование механизмов возникновения карбапенем-резистентности является актуальной задачей современной медицинской микробиологии. При исследовании молекулярно-генетической базы карбапенемрезистентности чаще

уделяют внимание β-лактамазным механизмам, которые детерминируются плазмидными генами и могут передаваться горизонтальным путем. Однако существует и мутационная изменчивость, затрагивающая гены кор-генома *P. aeruginosa* и приводящая к развитию карбапенем-резистентности достаточно высокого уровня [3]. Изучение мутаций, индуцирующих карбапенем-резистентность, проводят в двух направлениях. Первый подход направлен на исследование изолятов с признаками сформировавшейся резистентности, полученных из

клинических, сельскохозяйственных источников или из окружающей среды. Второе направление основано на моделировании эволюции резистентности в условиях *in vitro*. Обычно резистентность воспроизводят путем культивирования бактерий в повышающихся концентрациях антибиотика. Разработан весьма удачный способ исследования мутационной резистентности [4]. Его авторы предложили пространственно-временную модель, которая обеспечивала движение *Escherichia coli* в градиенте повышения концентраций триметоприма или ципрофлоксацина и позволяла изолировать множество клональных вариантов бактерии с целью изучения их мутационной изменчивости. Однако в геномах новых клонов *E. coli* обнаружены мутации, которые не направлены на повышение устойчивости к триметоприму либо ципрофлоксацину [4]. Нас заинтересовал актуальный вопрос о направленности последствий подобных мутаций. В частности, практически значимой является возможность мутаций, возникающих под воздействием какого-либо антибиотика, индуцировать резистентность к другим антибиотикам (феномен кросс-резистентности) [5, 6]. Целью работы было исследование возникновения кросс-резистентности у *P. aeruginosa* в процессе адаптации к популярному антибиотику меропенему.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериологические исследования

Исследование проводили на основе пространственно-временной модели формирования резистентности подвижных бактерий к антибиотикам [4]. Референтный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 предварительно культивировали (24 ч при 37 °C) на чашке Петри с полужидким агаром Лурее–Бертани (содержание агарозы — 0,28%), спустя сутки выполняли пересев на другую чашку Петри с полужидким агаром Лурее–Бертани, забирая материал с края распространившейся колонии. Процедуру выполняли трижды. Затем при помощи бактериальной петли (10 мкл) уколom в верхний слой полужидкого агара выполняли пересев бактерий на верхний слой (полужидкий агар) питательной среды в устройстве, схема которого представлена на рисунке. Среда в устройстве имела «сэндвич»-структуру. Нижний слой был изготовлен из бульона Лурее–Бертани (LB Miller, Becton Dickinson, США), содержащего 1,6% агарозы, 30 мкг/мл канамицина сульфата, 100 мкг/мл циклогексимида и меропенем в расчетной концентрации (см. рис.). Оптимальная толщина нижнего слоя составляла 3/5 от общей толщины «сэндвич»-среды (примерно 2,0 см). Нижний слой разливался в пять изолированных отсеков, в каждом из отсеков содержалась среда с разными концентрациями меропенема. Средний слой (1/5 от общей толщины «сэндвич»-среды) был изготовлен из бульона Лурее–Бертани (модификация Миллер), содержащего 2,0% агарозы, 30 мкг/мл канамицина сульфата, 100 мкг/мл циклогексимида с добавлением туши (4,0 мл на 1 л среды) для контрастирования бактериальных колоний при фотофиксации их роста; он наслаивался поверх отсеков нижнего слоя и был сплошным. Верхний слой (1/5 общей толщины среды) представлял собой полужидкий агар (бульон Лурее–Бертани в модификации Миллер, содержащий 0,3% агарозы, 30 мкг/мл канамицина сульфата, 100 мкг/мл циклогексимида).

Инкубацию проводили при 37 °C в течение 216 ч в аэробных условиях. Каждые 12 ч с фронта распространения *P. aeruginosa* отбирали образцы и пересекали на агар Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson; США) для накопления биоматериала с целью последующего изучения фенотипических свойств (профиль антибиотикорезистентности) и изменений бактериального генома.

Оценку чувствительности изолятов к меропенему и имипенему выполняли при помощи метода диффузии в агаре [7]. Оценку чувствительности изолятов к колистину (при помощи метода серийных разведений) и интерпретацию полученных результатов выполняли в соответствии с протоколом Института клинических и лабораторных стандартов CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)) [8].

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур изолятов *P. aeruginosa*, выращенных на агаре Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson; США), с использованием наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen; Германия) по протоколу фирмы-производителя. Образцы ДНК хранили при –20 °C.

Для подготовки библиотек геномной ДНК применяли ультразвуковую фрагментацию (Covaris; США) бактериальной ДНК (400 нг) с последующей репарацией концевых последовательностей и лигированием адаптеров (MGI; Китай). Для очистки ДНК-библиотек использовали магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman; США). Концентрацию бактериальной ДНК и ДНК-библиотек измеряли при помощи прибора Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США).

Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000 (MGI; Китай). Длина прочтений составляла 250 пар оснований.

Оценку качества ридов и их подготовку проводили с использованием программ FASTQC и Trimmomatic v.0.38. Сборку геномов *de novo* осуществляли с использованием программы SPAdes 3.14 [9]. Для контроля полноты сборки и исключения возможности контаминации использовали веб-сервер ContEst16S. Качество сборки оценивали при помощи QUAST 5.0 [10]. Анализ сходства полных геномов проводили с использованием программы MUMmer [11]. Геномы аннотировали с помощью сервера RAST [12] и программы Prokka [13]. Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) осуществляли картирование коротких ридов на референс при помощи программы Snippy [14]. В качестве референсного генома использовали геном ATCC 27853. Для аннотации выявленных вариантов и предсказания их влияния на гены применяли программу SnpEff [15]. Поиск и анализ генов резистентности, а также валидацию выявленных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) осуществляли при помощи BLASTn в собранных геномах *de novo*. Для анализа детерминант резистентности также использовали сервисы ResFinder и алгоритм AMRFinderPlus, входящий в NCBI Pathogen Detection pipeline [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в течение 216 ч инкубации было получено 93 изолята *P. aeruginosa* с различными фенотипическими свойствами (цвет колоний, профиль антибиотикорезистентности, наличие слизи) и мутациями в геномах. Среди этих изолятов было обнаружено два штамма (E62 был получен через 192 ч инкубации и E74 — через 216 ч инкубации), у которых зарегистрировано значительное снижение чувствительности к колистину (в 4–8 раз) при высоких

Таблица. Характеристики карбапенем-резистентных изолятов *P. aeruginosa* со снижением чувствительности к колистину

Методический подход		Признак	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, референс	<i>P. aeruginosa</i> , изолят E62	<i>P. aeruginosa</i> , изолят E74
Фенотипическая оценка чувствительности к антибиотикам	Метод диффузии в агаре, чувствительность к	меропенему	0,25 мкг/мл, S	16 мкг/мл, R	16 мкг/мл, R
		имипенему	0,001 мкг/мл, S	128 мкг/мл, R	256 мкг/мл, R
	Метод серийных микроразведений, чувствительность к	колистину	0,5 мкг/мл, I*	2 мкг/мл, I*	4 мкг/мл, R
Оценка изменений генома	Гены резистентности к карбапенемам	<i>oprD</i>	wt	мутация, ведущая к G307D	мутация, ведущая к G307D
		<i>mexD</i>	wt	мутация, ведущая к E89K	мутация, ведущая к E89K
	Гены резистентности к колистину	<i>phoQ</i>	wt	нонсенс-мутация, ведущая к Y290stop	нонсенс-мутация, ведущая к Y290stop
	Полиморфизм	SNP	—	134	177

Примечание: S — чувствительный; I — чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика; R — резистентный; wt — дикий тип (wild type), соответствие референсу; SNP — однонуклеотидный полиморфизм; * — согласно критериям CLSI, для *P. aeruginosa* в отношении колистина неприменим термин «чувствительный», все штаммы, для которых минимальная подавляющая концентрация (МПК) колистина ≤ 2 мкг/мл, рассценивают как «чувствительные при повышенной экспозиции антибиотика».

уровнях резистентности к меропенему и имипенему. Фенотипические и генетические особенности этих штаммов представлены в таблице.

Показатели МПК меропенема и имипенема у штамма E62 составляли соответственно 16 и 128 мкг/мл, у штамма E74 — 16 и 256 мкг/мл, что соответствовало критерию резистентности. Показатель чувствительности к колистину у штамма E62 интерпретировали в соответствии с критериями CLSI как «чувствительный при повышенной экспозиции антибиотика», и его превышение МПК исходного штамма было в 4 раза. Штамм E74 согласно критериям CLSI был резистентным (МПК — 4 мкг/мл).

У обоих штаммов в гене порина *oprD* была идентифицирована мутация, приводящая к замене глицина на аспарагиновую кислоту в позиции 307 белка. Кроме того, у обоих штаммов была детектирована миссенс-мутация в гене *mexD* (кодирует субъединицу эффлюксной системы MexCD-OprJ). В гене *phoQ* у штаммов E62 и E74 была выявлена нонсенс-мутация, приводящая к преждевременной остановке синтеза продукта (289/448 аминокислот).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существование штаммов *P. aeruginosa*, демонстрирующих устойчивость одновременно к карбапенемам и полимиксидам, нередкое явление. Например, показано, что среди *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью 22,2% от общего количества меропенем-резистентных изолятов были нечувствительны к колистину [18]. В большинстве исследований отсутствует описание эволюции таких изолятов — не исключается возможность формирования подобного профиля резистентности вследствие поочередного или одновременного терапевтического применения карбапенемов и колистина. Описанный нами феномен очень интересен именно потому, что доказывает возможность снижения чувствительности к колистину после воздействия на *P. aeruginosa* меропенема. Гипотетические механизмы индукции меропенемом кросс-резистентности к колистину укладываются в постулат «у синегнойной палочки все пути

ведут к резистентности», подразумевающий, что любой стресс вызывает гипермутабельность и возникновение большого количества клонов с новыми свойствами [3]. С известной долей вероятности в результате такого мутационного «взрыва» могут возникать и закрепляться мутации, приводящие к нарушению синтеза главной мишени колистина — липополисахарида.

В геномах штаммов E62 и E74 были обнаружены мутации, объясняющие их устойчивость к меропенему/имипенему и снижение чувствительности к колистину. Выявленная нами миссенс-мутация в гене *oprD* могла вызывать изменение структуры порина OprD, транспортирующего меропенем и имипенем внутри бактериальной клетки [19]. Поиск в базе данных GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) позволил выявить один клинический изолят с аналогичной аминокислотной последовательностью порина OprD (номер генома в GeneBank — GCA_003194245.1). Данный изолят, выделенный в 2013 г., тоже был устойчив к меропенему и имипенему (МПК меропенема и имипенема — > 32 мкг/мл). Другой мутацией, которая могла снижать уровень чувствительности к карбапенемам, является миссенс-мутация в гене *mexD*, кодирующей субъединицу эффлюксной системы MexCD-OprJ. Система MexCD-OprJ вовлечена в эффлюкс β -лактамов и ее гиперэкспрессия коррелирует с устойчивостью *P. aeruginosa* к карбапенемам [20]. Ген *phoQ* кодирует сенсорную гистидинкиназу, являющуюся частью двухкомпонентной регуляторной системы PhoPQ. Мутации, вызывающие поломки гена *phoQ*, описаны как причина устойчивости к полимиксидам у изолятов *P. aeruginosa*, в том числе выделенных от пациентов с муковисцидозом [21, 22].

Таким образом, все фенотипические особенности карбапенем-резистентных изолятов со сниженной чувствительностью к колистину имели мутационную основу.

ВЫВОДЫ

Феномен кросс-резистентности, описанный в настоящем исследовании, можно объяснить тем, что в условиях стресса у *P. aeruginosa* возрастает скорость накопления

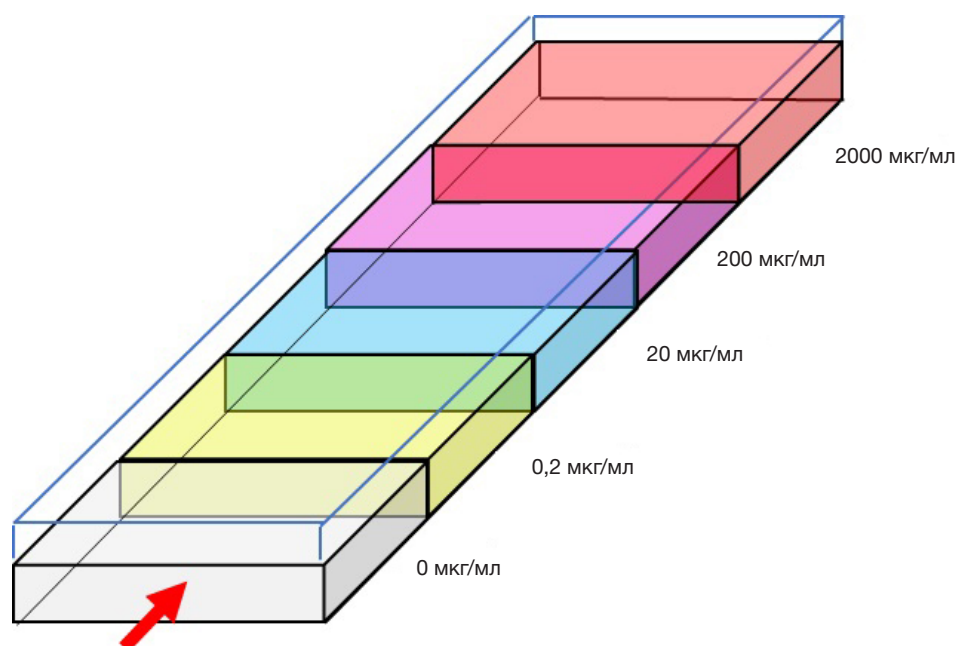


Рис. Устройство (mega-plate) для пространственно-временного моделирования устойчивости *P. aeruginosa* к меропенему. Общий размер устройства 40 × 20 см. Нижняя часть устройства разделена на пять отсеков с открытым верхом, которые разделены перегородками высотой 2,5 см. Среда в устройстве имела «сэндвич»-структуру. Нижний слой изготовлен из плотного агара Лурее–Бертани (состав см. в тексте). Нижний слой разливался в изолированные отсеки, в каждом из отсеков содержалась среда с разными концентрациями меропенема, концентрации указаны справа. Средний слой был изготовлен из Лурее–Бертани агара без меропенема. Верхний слой представлял собой полужидкий агар на основе среды Лурее–Бертани. Стрелкой показана точка первоначального посева и направление распространения *P. aeruginosa* по поверхности полужидкого агара

точечных мутаций, в том числе в генах, ответственных за развитие антибиотикорезистентности. Полученные результаты доказывают, что при воздействии меропенема у штаммов *P. aeruginosa* может развиваться резистентность

не только к другим β-лактамам антибиотикам, но и к препарату резерва для лечения синегнойной инфекции — колистину, что крайне неблагоприятно с точки зрения выбора стратегии лечения.

Литература

1. Bou R, Lorente L, Aguilar A, Perpignan J, Ramos P, Peris M, et al. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Hosp Infect. 2009; 71 (2): 138–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.07.018>.
2. World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistance. Geneva, Switzerland: 2017. Available at: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf (accessed November 2021).
3. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 2011; 19 (8): 419–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
4. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. Science. 2016; 353 (6304): 1147–51. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.
5. Pal C, Papp B, Lazar V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. Trends Microbiol. 2015; 23 (7): 401–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>.
6. Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravorty D. Biocides–resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. Expert Opin Investig Drugs. 2013; 22 (2): 191–06. Available from: <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>.
7. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin Microbiol Infect. 2000; 6 (9): 509–15. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Available from: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed November 2021).
9. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012; 19: 455–77. Available from: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
10. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013; 29 (8): 1072–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
11. Marcais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. PLoS Comput Biol. 2018; 14 (1): e1005944. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.
12. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res. 2014; 42: D206–14. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
13. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014; 30 (14): 2068–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
14. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. 2015. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2021).
15. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. Fly. 2012; 6 (2): 80–92. Available from: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
16. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance

- Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (11): e00483-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>.
17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75 (12): 3491–500. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
 18. Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (3): e02252–16. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.02252-16>.
 19. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (5): 698–722. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.
 20. Zahedi Bialvaei A, Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, Esmailkhani A, Mardani Dashti Y, et al. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Microbial Pathog.* 2021; 153: 104789. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104789>.
 21. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12): 5150–4. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09>.
 22. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12): 5761–9. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.05391-11>.
- ## References
1. Bou R, Lorente L, Aguilar A, Perpignan J, Ramos P, Peris M, et al. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect.* 2009; 71 (2): 138–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.07.018>.
 2. World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistance. Geneva, Switzerland: 2017. Available at: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf (accessed November 2021).
 3. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011; 19 (8): 419–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
 4. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science.* 2016; 353 (6304): 1147–51. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.
 5. Pal C, Papp B, Lazar V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends Microbiol.* 2015; 23 (7): 401–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>.
 6. Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravorty D. Biocides–resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013; 22 (2): 191–06. Available from: <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>.
 7. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6 (9): 509–15. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
 8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Available from: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed November 2021).
 9. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012; 19: 455–77. Available from: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
 10. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29 (8): 1072–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
 11. Marçais G, Delcher AL, Phillippy AM, Coston R, Salzberg SL, Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput Biol.* 2018; 14 (1): e1005944. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.
 12. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: D206–14. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
 13. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014; 30 (14): 2068–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
 14. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. 2015. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2021).
 15. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly.* 2012; 6 (2): 80–92. Available from: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
 16. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (11): e00483-19. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>.
 17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020; 75 (12): 3491–500. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
 18. Sader HS, Huband MD, Castanheira M, Flamm RK. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (3): e02252–16. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.02252-16>.
 19. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (5): 698–722. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.
 20. Zahedi Bialvaei A, Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, Esmailkhani A, Mardani Dashti Y, et al. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Microbial Pathog.* 2021; 153: 104789. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104789>.
 21. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12): 5150–4. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09>.
 22. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12): 5761–9. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.05391-11>.

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ

М. Ю. Мещерякова , Е. Н. Колесников, В. С. Трифанов, Н. Н. Тимошкина, А. В. Снежко, Д. Ю. Гвалдин


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

С нарушением работы системы репарации неспаренных оснований ДНК связано понятие о микросателлитной нестабильности (MSI), характеризующей особый молекулярно-биологический подтип злокачественных опухолей. Достоверные данные о частоте встречаемости MSI в нейроэндокринных новообразованиях толстой кишки отсутствуют, что связано с относительно небольшим числом пациентов. Сведения о прогностической значимости MSI также противоречивы. Целью исследования было изучение частоты встречаемости MSI в нейроэндокринных новообразованиях (НЭН) толстой кишки в зависимости от локализации, степени дифференцировки опухоли и стадии заболевания. Включенные в исследование 29 пациентов были прооперированы в период с 2015 по 2018 г. по поводу нейроэндокринных новообразований толстой кишки (мужчины — 15 человек, женщины — 14 человек, средний возраст постановки диагноза — 62,5 лет). Средний срок наблюдения составил 3,8 лет. НЭН толстой кишки были распределены по локализациям, а также по стадиям заболевания. У большинства пациентов, включенных в исследование, была диагностирована III стадия заболевания (52%). Статус микросателлитной стабильности (MSS) был подтвержден у 24 пациентов (83%), тогда как MSI-статус — у пяти (17%) соответственно. Все случаи MSI-положительных новообразований соответствовали высокодифференцированным G1 и G2 нейроэндокринным опухолям прямой кишки на I стадии заболевания. Общая выживаемость пациентов с MSS-положительными НЭН толстой кишки составила на II стадии — 50%, на III — 33%, на IV стадии — 0%. Общая выживаемость пациентов с MSI-положительными НЭН прямой кишки на I стадии составила 100%. Таким образом, была определена частота встречаемости MSI-положительных НЭН толстой кишки.

Ключевые слова: нейроэндокринные новообразования толстой кишки, микросателлитная нестабильность, общая выживаемость, прогноз

Вклад авторов: Е. Н. Колесников — получение, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи; В. С. Трифанов — дизайн исследования, редактирование статьи; Н. Н. Тимошкина — анализ и интерпретация полученных данных, написание текста статьи; А. В. Снежко — получение данных для анализа; Д. Ю. Гвалдин — анализ и интерпретация полученных данных; М. Ю. Мещерякова — обзор публикаций, написание текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ онкологии (протокол № 3 от 09 февраля 2021 г.); все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Милана Юрьевна Мещерякова
ул.14-линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону; mesheryakovamilana@mail.ru

Статья получена: 12.01.2022 **Статья принята к печати:** 27.01.2022 **Опубликована онлайн:** 14.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.004

MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL NEUROENDOCRINE NEOPLASMS

Meshcheryakova MYu , Kolesnikov EN, Trifanov VS, Timoshkina NN, Snezhko AV, Gvaldin DYU


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

Microsatellite instability (MSI) characterizes a special molecular genetic subtype of malignancies and is associated with the deficiency of mismatched DNA repair. There are no reliable data on the frequency of MSI in colorectal neuroendocrine neoplasms due to the relative rarity of this cancer type. The prognostic significance of MSI is debatable. The aim of this study was to investigate the frequency of the MSI phenotype among colorectal neuroendocrine neoplasms (NENs) with different primary location, grade and stage. Twenty-nine patients (15 men and 14 women, mean age: 62.5 years) included in the study underwent surgery for colorectal neuroendocrine tumors between 2015 and 2018. The mean follow-up period was 3.8 years. Colorectal NENs were grouped by primary location and stage. The majority of the patients (52%) had stage III cancer at diagnosis. The microsatellite stability (MSS) phenotype was confirmed in 24 patients (83%), whereas the MSI phenotype was observed in 5 patients (17%). All MSI-positive tumors were stage I well-differentiated grade G1 or G2 neuroendocrine tumors (NETs) of the rectum. Overall survival was 50% for patients with stage II MSS-positive NENs of the colon and rectum, 33% for stage III and 0% for stage IV. For patients with stage I MSI-positive NENs of the rectum, overall survival was 100%. Thus, the frequency of MSI-positive colorectal NENs was estimated.

Keywords: colorectal neuroendocrine neoplasms, microsatellite instability, overall survival, prognosis

Author contributions: Kolesnikov EN — data collection, analysis and interpretation; manuscript editing; Trifanov VS — study design; data collection, manuscript editing; Timoshkina NN — data analysis and interpretation; manuscript preparation; Snezhko AV — data acquisition; Gvaldin DYU — data analysis and interpretation; Meshcheryakova MYu — literature analysis; manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Centre for Oncology (Protocol № 3 dated February 9, 2021); informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Milana Yu. Meshcheryakova
14 liniya, 63, Rostov-on-Don; mesheryakovamilana@mail.ru

Received: 12.01.2022 **Accepted:** 27.01.2022 **Published online:** 14.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.004

Система репарации неспаренных оснований — уникальный биологический механизм восстановления повреждений ДНК, возникающих в процессе клеточного деления [1]. Работу данной системы обеспечивают белковые продукты шести ключевых генов (*MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH3*, *MSH6* и *MLH3*). Наследственная или спорадическая

генетическая мутация или иное эпигенетическое событие (например, гиперметилирование промотора *MLH1*) способно инактивировать любой из генов и нарушить функционирование всего механизма [2]. Непосредственный результат данных изменений — накопление большого количества неисправленных мутаций в геноме, а

также изменение длины микросателлитов (коротких последовательностей, состоящих из 2–9 пар нуклеотидов и располагающихся в эухроматиновой части генома) [3]. Следствием этого может быть сдвиг рамки считывания в кодирующей последовательности (если микросателлит располагается в интроне) с последующей инактивацией различных генов. Таким образом, нарушение работы системы репарации неспаренных оснований ДНК ведет к появлению такого фенотипического состояния генома, как микросателлитная нестабильность (MSI) [1].

Менее агрессивную природу MSI-положительных опухолей связывают с высокой скоростью мутирования, что приводит к большому уровню антигенной нагрузки, стимулирующей противоопухолевый иммунный ответ. В итоге опухоли с MSI должны лучше реагировать на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек (ИКТ), что и было подтверждено в отношении меланомы, рака желудка и колоректального рака (КРР). Однако прогностическое значение MSI на поздних стадиях КРР (IV) остается противоречивым [4].

Таким образом, на сегодняшний день MSI является ценным предиктором ответа опухоли на иммунотерапию независимо от локализации первичной опухоли [1].

Универсальность данного маркера способствует тому, что наряду с расширением показаний для применения ИКТ, определение статуса MSI становится необходимой диагностической опцией, единогласно одобренной крупнейшими мировыми онкологическими сообществами, такими как ASCO, ESMO, NCCN, RUSSCO [2]. Так, статус MSI имеет немаловажное значение при выборе тактики ведения пациентов с КРР на ранних стадиях, что отражено в ныне действующих клинических рекомендациях по лечению данной патологии [5].

В отношении нейроэндокринных новообразований (НЭН) толстой кишки не было проведено ни одного рандомизированного клинического исследования по изучению эффективности применения иммунотерапии в различных режимах. Кроме того, распространенность MSI среди НЭН толстой кишки, в частности, и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в целом, недостаточно изучена, так же, как и ее влияние на прогноз.

Мы предполагаем, что НЭН толстой кишки с MSI-положительным статусом представляют собой обособленную категорию опухолей с иным клиническим течением и прогнозом. Ввиду относительной редкости НЭН толстой кишки существуют некоторые трудности с набором большой выборки пациентов. В наиболее

масштабных молекулярно-генетических исследованиях НЭН толстой кишки число включенных пациентов не превышало в среднем 100 человек. Так, в одной из более ранних работ при изучении распространенности MSI в нейроэндокринных карциномах (НЭК) ($n = 53$) и смешанных нейроэндокринных карциномах ЖКТ ($n = 36$) MSI-статус был подтвержден в 12,4% случаев (11/89), в том числе в НЭК толстой кишки, желудка, двенадцатиперстной кишки [6]. Авторы выделили некоторые клинико-патологические и молекулярно-генетические особенности MSI-положительных опухолей: MSI-положительные карциномы демонстрировали выраженный паттерн метилирования генов (40,6% против 20,2% метилированных генов соответственно), из которых преимущественно эпигенетическим изменениям подвергались гены *MLH1*, *p16*, *PAX6*, *PAX5*, *THBS1*, *TP73*, *DAPK1*, *MGMT*, *PCYCARD*, *CDH13*, *HIC1* и *TIMP3*. При этом MSI коррелировала с наличием мутации гена *BRAF* [6]. Представленные результаты наглядно демонстрируют то, что MSI-статус сочетается с определенным набором молекулярных характеристик опухоли. В их изучении мы видим перспективу для дальнейшей исследовательской деятельности. Целью нашего исследования было изучить статус MSI в НЭН толстой кишки в зависимости от локализации первичной опухоли, степени дифференцировки, а также стадии заболевания.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 29 пациентов, которые были прооперированы в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (г. Ростов-на-Дону) в период с 2015 по 2018 г. по поводу НЭН толстой кишки. Из них мужчины — 15 человек, женщины — 14 человек, средний возраст постановки диагноза — 62,5 лет. Средний период наблюдения за пациентами составил 3,8 лет. Критерии включения в исследование: подтвержденный иммуногистохимическим методом профиль экспрессии маркеров нейроэндокринной дифференцировки (хромогранин А, синаптофизин); подписанное пациентами информированное согласие на участие в научном исследовании. Все гистологические препараты были пересмотрены согласно критериям классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2019 г.

Для работы использовали парафиновые блоки операционного материала, из которых осуществляли экстракцию ДНК. Основные этапы экстракции ДНК включали отделение 10 слайсов от массива парафинового

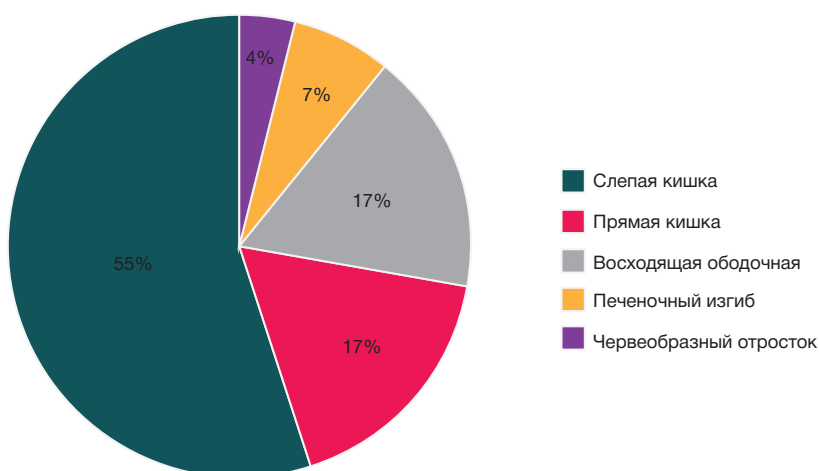


Рис. 1. Распределение НЭН толстой кишки по локализациям

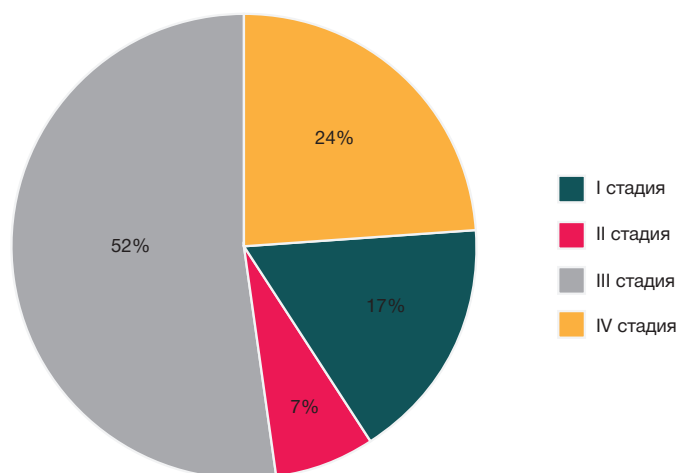


Рис. 2. Распределение НЭН толстой кишки по стадиям

блока, содержащего операционный биоптат опухолевой или условно нормальной ткани, с помощью микротомы; депарафинизацию в ксилоле, инкубацию в лизирующем буфере в присутствии фермента протеиназы К до полного лизиса ткани (экспозиция при 58 °C в течение 6–12 ч), выделение и доочистку препарата тотальной ДНК с использованием реактива набора «ДНК-сорб В» («АмплиСенс»; Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на Qubit 2.0 (LifeTechnologies; США).

MSI определяли методом фрагментного анализа выделенной ДНК с использованием пяти мономорфных микросателлитных локусов (NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26). На матрице каждой выделенной тотальной ДНК проводили пять реакций амплификации. В состав ПЦР-смеси входило: 20 мкл с 10–20 нг ДНК, 0,175 мкМ каждого праймера, 2 мМ dNTP, 15 мМ MgCl₂ и 0,5 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили с соблюдением следующих условий: начальная денатурация 5 мин при 94 °C, затем денатурация 40 циклов по 30 с при 94 °C, отжиг при 59 °C, элонгация при 72 °C и заключительная элонгация 45 с при 72 °C. Диапазон размеров ПЦР-продукта составил от 50 до 350 пн.

Флуоресцентно меченный ПЦР-продукт детектировали посредством фрагментного анализа. Для этого смешивали 1 мкл ПЦР-продуктов с 19 мкл Hi-Di формамида и 0,5 мкл GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (Thermo Fisher; США).

Пробы инкубировали в твердотельном термостате CH-100 (Biosan; США) в течение 5 мин при 95 °C, затем загружали в генетический анализатор ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems; США). Запуск осуществляли по протоколу, рекомендованному производителем. Полученные данные анализировали в GeneMapper Software (Thermo Fisher; США). Минимальный предел обнаружения пика составлял 50 относительных флуоресцентных единиц (RFU). При условии полиморфности двух и более локусов регистрировали MSI. Метилирование гена *MLH1* определяли методом пиросеквенирования бисульфит-конвертированной ДНК с помощью набора PyroMark Q24 CpG MLH1 согласно инструкции производителя (QIAGEN; Германия).

С помощью программного обеспечения Statsoft Statistica 10,0 (StatSoft; США) в среде операционной системы Windows 10 проводили статистическую обработку данных. Для первичной математической обработки полученных данных использовали методы описательной статистики (расчет мер центральной тенденции и мер изменчивости).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

НЭН толстой кишки были разделены по локализациям. Из них НЭН слепой кишки составили 55% ($n = 16$), прямой кишки — 17% ($n = 5$), восходящей ободочной кишки —

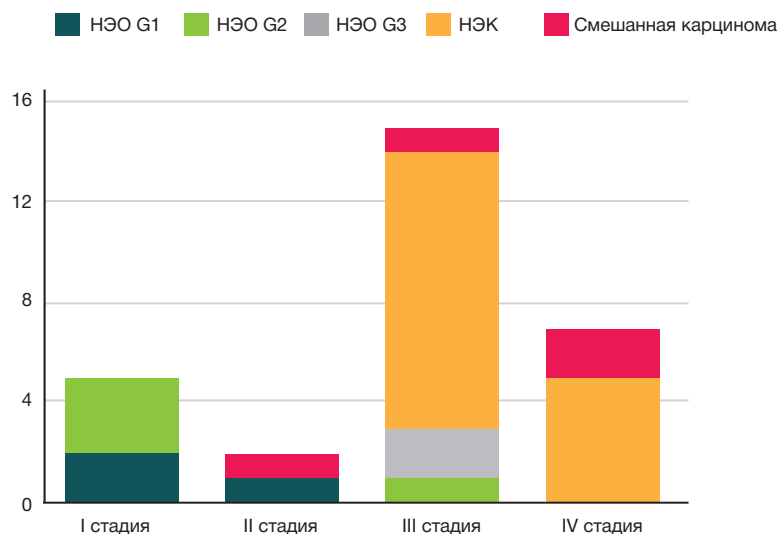


Рис. 3. Распределение пациентов в соответствии с гистологическим подтипом НЭН и стадиями заболевания

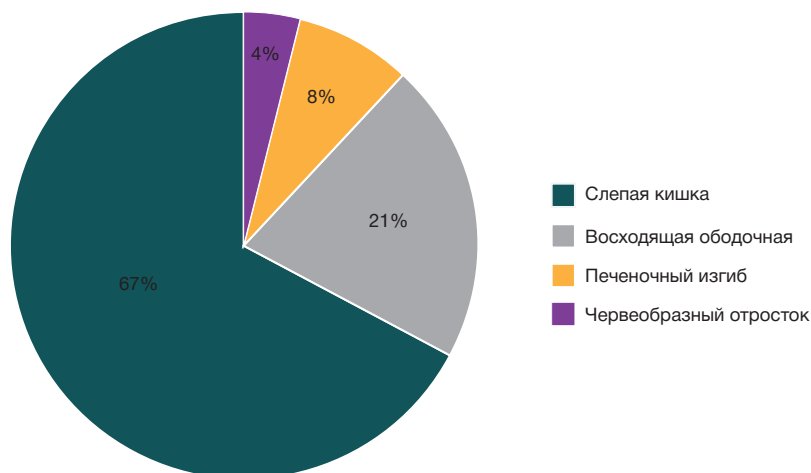


Рис. 4. Распределение НЭН толстой кишки с подтвержденным статусом MSS в соответствии с локализацией и стадией заболевания

17% ($n = 5$), печеночного изгиба ободочной кишки — 7% ($n = 2$), аппендикса — 4% ($n = 1$) (рис. 1).

У большинства пациентов, включенных в исследование, была установлена III стадия заболевания (52%, $n = 15$) (рис. 2).

НЭК толстой кишки были диагностированы чаще других гистологических подтипов (55%, $n = 16$), частота их выявления была прямо пропорциональна повышению стадии заболевания. Распределение пациентов в соответствии с гистологическим подтипом НЭН и стадиями заболевания продемонстрировано ниже (рис. 3).

Микросателлитная стабильность (MSS) была подтверждена в 83% случаях ($n = 24$), тогда как MSI-позитивный статус — в 17% ($n = 5$). Все MSI-позитивные опухоли соответствовали высокодифференцированным G1 ($n = 2$) и G2 ($n = 3$) нейроэндокринным опухолям прямой кишки на I стадии. Отметим, что микросателлитная нестабильность была определена по всем пяти тестируемым STR-локусам во всех случаях.

Уровень метилирования гена *MLH1* характеризовался гиперметилированием всех образцов с MSI (Me = 20%, диапазон 14–42%) и гипометилированием образцов с MSS-статусом (Me = 4%, диапазон 4–14%). На основании полученных данных можно заключить, что ведущей причиной MSI-статуса в НЭН толстой кишки стало ингибирование транскрипции ключевого гена системы репарации неспаренных оснований ДНК посредством гиперметилирования его промотора. Данный механизм описан для спорадических колоректальных аденокарцином.

Распределение НЭН толстой кишки с подтвержденным статусом MSS в соответствии с локализацией и стадией заболевания продемонстрировано на рис. 4 и 5.

Трехлетняя выживаемость пациентов с MSS-позитивными НЭН толстой кишки составила на II стадии 50%, на III стадии — 33%, на IV стадии — 0%. Трехлетняя выживаемость пациентов с MSI-H-позитивными НЭН прямой кишки на I стадии была равна 100%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучая распространенность микросателлитной нестабильности среди НЭН толстой кишки, нельзя не сравнить полученные данные с теми, которые на сегодняшний день представлены для колоректального рака. В недавно проведенном исследовании отечественных авторов в российской когорте пациентов с КРП ($n = 359$) MSI-статус был обнаружен в 6,4% случаев (23/359), причем он коррелировал с более молодым возрастом пациентов ($p = 0,023$), наличием первично-множественных опухолевых поражений ($p = 0,0299$), наличием муцинозного компонента ($p < 0,0001$), а также низкой степенью дифференцировки ($p = 0,0025$) и с правосторонней локализацией опухоли в толстой кишке ($p < 0,0001$) [7]. По нашим данным, все выявленные MSI-позитивные НЭН ($n = 5$) локализовались в прямой кишке и имели высокую степень дифференцировки.

В настоящее время для КРП четко установлена тенденция снижения частоты выявления MSI с увеличением стадии

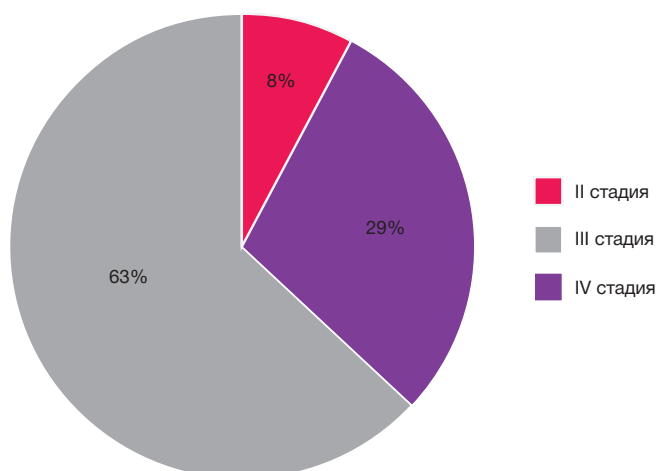


Рис. 5. Распределение НЭН толстой кишки с подтвержденным статусом MSS в соответствии со стадией заболевания

опухолевого процесса [1, 3–5]. В нашем исследовании все выявленные случаи MSI-положительных НЭН толстой кишки соответствовали I стадии заболевания. При расширении выборки с включением достаточного числа пациентов на каждой стадии заболевания будет возможным достоверно судить о проявлении данной тенденции в отношении НЭН толстой кишки.

Ранее нами была изучена микросателлитная нестабильность в высокодифференцированных (G1/G2) нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы. Сравнивая полученные результаты, можно утверждать, что характер MSI-статуса и частота его встречаемости среди НЭН поджелудочной железы и толстой кишки имеет некоторые различия. Так, MSI-статус был подтвержден в 14% случаев НЭН поджелудочной железы [8]. В настоящем исследовании мы получили 17% MSI-положительных НЭН толстой кишки. Кроме того, в случаях MSI-положительных нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы не было установлено ассоциации с метилированием промотора гена *MLH1*, напротив, для НЭН толстой кишки MSI-положительный статус был связан исключительно с гиперметилированием *MLH1*. Возможно, этот эпигенетический механизм, характерный как для аденокарцином, так и для НЭН толстой кишки, связан со специфичностью колоректального происхождения опухолей.

В контексте НЭН ЖКТ очень важен критерий дифференцировки, что нашло отражение в модернизированной классификационной системе, принятой ВОЗ в 2019 г. НЭН высокой и низкой степени дифференцировки представляют собой совершенно гетерогенные по своим генетическим характеристикам подгруппы. К тому же НЭН различного органного происхождения также различаются по набору основных молекулярных маркеров. В связи с этим остро стоит вопрос, есть ли связь между степенью дифференцировки НЭН (соответственно, НЭО и НЭК), локализацией первичной опухоли и распределением MSI. Существующие на сегодняшний день в литературе данные остаются довольно противоречивыми. Так, из 239 изученных НЭН желудочно-кишечного тракта и легких только четыре опухолевых образца (НЭО G3 поджелудочной железы ($n = 1$) и НЭК толстой кишки ($n = 3$)) оказались MSI-положительными [9]. В другом исследовании, где преобладающими локализациями первичной НЭК были желудок ($n = 21$) и поджелудочная железа ($n = 6$), ни в одном случае ($n = 33$) не выявлена MSI [10]. В то же время по данным метаанализа, включившего 33 ретроспективных исследования и восемь клинических сообщений, MSI в среднем встречалась в 10% НЭК желудка и толстой кишки

[11]. MSI-статус не был также подтвержден ни в одном случае высокодифференцированных НЭО прямой кишки ($n = 56$), тонкой кишки ($n = 14$), толстой кишки ($n = 38$) и поджелудочной железы ($n = 16$) [9, 12–15]. По сообщениям других авторов, MSI-статус в НЭО поджелудочной железы встречается в 10–33% случаев [9]. В нашем исследовании большинство образцов были представлены НЭК толстой кишки (55%, $n = 16$), однако ни в одном из них не был зарегистрирован статус MSI. В то же время, согласно литературным данным, MSI-статус НЭК толстой кишки был подтвержден в 16, 7, 10 и 14% случаев соответственно [6, 9, 17–21]. Анализируя данные литературы, можно сделать вывод о том, что частота встречаемости MSI выше среди низко дифференцированных форм НЭН. Однако результаты нашего исследования с подтверждением MSI только в высокодифференцированных G1 и G2 НЭО прямой кишки свидетельствуют об обратном. И все-таки достоверно судить о характере распределения MSI в НЭН толстой кишки будет возможным только после расширения выборки пациентов.

ВЫВОДЫ

Таким образом, при изучении частоты встречаемости микросателлитной нестабильности в НЭН толстой кишки в зависимости от степени дифференцировки опухолей, их первичной локализации и стадии заболевания было выявлено 17% MSI-положительных образцов, все из которых соответствовали высокодифференцированным G1 и G2 НЭО с локализацией в прямой кишке на I стадии заболевания. Результаты, полученные нами при расчете трехлетней выживаемости пациентов, свидетельствуют о снижении данного показателя прямо пропорционально стадии заболевания. В настоящее время принято считать, что распространенность MSI среди НЭН соответствует таковой для аденокарцином той же органной принадлежности. Сопоставляя полученные нами данные с частотой встречаемости MSI в КРР, можно сказать, что для НЭН толстой кишки, а именно для их высокодифференцированных форм, может быть характерен больший процент MSI-положительных случаев (17% против 10–15%). В связи с этим стоит заметить, что в отличие от КРР, тестирование на MSI-статус НЭН не входит в диагностический стандарт, закрепленный действующими клиническими рекомендациями, что, по нашему мнению, несправедливо. Полученные нами результаты позволяют с осторожным оптимизмом говорить о том, что в отношении данной категории опухолей применение новейших иммунотерапевтических препаратов могло бы быть эффективным.

Литература

1. Ratovomanana T, Cohen R, Svrcek M, Renaud F, Cervera P, Siret A, et al. Performance of Next-Generation Sequencing for the Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer With Deficient DNA Mismatch Repair. *Gastroenterology*. 2021; 161 (3): 814–26.
2. Echle A, Grabsch HI, Quirke P, van den Brandt PA, West NP, Hutchins GGA, et al. Clinical-Grade Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Tumors by Deep Learning. *Gastroenterology*. 2020; 159 (4): 1406–16.
3. Andre T, Amonkar M, Norquist JM, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, et al. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22 (5): 665–77.
4. Diao Z, Han Y, Chen Y, Zhang R, Li J. The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021; 157 (1): 103–71.
5. Трякин А. А., Федянин М. Ю., Цуканов А. С., Шельгин Ю. А., Покатаев И. А., Игнатова Е. О. и др. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии. *Злокачественные опухоли*. 2019; 9 (4): 59–69.

6. Sahnane N, Furlan D, Monti M, Romualdi C, Vanoli A, Vicari E, et al. Microsatellite unstable gastrointestinal neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22 (1): 35–45.
7. Мусаеян А. А., Назаров В. Д., Будникова А. С., Лапин С. В., Воробьев С. Л., Эмануэль В. Л. и др. Клинико-морфологический портрет опухолей с микросателлитной нестабильностью. Успехи молекулярной онкологии. 2021; 8 (2): 52–59.
8. Trifanov VS, Timoshkina NN, Gvaldin DYU, Mesheryakova MYu, Kolesnikov EN, Gaziev UM, et al. Study of microsatellite instability in neuroendocrine tumors of pancreas and colon. *Journal of Clinical Oncology*. 2021; 39 (15): 16196.
9. Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, et al. Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas. *Endocr Pathol*. 2020; 31 (2): 182–9.
10. Xing J, Ying H, Li J, Gao Y, Sun Z, Li J, et al. Immune Checkpoint Markers in Neuroendocrine Carcinoma of the Digestive System. *Front Oncol*. 2020; 28 (10): 132.
11. Girardi DM, Silva ACB, Rêgo JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017; 56 (1): 28–35.
12. Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, et al. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget*. 2015; 6 (26): 22114–25.
13. Kidd M, Eick G, Shapiro MD, Camp RL, Mane SM, Modlin IM. Microsatellite instability and gene mutations in transforming growth factor-beta type II receptor are absent in small bowel carcinoid tumors. *Cancer*. 2005; 103 (2): 229–36.
14. Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA. Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Oncol*. 1999; 15 (2): 361–6.
15. Arnold CN, Nagasaka T, Goel A, Scharf I, Grabowski P, Sosnowski A, et al. Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. *Int J Cancer*. 2008; 123 (7): 1556–64.
16. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2016; 22 (4): 813–20.
17. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, Sun W, Bahary N, Kuan SF, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol*. 2016; 49 (1): 124–34.
18. Furlan D, Sahnane N, Mazzoni M, Pastorino R, Carnevali I, Stefanoli M, et al. Diagnostic utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling of adenocarcinomas and neuroendocrine carcinomas of the colon-rectum. *Virchows Arch*. 2013; 462 (1): 47–56.
19. La Rosa S, Marando A, Furlan D, Sahnane N, Capella C. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36 (4): 601–11.
20. Kit OI, Trifanov VS, Petrusenko NA, Gvaldin DY, Kutilin DS, Timoshkina NN. Identification of new candidate genes and signalling pathways associated with the development of neuroendocrine pancreatic tumours based on next generation sequencing data. *Mol Biol Rep*. 2020; 47 (6): 4233–43.
21. Кит О. И., Водолажский Д. И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике. Молекулярная биология. 2015; 49 (4): 531–54.

References

1. Ratovomanana T, Cohen R, Svrcek M, Renaud F, Cervera P, Siret A, et al. Performance of Next-Generation Sequencing for the Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer With Deficient DNA Mismatch Repair. *Gastroenterology*. 2021; 161 (3): 814–26.
2. Echle A, Grabsch HI, Quirke P, van den Brandt PA, West NP, Hutchins GGA, et al. Clinical-Grade Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Tumors by Deep Learning. *Gastroenterology*. 2020; 159 (4): 1406–16.
3. Andre T, Amonkar M, Norquist JM, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, et al. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22 (5): 665–77.
4. Diao Z, Han Y, Chen Y, Zhang R, Li J. The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021; 157 (1): 103–71.
5. Trjakin AA, Fedjanin MYu, Cukanov AS, Shelygin YuA, Pokataev IA, Ignatova EO, i dr. Mikrosatelitnaja nestabil'nost' kak unikal'naja harakteristika opuholei i prediktor jeffektivnosti immunoterapii. *Zlokachestvennye opuholi*. 2019; 9 (4): 59–69. Russian.
6. Sahnane N, Furlan D, Monti M, Romualdi C, Vanoli A, Vicari E, et al. Microsatellite unstable gastrointestinal neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22 (1): 35–45.
7. Musaeljan AA, Nazarov VD, Budnikova AS, Lapin SV, Vorobev SL, Jemanujel VL, i dr. Kliniko-morfologicheskij portret opuholej s mikrosatelitnoj nestabil'nost'ju. *Uspехи molekularnoj onkologii*. 2021; 8 (2): 52–59. Russian.
8. Trifanov VS, Timoshkina NN, Gvaldin DYU, Mesheryakova MYu, Kolesnikov EN, Gaziev UM, et al. Study of microsatellite instability in neuroendocrine tumors of pancreas and colon. *Journal of Clinical Oncology*. 2021; 39 (15): 16196.
9. Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, et al. Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas. *Endocr Pathol*. 2020; 31 (2): 182–9.
10. Xing J, Ying H, Li J, Gao Y, Sun Z, Li J, et al. Immune Checkpoint Markers in Neuroendocrine Carcinoma of the Digestive System. *Front Oncol*. 2020; 28 (10): 132.
11. Girardi DM, Silva ACB, Rêgo JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017; 56 (1): 28–35.
12. Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, et al. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget*. 2015; 6 (26): 22114–25.
13. Kidd M, Eick G, Shapiro MD, Camp RL, Mane SM, Modlin IM. Microsatellite instability and gene mutations in transforming growth factor-beta type II receptor are absent in small bowel carcinoid tumors. *Cancer*. 2005; 103 (2): 229–36.
14. Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA. Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Oncol*. 1999; 15 (2): 361–6.
15. Arnold CN, Nagasaka T, Goel A, Scharf I, Grabowski P, Sosnowski A, et al. Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. *Int J Cancer*. 2008; 123 (7): 1556–64.
16. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2016; 22 (4): 813–20.
17. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, Sun W, Bahary N, Kuan SF, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol*. 2016; 49 (1): 124–34.
18. Furlan D, Sahnane N, Mazzoni M, Pastorino R, Carnevali I, Stefanoli M, et al. Diagnostic utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling of

- adenocarcinomas and neuroendocrine carcinomas of the colon-rectum. *Virchows Arch.* 2013; 462 (1): 47–56.
19. La Rosa S, Marando A, Furlan D, Sahnane N, Capella C. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36 (4): 601–11.
20. Kit OI, Trifanov VS, Petrusenko NA, Gvaldin DY, Kutilin DS, Timoshkina NN. Identification of new candidate genes and signalling pathways associated with the development of neuroendocrine pancreatic tumours based on next generation sequencing data. *Mol Biol Rep.* 2020; 47 (6): 4233–43.
21. Kit OI, Vodolazhskij DI. Molekuljarnaja biologija kolorektal'nogo raka v klinicheskoj praktike. *Molekuljarnaja biologija.* 2015; 49 (4): 531–54. Russian.

СЕНСОРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Л. Е. Агафонова¹✉, Т. В. Булко¹, А. В. Кузиков^{1,2}, Р. А. Масамрех^{1,2}, В. В. Шумянцева^{1,2}

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

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

Разработка высокочувствительных методов анализа лекарственных препаратов является актуальной задачей современной биоаналитической и фармакологической химии. Анализ лекарственных препаратов необходим для мониторинга качества и чистоты, для исследования средств доставки терапевтических средств и определения эффективности включения субстанций в системы доставки, для исследования кинетических параметров реакций, катализируемых ферментами метаболизма ксенобиотиков, для исследования механизма взаимодействия лекарств с ДНК с позиций фармакогеномики. Целью работы было разработать электрохимический метод регистрации ряда лекарственных препаратов. Метод основан на реакции электроокисления органических молекул при положительных значениях потенциалов в диапазоне $+ (0 \div 1,6)$ В. Для анализа использовали коммерчески доступные трехконтактные электроды, получаемые методом трафаретной печати с немодифицированным графитовым рабочим электродом. Показано, что электрохимический метод позволяет одновременно детектировать несколько соединений при разных значениях рабочих потенциалов и регистрировать препараты в широком диапазоне определяемых терапевтически значимых концентраций ($50 \text{ мкМ} - 10 \text{ мМ}$), что может быть применено при работе с биологическими жидкостями (плазмой, сывороткой, кровью, мочой), для лекарственного мониторинга и анализа межлекарственных взаимодействий.

Ключевые слова: электроанализ, лекарственные препараты, вольтарен, нурофен, парацетамол, немодифицированные печатные графитовые электроды

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.).

Вклад авторов: Л. Е. Агафонова — проведение экспериментов, обработка результатов, написание статьи, подготовка графиков; Т. В. Булко — подготовка образцов, проведение экспериментов; А. В. Кузиков — статистическая обработка результатов, написание статьи; Р. А. Масамрех — подготовка образцов, проведение экспериментов; В. В. Шумянцева — концепция, написание статьи, анализ результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Любовь Евгеньевна Агафонова
Погодинская ул., д. 10, стр. 8, г. Москва, 119121, Россия; agafonoluba@mail.ru

Статья получена: 07.02.2022 **Статья принята к печати:** 21.02.2022 **Опубликована онлайн:** 28.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.009

SENSORS FOR ANALYSIS OF DRUGS, DRUG-DRUG INTERACTIONS, AND CATALYTIC ACTIVITY OF ENZYMES

Agafonova LE¹✉, Bulko TV¹, Kuzikov AV^{1,2}, Masamrekh RA^{1,2}, Shumyantseva VV^{1,2}

¹ Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Development of highly sensitive methods for drug analysis is an ongoing challenge posed by modern bioanalytical and pharmaceutical chemistry. Drug analysis is essential to monitor the quality and purity of pharmaceuticals, study the delivery vehicles for therapeutic agents, to assess the effectiveness of the substance incorporation into the drug delivery system, to estimate the kinetic parameters of reactions, catalyzed by enzymes involved in xenobiotic metabolism, and to study the mechanisms of the drug-DNA interactions from the perspective of pharmacogenomics. The study was aimed to develop an electrochemical technique for detection of a number of drugs. The method is based on electrochemical oxidation of organic molecules at positive potentials between $+ (0 \div 1.6)$ V. The commercially available three-contact electrodes obtained by screen printing with unmodified graphite working electrode were used for analysis. It is shown that electrochemical technique allows for simultaneous detection of several compounds at various working electrode potentials, and for detection of drugs over a wide range of the clinically meaningful drug concentrations ($50 \text{ }\mu\text{M} - 10 \text{ mM}$), which could be used when working with biological fluids (blood plasma, blood serum, blood, urine), as well as when performing drug monitoring and drug-drug interaction analysis.

Keywords: electroanalysis, drugs, voltaren, nurofen, paracetamol, unmodified screen-printed graphite electrodes

Funding: the study was carried out within the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021–2030.

Author contribution: Agafonova LE — experimental procedure, data processing, manuscript writing, building graphs; Bulko TV — sample preparation, experimental procedure; Kuzikov AV — statistical data processing, manuscript writing; Masamrekh RA — sample preparation, experimental procedure; Shumyantseva VV — concept, manuscript writing, data analysis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lyubov E. Agafonova
Pogodinskaya, 10/8, Moscow, 119121, Russia; agafonoluba@mail.ru

Received: 07.02.2022 **Accepted:** 21.02.2022 **Published online:** 28.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.009

Электрохимический метод анализа — это мощный инструмент для оценки содержания, чистоты лекарства и концентрации лекарственных средств, как в фармацевтических, так и в биологических жидкостях или тканях (моче, сыворотке, плазме, крови, клеточных лизатах). Несмотря на применение различных методов оценки лекарств (таких как спектрофотометрия, колориметрия, спектрофлуориметрия, газовая хроматография-масс-

спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография, титриметрия, капиллярный электрофорез, ВЭЖХ-тандемная масс-спектрометрия и термобариметрический анализ, радиометрия, иммуноанализ) [1], электрохимические методы также востребованы вследствие их высокой чувствительности, уникальной электрохимической сигнатуры соответствующего соединения, умеренной

стоимости, быстроты электрохимического метода анализа, небольшого объема пробы (2–60 мкл) и портативности оборудования. Электроанализ позволяет регистрировать несколько лекарств одновременно и исследовать их различными электрохимическими методами для повышения чувствительности анализа (циклическая и инверсионная вольтамперометрии, квадратно-волновая вольтамперометрия, дифференциально-импульсная вольтамперометрия, хроноамперометрия и спектроскопия электрохимического импеданса) [2–6].

Цитохромы P450 — суперсемейство гем-тиолатных монооксигеназ, вовлеченных в метаболизм ксенобиотиков и эндогенных соединений [7]. Метод анализа каталитической активности этого класса гемопротеинов с помощью метода электроокисления лекарств-субстратов хорошо зарекомендовал себя в ранее опубликованной работе [4] по регистрации каталитической активности цитохрома P450 3A4. Цитохром P450 19A1 (CYP19A1, ароматаза) — ключевой фермент биосинтеза эстрогенов [8]. Для количественного определения продуктов CYP19A1-зависимой электрокаталитической реакции ранее были разработаны методы электрохимического определения эстрона или β -эстрадиола с помощью электродов, модифицированных различными наноконструктивными материалами [9–12]. Электрохимическое окисление эстрона или β -эстрадиола как метаболитов ароматазы может быть зарегистрировано и на коммерчески доступных трехконтактных ПГЭ [13]. Электроокисление (S)-7-гидроксиварфарина как метаболита цитохрома P450 2C9 было применено для определения кинетических параметров этого гемопротеина [5].

Целью работы было разработать безреагентный электрохимический метод идентификации и количественного определения лекарственных средств в физиологических условиях для возможности анализировать препараты в сыворотке крови с помощью коммерчески доступных трехконтактных электродов, получаемых методом трафаретной печати с графитовым рабочим электродом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостатов PGSTAT 12 Autolab и PGSTAT 312N Autolab (Metrohm Autolab Ins.; Нидерланды) с программным обеспечением GPES и NOVA версии 4.9.7 и 2.0 соответственно (Нидерланды). Использовали

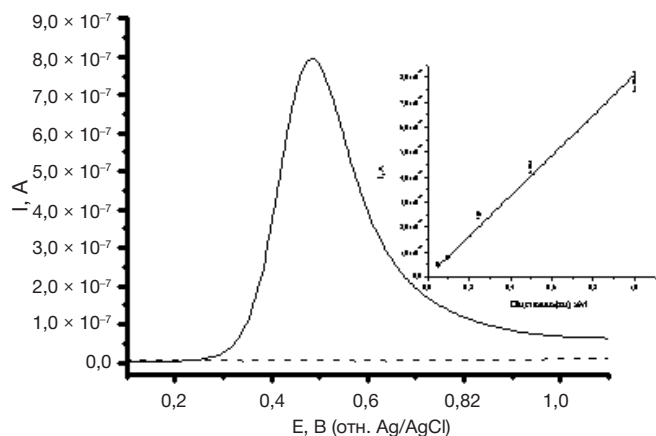


Рис. 1. Дифференциально-импульсная вольтамперограмма, полученная на ПГЭ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4, в отсутствие (---) и в присутствии (—) 1 мМ препарата А. Вставка: зависимость тока пика окисления от концентрации препарата А

трехконтактные печатные графитовые электроды (ПГЭ, «КолорЭлектроникс»; Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами, хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 0,2 см (площадь 0,0314 см²). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl).

В работе использовали следующие реактивы: однозамещенный фосфат калия («Реахим»; Россия), хлорид натрия («Реахим»; Россия), диклофенак натрия (субстанция, Sigma-Aldrich; Индия), ибупрофен натрия (субстанция, Sigma-Aldrich; Индия), ацетаминофен (лекарственная форма, «Фармстандарт-Лекарства»; Россия), мексидол (лекарственная форма, «Фармасофт»; Россия), сыворотка крови (S 1005-14, UsBiological; CLIA).

Растворы 10 мМ аналитов готовили в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,05 М NaCl, нужную концентрацию получали разведением в буфере и хранили при +4 °С.

Измерения проводили в режиме реального времени методами дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА) в диапазоне потенциалов 0–1,6 В, с шагом потенциала 0,01 В, частотой 25 Гц и циклической вольтамперометрии (ЦВА). Эксперименты выполняли в аэробных условиях при комнатной температуре. В горизонтальном положении на поверхность одноразового ПГЭ, покрывая рабочий электрод, вспомогательный и электрод сравнения, наносили 60 мкл анализируемого раствора лекарства (объем, необходимый для равномерного распределения

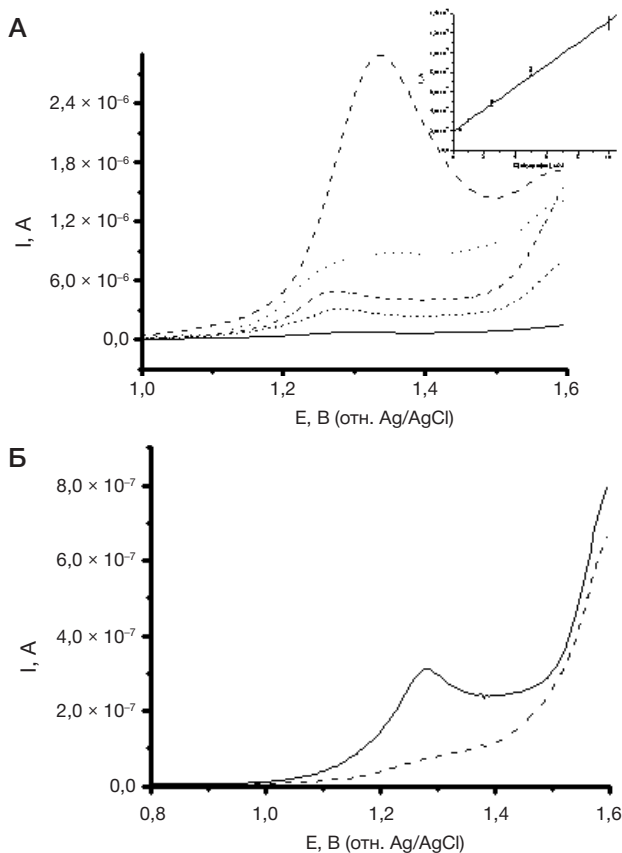


Рис. 2. А. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы препарата И, полученные на ПГЭ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4, в диапазоне концентраций 0,5 мМ – 10 мМ. Вставка: зависимость тока пика окисления от концентрации препарата И. **Б.** Дифференциально-импульсная вольтамперограмма, полученная на ПГЭ в отсутствие (---) и в присутствии (—) 1 мМ препарата И

Таблица. Электроаналитические характеристики лекарственных препаратов, полученные методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии на ПГЭ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4 ($n = 4-5$; $p = 0,95$)

Лекарство (производитель)	Линейный диапазон концентраций, М	Еок, В	Уравнение регрессии		R ²	Чувствительность, А/М	Предел обнаружения, М
			I, (A) = a × C(мМ) + b				
			a ± Δa	b ± Δb			
Препарат А (Фармстандарт-Лекарства)	5×10 ⁻⁵ –1×10 ⁻³	0,50 ± 0,03	(8,6 ± 0,5) ×10 ⁻⁷	–	0,985	8,6×10 ⁻⁴	2,9×10 ⁻⁵
Препарат И (Sigma-Aldrich)	5×10 ⁻⁴ –1×10 ⁻²	1,29 ± 0,02	(1,2 ± 0,1) ×10 ⁻⁷	(1,7 ± 0,2)×10 ⁻⁷	0,983	1,2×10 ⁻⁴	4,1×10 ⁻⁴
Препарат Д (Sigma-Aldrich)	5×10 ⁻⁵ –5×10 ⁻⁴	0,57 ± 0,05	(4,4 ± 0,5) ×10 ⁻⁷	(3,3 ± 0,6)×10 ⁻⁵	0,966	4,4×10 ⁻⁴	4,6×10 ⁻⁵

капли на электродах) [14]. Для оценки повторяемости результатов для каждой концентрации использовали не менее трех электродов.

Для расчета чувствительности и предела обнаружения строили зависимость тока пика окисления аналита от его концентрации. Полученные калибровочные зависимости использовали для расчета чувствительности (формула 1) и предела обнаружения (формула 2) [15]:

$$S = \Delta I / \Delta C \quad (1),$$

$$Cl_{lim} = 3,3\sigma / S \quad (2),$$

где S — чувствительность, I — ток, C — концентрация лекарства, Cl_{lim} — предел обнаружения, σ — остаточное стандартное отклонение (стандартное отклонение коэффициента b уравнений регрессии).

Для освобождения сыворотки крови от белковых компонентов 2,5 мл сыворотки помещали в стеклянную пробирку на 10 мл и добавляли 2,5 мл 15% (масс./об.) раствора сульфата цинка в ацетонитриле (50/40, об./об.) или 10%-ю трихлоруксусную кислоту (1 : 10). Пробирку встряхивали в течение 20 мин и выдерживали при 4 °С в течение 15 мин, после чего центрифугировали при 13 500 об./мин в течение 5 мин. Затем супернатанты отбрасывали, и раствор использовали для последующих анализов [16]. После осаждения белков сыворотку развели в 10 раз 0,1 М калий-фосфатным буфером, содержащим 50 мМ NaCl, pH 7,4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ключевым моментом электроанализа является обоснованный выбор типа электродов для наиболее

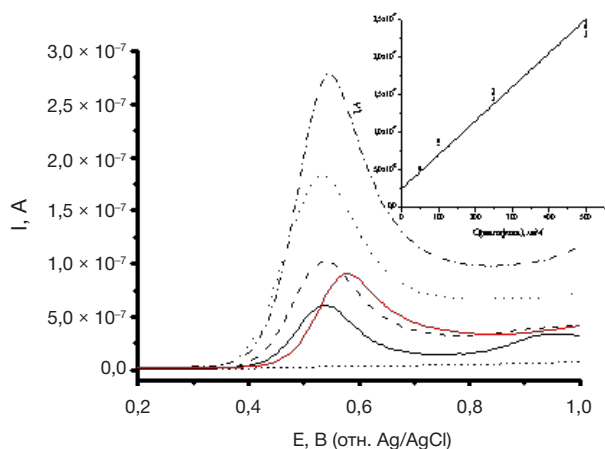


Рис. 3. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы препарата Д, полученные на ПГЭ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4, в диапазоне концентраций 50 мкМ – 500 мкМ, при концентрации 100 мкМ препарата Д в сыворотке крови (—) (после осаждения белков сыворотка была разведена в 10 раз 0,1 М калий-фосфатным буфером, 50 мМ NaCl, pH 7,4). Вставка: зависимость тока пика окисления от концентрации препарата Д

эффективного процесса переноса электронов и регистрации молекулы, биохимического события, каталитического тока как индикатора электрокатализа [17]. Показано, что модификация рабочей поверхности электродов наноматериалами (углеродными нанотрубками, графеном, оксидом графена, наночастицами металлов) способствует повышению аналитической чувствительности сенсора [6]. Однако модифицированные ПГЭ могут приобретать фоновые характеристики, затрудняющие прямую регистрацию электроокисления/электровосстановления [18]. Для немодифицированных ПГЭ фоновые характеристики в электролитном буфере не содержат нежелательных дополнительных сигналов и имеют довольно низкие значения регистрируемого тока [5]. Кроме того, немодифицированные электроды коммерчески доступны, воспроизводимость электрохимического метода анализа высока, что является необходимой составляющей дальнейшего практического использования сенсоров для анализа лекарственных средств и оценки их чистоты, в том числе в клинико-диагностических лабораториях. В связи с этим нами разработаны методы регистрации лекарственных препаратов с использованием именно немодифицированных графитовых рабочих поверхностей электродов.

Электроаналитические характеристики лекарственных препаратов

N-ацетил-пара-аминофенол, или препарат А — жаропонижающее и обезболивающее средство, обычно используемое при слабой и умеренной боли или для снижения температуры, в том числе при вирусных и бактериальных инфекциях [3]. Было показано, что

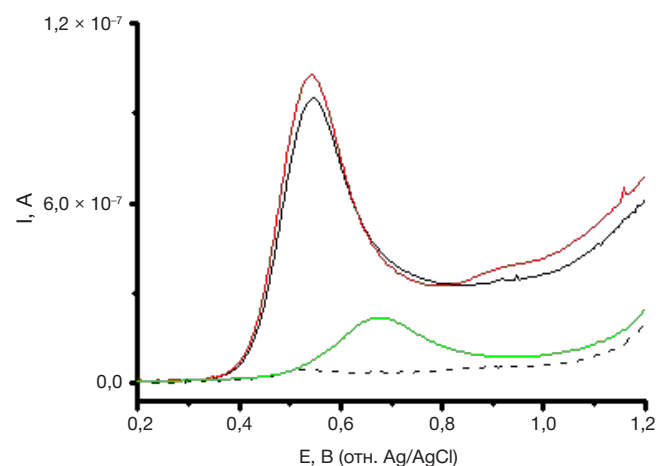


Рис. 4. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы, полученные на ПГЭ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4, в отсутствие (---) и в присутствии 98 мкМ препарата М (—), 100 мкМ препарата Д (—), 100 мкМ препарата Д + 98 мкМ препарата М (—)

N-ацетил-п-бензохинонимин (NAPQI) является основным продуктом окисления препарата А [3]. Механизм его обезболивающего действия связан с ингибированием синтеза простагландинов в центральной нервной системе [2, 3, 19].

На рис. 1 представлена дифференциально-импульсная вольтамперограмма 1 мМ препарата А, полученная в диапазоне потенциалов 0–1,2 В на немодифицированных ПГЭ. В аэробных условиях окисление препарата А происходит при потенциале $E_{ок}$, равном $0,50 \pm 0,03$ В (отн. Ag/AgCl). На вставке рисунка показан линейный рост величины тока пика окисления препарата А с ростом концентрации от 0,05 мМ до 1,00 мМ. Потенциал окисления препарата А был стабилен в пределах погрешности определения.

В таблице представлены электроаналитические характеристики (диапазон концентраций, потенциал окисления, уравнение зависимости тока пика окисления от концентрации, коэффициент достоверности аппроксимации R^2 , а также чувствительность электрохимической системы, рассчитанная по уравнению 1, и предел обнаружения препарата А, рассчитанный по уравнению 2.

(RS)-2-(4-изобутилфенил)-пропионовая кислота, или препарат И — нестероидный противовоспалительный препарат из группы производных пропионовой кислоты, обладает болеутоляющим и жаропонижающим действием [12, 13]. На рис. 2 представлены дифференциально-импульсные вольтамперограммы препарата И, полученные в диапазоне потенциалов 0,6–1,6 В и концентраций 0,5–10 мМ на ПГЭ. Реакция электроокисления 1 мМ препарата И происходит при высоких значениях потенциала ($1,29 \pm 0,02$ В (табл. 1).

(2-(2,6-дихлоранилин)-фенилуксусная кислота, или препарат Д — нестероидный противовоспалительный препарат из группы производных фенилуксусной кислоты, в лекарственных формах ее используют в виде натриевой соли. Имеет различные торговые названия, ее назначают при многих заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, различные воспалительные процессы [20, 21]. Проявляет анальгетические, противовоспалительные, а также противораковые свойства [21]. Препарат Д подвергается активному метаболизму под воздействием глюкурозилтрансферазы с образованием ацилглюкуронида диклофенака. Под воздействием цитохромов P450 подвергается окислительному метаболизму с образованием 4'-гидроксидиклофенака (катализируется цитохромом P450 2C9) и 5-гидроксидиклофенака (катализируется цитохромом P450 3A4) [22, 23].

В некоторых случаях этот препарат может вызывать нежелательные побочные реакции: желудочные кровотечения, повышение артериального давления у пациентов с синдромом Шая–Дрейджера и сахарным диабетом. При длительном приеме может развиваться инфаркт или инсульт [20]. В связи с этим анализ препарата Д остается актуальной задачей биоаналитической и фармакологической химии.

На рис. 3 представлены дифференциально-импульсные вольтамперограммы препарата Д, полученные на ПГЭ в диапазоне потенциалов 0,2–1,0 В и концентраций 50 мкМ – 500 мкМ. Потенциал окисления, равный $0,57 \pm 0,05$ В, был стабилен в пределах погрешности определения в исследованном диапазоне концентраций. Наблюдается линейная зависимость величины пика окисления от концентрации препарата Д (см. таблицу).

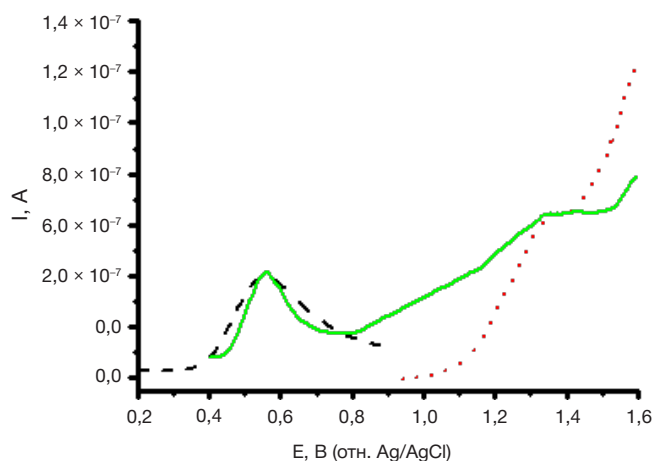


Рис. 5. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы, полученные на ПГЭ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 7,4, в присутствии 25 мкМ препарата Д (---), 200 мкМ препарата И (...), смеси 25 мкМ препаратов Д и 200 мкМ И (-)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для характеристики процессов электроокисления лекарств были использованы ЦВА в диапазоне скоростей сканирования 0,05–0,18 В/с. Результаты ЦВА продемонстрировали линейную зависимость токов пика окисления 1 мМ препарата А, 100 мкМ препарата Д и 5 мМ препарата И от корня квадратного скорости сканирования $v^{1/2}$ (рис. 2 (а), 4 (а), 6 (а) приложения), что свидетельствует о диффузионно-контролируемом процессе электроокисления лекарственных препаратов на немодифицированных ПГЭ в изученном диапазоне скоростей сканирования потенциала [24]. Наблюдается также линейная зависимость потенциалов пика окисления от логарифма скорости сканирования $\log v$ (рис. 2 (б), 4(б), 6(б) приложения), что характерно для необратимых электрохимических процессов. Это подтверждено методом ЦВА: наблюдается только пик окисления 1 мМ препарата А, 100 мкМ препарата Д и 5 мМ препарата И на немодифицированных ПГЭ (рис. 1, 3 и 5 приложения), что позволяет предположить необратимость электрохимических реакций. Эти результаты согласуются с механизмами электроокисления проанализированных препаратов [2, 3, 6, 19–22, 25–30].

В клинической фармакологии и терапии широко используют назначение больному одновременно несколько лекарственных препаратов (полипрагмазия). При полиморбидности (назначение двух и более препаратов) необходим контроль фармакокинетических и фармакодинамических параметров. Электроанализ на основе регистрации реакции электроокисления лекарственных средств позволяет одновременно детектировать несколько соединений. Такой подход применим для определения взаимного влияния лекарственных средств. Так, антиоксидантный метаболический препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин сукцинат, или препарат М), назначаемый для улучшения мозгового кровообращения, часто используют для различных групп пациентов с наличием сопутствующих заболеваний. С помощью ПГЭ были проанализированы комбинации препаратов Д + М (рис. 4), Д + И (рис. 5). Электроокисление препарата М регистрируется при потенциале $+0,67 \pm 0,06$ В (рис. 4). Однако препарат М (98 мкМ) практически не влияет на реакцию электроокисления препарата Д (100 мкМ). В смеси происходит незначительное смещение

потенциала окисления препарата Д в анодную область на 5 ± 2 мВ, что свидетельствует о более затрудненной реакции электроокисления. Ток пика электроокисления снижается несущественно ($\pm 6\%$), что позволяет количественно определять препарат Д в присутствии препарата М (рис. 4). На рис. 5 представлена ДИВА смеси 25 мкМ препарата Д и 200 мкМ препарата И на ПГЭ. Измерения проводили в диапазоне потенциалов 0–1,6 В. Четко регистрируется разделение пиков электроокисления препаратов Д ($E_{\text{ок}} = +0,54 \pm 0,02$ В) и И ($E_{\text{ок}} = +1,29 \pm 0,02$ В), при этом сохраняется концентрационная зависимость.

Препарат Д был определен методом электрохимического окисления и в образцах сыворотки крови. Концентрация препарата Д, добавленного в сыворотку крови, составляла 100 мкМ, зарегистрированная величина тока пика окисления — $7,5 \times 10^{-8}$ А (рис. 3). Как видно из вставки рис. 3 и калибровочной зависимости (см. таблицу), найденная по уравнению регрессии концентрация препарата Д составила 95 ± 5 мкМ.

ВЫВОДЫ

Разработан метод анализа лекарств с использованием коммерчески доступных взаимозаменяемых

немодифицированных электродов, получаемых методом трафаретной печати. Чувствительность метода соответствует терапевтически значимым диапазонам концентраций. Электроокисление лекарственных препаратов с использованием электрода как измерительного инструмента является эффективным аналитическим подходом для регистрации чистоты лекарственного средства, определения его концентрации, в том числе и в биологических жидкостях для терапевтического мониторинга. Методы количественного определения лекарственных препаратов на основе электроокисления могут быть применены для исследования каталитической активности ферментов, осуществляющих метаболические превращения I фазы, таких как цитохром P450, флавиносодержащие монооксигеназы, альдегид оксидазы, альдегид дегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, карбоксилэстеразы, и для анализа активности ферментов II фазы метаболических превращений: глюкоронозилтрансферазы, сульфотрансферазы, глутатионтрансферазы. Метод применим также для регистрации сравнительных кинетических параметров полиморфных вариантов, а также генно-инженерных форм ферментов с целью разработки технологически важных изоформ биокатализаторов.

Литература

1. Ahuja S, Dong MW. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Elsevier, Amsterdam, 2005; 679 p.
2. Akbari M, Shayani-Jam H, Yaftian MR, Parinejad M. Electrochemical oxidation of acetaminophen in the presence of diclofenac and piroxicam — Synthesis of new derivatives and kinetic investigation of toxic quinone imine/drugs interactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2018; 827: 160–6. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2018.09.021.
3. Cernat A, Tertis M, Sandulescu R, Bedioui F, Cristea A, Cristea C. Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 886: 16–28. DOI: 10.1016/j.aca.2015.05.044.
4. Shumyantseva VV, Bulko TV, Kuzikov AV, Masamreh RA, Konyakhina AY, Romanenko I, et al. All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450. *Electrochimica Acta*. 2020; 336: 135579. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135579.
5. Kuzikov AV, Filippova TA, Masamreh RA, Shumyantseva VV. Electrochemical determination of (S)-7-hydroxywarfarin for analysis of CYP2C9 catalytic activity. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2022; 904: 115937. DOI: 10.1016/j.jelechem.2021.115937.
6. Qian L, Durairaj S, Prins S, Chen A. Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021; 175: 112836. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112836.
7. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*. 2018; 19 (1): 38–54. DOI: 10.2174/1389450118666170125144557.
8. Hamadeh IS, Patel JN, Rusin S, Tan AR. Personalizing aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2018; 70: 47–55. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.07.014.
9. Zhu Y, Liu X, Jia J. Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode. *Analytical Methods*. 2015; 7: 8626–31. DOI: 10.1039/C5AY01833A.
10. Moraes FC, Rossi B, Donatoni MC, de Oliveira KT, Pereira EC. Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 881: 37–43. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.043.
11. Lin X, Li Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006; 22 (2): 253–9. DOI: 10.1016/j.bios.2006.01.005.
12. Hu S, Wu K, Yi H, Cui D. Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Analytica Chimica Acta*. 2002; 464 (2): 209–16. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00496-8.
13. Kuzikov AV, Masamreh RA, Filippova TA, Haurychenka YI, Gilep AA, Shkel TV, et al. Electrochemical oxidation of estrogens as a method for CYP19A1 (aromatase) electrocatalytic activity determination. *Electrochimica Acta*. 2020; 333: 135539. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135539.
14. Kulyk J, D'Costa EJ. Printed amperometric sensor based on TCN and cholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*. 1991; 6 (2): 109. DOI: 10.1016/0956-5663(91)87034-9.
15. Patel M, Patel DA, Gajra B. Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH-Q2B. *International journal of review article pharmaceutical innovations*. 2011; 1 (2): 45.
16. Jalalvand AR. A study originated from combination of electrochemistry and chemometrics for investigation of the inhibitory effects of ciprofloxacin as a potent inhibitor on cytochrome P450. *Microchemical Journal*. 2020; 157: 105104. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105104.
17. Shumyantseva VV, Agafonova LE, Bulko TV, Kuzikov AV, Masamreh RA, Yuan J, et al. Electroanalysis of Biomolecules: Rational Selection of Sensor Construction. *Biochemistry (Moscow)*. 2021; 86: 140–51. DOI: 10.1134/S0006297921140108.
18. Hasoň S, Fořta M, Ostatná V. Label-free electrochemical analysis of purine nucleotides and nucleobases at disposable carbon electrodes in microliter volumes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2019; 847 (15): 113252. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2019.113252.
19. Fan Y, Liu JH, Lu HT, Zhang Q. Electrochemical behavior and voltammetric determination of paracetamol on Nafion/TiO₂-graphene modified glassy carbon electrode. *Colloids and surfaces. B: Biointerfaces*. 2011; 85 (2): 289–92. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.041.
20. Pandey SK, Yadav S, Goel Y, Temre MK, Singh VK, Singh SM. Molecular docking of anti-inflammatory drug diclofenac with

- metabolic targets: Potential applications in cancer therapeutics. *Journal of Theoretical Biology*. 2019; 465 (21): 117–25. DOI: 10.1016/j.jtbi.2019.01.020.
21. Arisan ED, Akar RO, Rencuzogullari O, Yerlikaya OP, Gurkan AC, Akin B, et al. The molecular targets of diclofenac differs from ibuprofen to induce apoptosis and epithelial mesenchymal transition due to alternation on oxidative stress management p53 independently in PC3 prostate cancer cells. *Prostate International*. 2019; 7 (4): 156–65. DOI: 10.1016/j.pnrl.2019.09.003.
 22. Lazarska KE, Dekker SJ, Vermeulen NPE, Commandeur JNM. Effect of UGT2B7*2 and CYP2C8*4 polymorphisms on diclofenac metabolism. *Toxicology Letters*. 2018; 284: 70–8. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.11.038.
 23. Nakanishi K, Uehara S, Kusama T, Inoue T, Shimura K, Kamiya Y, et al. In vivo and in vitro diclofenac 5-hydroxylation mediated primarily by cytochrome P450 3A enzymes in common marmoset livers genotyped for P450 2C19 variants. *Biochemical Pharmacology*. 2018; 152: 272–8. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.002.
 24. Mohammadi A, Moghaddam A, Alikhani E, Eilkhaniyadeh K, Mozaffari S. Electrochemical quantification of fluoxetine in pharmaceutical formulation using carbon nanoparticles. *Micro & Nano Letters*. 2013; 8 (12): 853–7. DOI: 10.1049/MNL.2013.0671.
 25. Goodarzi M, Khalilzade M, Karimi F, Gupta V, Keyvanfar M, Bagheri H, et al. Square wave voltammetric determination of diclofenac in liquid phase using a novel ionic liquid multiwall carbon nanotubes paste electrode. *Journal of Molecular Liquids*. 2014; 197: 114–9. DOI: 10.1016/J.MOLLIQ.2014.04.037.
 26. Sarhangzadeh K, Khatami AA, Jabbari M, Bahari S. Simultaneous determination of diclofenac and indomethacin using a sensitive electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and ionic liquid nanocomposite. *Journal of Applied Electrochemistry*. 2013; 43: 1217–24. DOI: 10.1007/s10800-013-0609-3.
 27. Karuppiach C, Cheemalapati S, Chen S, Palanisamy S. Carboxyl-functionalized graphene oxide-modified electrode for the electrochemical determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Ionics*. 2015; 21: 231–8. DOI: 10.1007/s11581-014-1161-9.
 28. Shalauddin M, Akhter S, Basirun WJ, Bagheri S, Anuar NS, Johan MR. Hybrid nanocellulose/f-MWCNTs nanocomposite for the electrochemical sensing of diclofenac sodium in pharmaceutical drugs and biological fluids. *Electrochimica Acta*. 2019; 304: 323–33. DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2019.03.003.
 29. Jiokeng SLZ, Tonle IK, Walcarus A. Amino-attapulgitite/mesoporous silica composite films generated by electroassisted self-assembly for the voltammetric determination of diclofenac. *Sensors and Actuators B Chemical*. 2019; 287: 296–305. DOI: 10.1016/j.snb.2019.02.038.
 30. Karikalan N, Karthik R, Chen Sh-M, Velmurugan M, Karuppiach Ch. Electrochemical properties of the acetaminophen on the screen printed carbon electrode towards the high performance practical sensor applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016; 483: 109–17. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.08.028.

References

1. Ahuja S, Dong MW. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Elsevier, Amsterdam, 2005; 679 p.
2. Akbari M, Shayan-Jam H, Yafian MR, Parinejad M. Electrochemical oxidation of acetaminophen in the presence of diclofenac and piroxicam — Synthesis of new derivatives and kinetic investigation of toxic quinone imine/drugs interactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2018; 827: 160–6. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2018.09.021.
3. Cernat A, Tertis M, Sandulescu R, Bedioui F, Cristea A, Cristea C. Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 886: 16–28. DOI: 10.1016/j.aca.2015.05.044.
4. Shumyantseva VV, Bulko TV, Kuzikov AV, Masamrekh RA, Konyakhina AY, Romanenko I, et al. All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytic conversion by cytochromes P450. *Electrochimica Acta*. 2020; 336: 135579. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135579.
5. Kuzikov AV, Filippova TA, Masamrekh RA, Shumyantseva VV. Electrochemical determination of (S)-7-hydroxywarfarin for analysis of CYP2C9 catalytic activity. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2022; 904: 115937. DOI: 10.1016/j.jelechem.2021.115937.
6. Qian L, Durairaj S, Prins S, Chen A. Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021; 175: 112836. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112836.
7. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*. 2018; 19 (1): 38–54. DOI: 10.2174/1389450118666170125144557.
8. Hamadeh IS, Patel JN, Rusin S, Tan AR. Personalizing aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2018; 70: 47–55. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.07.014.
9. Zhu Y, Liu X, Jia J. Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode. *Analytical Methods*. 2015; 7: 8626–31. DOI: 10.1039/C5AY01833A.
10. Moraes FC, Rossi B, Donatoni MC, de Oliveira KT, Pereira EC. Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 881: 37–43. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.043.
11. Lin X, Li Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006; 22 (2): 253–9. DOI: 10.1016/j.bios.2006.01.005.
12. Hu S, Wu K, Yi H, Cui D. Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Analytica Chimica Acta*. 2002; 464 (2): 209–16. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00496-8.
13. Kuzikov AV, Masamrekh RA, Filippova TA, Haurychenka YI, Gilep AA, Shkel TV, et al. Electrochemical oxidation of estrogens as a method for CYP19A1 (aromatase) electrocatalytic activity determination. *Electrochimica Acta*. 2020; 333: 135539. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135539.
14. Kulys J, D'Costa EJ. Printed amperometric sensor based on TCNQ and cholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*. 1991; 6 (2): 109. DOI: 10.1016/0956-5663(91)87034-9.
15. Patel M, Patel DA, Gajra B. Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH-Q2B. *International journal of review article pharmaceutical innovations*. 2011; 1 (2): 45.
16. Jalalvand AR. A study originated from combination of electrochemistry and chemometrics for investigation of the inhibitory effects of ciprofloxacin as a potent inhibitor on cytochrome P450. *Microchemical Journal*. 2020; 157: 105104. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105104.
17. Shumyantseva VV, Agafonova LE, Bulko TV, Kuzikov AV, Masamrekh RA, Yuan J, et al. Electroanalysis of Biomolecules: Rational Selection of Sensor Construction. *Biochemistry (Moscow)*. 2021; 86: 140–51. DOI: 10.1134/S0006297921140108.
18. Hasoň S, Fojta M, Ostatná V. Label-free electrochemical analysis of purine nucleotides and nucleobases at disposable carbon electrodes in microliter volumes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2019; 847 (15): 113252. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2019.113252.
19. Fan Y, Liu JH, Lu HT, Zhang Q. Electrochemical behavior and voltammetric determination of paracetamol on Nafion/TiO₂-graphene modified glassy carbon electrode. *Colloids and surfaces. B: Biointerfaces*. 2011; 85 (2): 289–92. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.041.
20. Pandey SK, Yadav S, Goel Y, Temre MK, Singh VK, Singh SM. Molecular docking of anti-inflammatory drug diclofenac with metabolic targets: Potential applications in cancer therapeutics. *Journal of Theoretical Biology*. 2019; 465 (21): 117–25. DOI: 10.1016/j.jtbi.2019.01.020.
21. Arisan ED, Akar RO, Rencuzogullari O, Yerlikaya OP, Gurkan AC,

- Akın B, et al. The molecular targets of diclofenac differs from ibuprofen to induce apoptosis and epithelial mesenchymal transition due to alternation on oxidative stress management p53 independently in PC3 prostate cancer cells. *Prostate International*. 2019; 7 (4): 156–65. DOI: 10.1016/j.pnil.2019.09.003.
22. Lazarska KE, Dekker SJ, Vermeulen NPE, Commandeur JNM. Effect of UGT2B7*2 and CYP2C8*4 polymorphisms on diclofenac metabolism. *Toxicology Letters*. 2018; 284: 70–8. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.11.038.
 23. Nakanishi K, Uehara S, Kusama T, Inoue T, Shimura K, Kamiya Y, et al. In vivo and in vitro diclofenac 5-hydroxylation mediated primarily by cytochrome P450 3A enzymes in common marmoset livers genotyped for P450 2C19 variants. *Biochemical Pharmacology*. 2018; 152: 272–8. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.002.
 24. Mohammadi A, Moghaddam A, Alikhani E, Eilkanizadeh K, Mozaffari S. Electrochemical quantification of fluoxetine in pharmaceutical formulation using carbon nanoparticles. *Micro & Nano Letters*. 2013; 8(12): 853–7. DOI: 10.1049/MNL.2013.0671.
 25. Goodarzian M, Khalilzade M, Karimi F, Gupta V, Keyvanfar M, Bagheri H, et al. Square wave voltammetric determination of diclofenac in liquid phase using a novel ionic liquid multiwall carbon nanotubes paste electrode. *Journal of Molecular Liquids*. 2014; 197: 114–9. DOI: 10.1016/J.MOLLIQ.2014.04.037.
 26. Sarhangzadeh K, Khatami AA, Jabbari M, Bahari S. Simultaneous determination of diclofenac and indomethacin using a sensitive electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and ionic liquid nanocomposite. *Journal of Applied Electrochemistry*. 2013; 43: 1217–24. DOI: 10.1007/s10800-013-0609-3.
 27. Karuppiyah C, Cheemalapati S, Chen S, Palanisamy S. Carboxyl-functionalized graphene oxide-modified electrode for the electrochemical determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Ionics*. 2015; 21: 231–8. DOI: 10.1007/s11581-014-1161-9.
 28. Shalauddin M, Akhter S, Basirun WJ, Bagheri S, Anuar NS, Johan MR. Hybrid nanocellulose/f-MWCNTs nanocomposite for the electrochemical sensing of diclofenac sodium in pharmaceutical drugs and biological fluids. *Electrochimica Acta*. 2019; 304: 323–33. DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2019.03.003.
 29. Jiokeng SLZ, Tonle IK, Walcarius A. Amino-attapulgite/mesoporous silica composite films generated by electroassisted self-assembly for the voltammetric determination of diclofenac. *Sensors and Actuators B Chemical*. 2019; 287: 296–305. DOI: 10.1016/j.snb.2019.02.038.
 30. Karikalan N, Karthik R, Chen Sh-M, Velmurugan M, Karuppiyah Ch. Electrochemical properties of the acetaminophen on the screen printed carbon electrode towards the high performance practical sensor applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016; 483: 109–17. DOI:10.1016/j.jcis.2016.08.028.

ВИЗУАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НИГРОСОМЫ-1 В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И ЭССЕНЦИАЛЬНОГО ТРЕМОРА

А. Н. Москаленко , А. С. Филатов, Е. Ю. Федотова, Р. Н. Коновалов, С. Н. Иллариошкин


Научный центр неврологии, Москва, Россия

Дифференциальная диагностика болезни Паркинсона и фенотипически схожего двигательного расстройства — эссенциального тремора, особенно в дебюте заболевания, остается одной из нерешенных задач современной неврологии. Целью исследования было оценить диагностическую значимость визуализации нигросом — кластеров дофаминергических нейронов в черной субстанции (ЧС) среднего мозга, выявляемых при использовании SWI-режима высокоразрешающей магнитно-резонансной томографии (3 Тесла), у 20 пациентов с болезнью Паркинсона и у 10 пациентов с эссенциальным тремором. Визуальный анализ изображений нигросомы-1 проводили с использованием четырехчленной порядковой шкалы. Различия по гендерному, возрастному составу и продолжительности заболевания рассчитывали с помощью точного критерия Фишера, U-критерия Манна-Уитни. Для расчета диагностической ценности данной методики использовали критерий χ^2 Пирсона. У пациентов с болезнью Паркинсона в 70% случаев наблюдали одно- или двустороннее исчезновение нигросомы-1. Еще у двух пациентов с болезнью Паркинсона (10%) выявили менее специфичные изменения черной субстанции — уменьшение объема нигросомы-1. Напротив, у всех пациентов с эссенциальным тремором (100%) нигросома-1 оставалась сохранной с двух сторон ($p < 0,001$). Полученные предварительные результаты демонстрируют высокий потенциал методики визуального анализа нигросомы-1 в дифференциальной диагностике болезни Паркинсона и эссенциального тремора.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, эссенциальный тремор, нигросома-1, магнитно-резонансная томография, SWI-режим

Вклад авторов: А. Н. Москаленко — клиническая оценка, сбор, анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка рукописи; А. С. Филатов — анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; Р. Н. Коновалов — анализ и интерпретация данных, планирование и руководство исследованием; Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин — планирование и руководство исследованием.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 2-5/20 от 18 марта 2020 г.); все участники подписали добровольное согласие на участие в данном исследовании.

 **Для корреспонденции:** Анна Николаевна Москаленко
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва, 125367, Россия; anna_nik_kern@rambler.ru

Статья получена: 22.12.2021 **Статья принята к печати:** 18.01.2022 **Опубликована онлайн:** 30.01.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.002

VISUAL ANALYSIS OF NIGROSOME-1 IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PARKINSON'S DISEASE AND ESSENTIAL TREMOR

Moskalenko AN , Filatov AS, Fedotova EYu, Konovalov RN, Illarioshkin SN


Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Differentiation between Parkinson's disease, especially in its early stages, and essential tremor, which is a phenotypically similar movement disorder, still remains an unsolved challenge for neurology. The aim of this study was to assess the diagnostic significance of nigrosome imaging (nigrosomes are dopaminergic neuron clusters in the substantia nigra of the midbrain) using 3T high-resolution SW-MRI. The study was conducted in 20 patients with Parkinson's disease and 10 patients with essential tremor. Visual analysis of the acquired nigrosome-1 images was performed using a 4-point ordinal rating scale. Differences in sex, age and duration of the disease were calculated using the Fisher exact test and the Mann-Whitney U test. The diagnostic value of the method was assessed using Pearson's chi-squared test. Nigrosome-1 was bilaterally or unilaterally absent in 70% of parkinsonian patients. Less specific changes to the substantia nigra (SN) were observed in two more parkinsonian patients (10%), whose nigrosome-1 appeared reduced in size. By contrast, nigrosome-1 was bilaterally intact in all patients (100%) with essential tremor ($p < 0.001$). Our preliminary findings demonstrate the high potential of noninvasive nigrosome-1 imaging in the differential diagnosis of Parkinson's disease and essential tremor.

Keywords: Parkinson's disease, essential tremor, nigrosome-1, magnetic resonance imaging, SWI

Author contribution: Moskalenko AN — clinical assessment, data acquisition and interpretation, literature analysis, manuscript preparation; Filatov AS — data analysis and interpretation, manuscript preparation; Konovalov RN — data analysis and interpretation, study planning and supervision; Fedotova EYu, Illarioshkin SN — study planning and supervision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (Protocol № 2-5/20 dated March 18, 2020). Informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Anna N. Moskalenko
Volokolamskoe sh., 80, Moscow, 125367, Russia; anna_nik_kern@rambler.ru

Received: 22.12.2021 **Accepted:** 18.01.2022 **Published online:** 30.01.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.002

Болезнь Паркинсона (БП) и эссенциальный тремор (ЭТ) — широко распространенные двигательные расстройства, наиболее часто встречающиеся среди лиц старшей возрастной группы [1, 2]. В настоящее время диагноз обоих заболеваний является клиническим и основывается на совокупности их характерных неврологических проявлений. Так, согласно критериям диагностики БП, разработанных советом экспертов Международного общества по изучению расстройств движений в 2015 г., при

наличии у пациента гипокинезии в сочетании с тремором покоя и/или мышечной ригидностью, наряду с наличием поддерживающих критериев и отсутствием абсолютных исключающих критериев, можно установить клинически достоверную или возможную БП [3]. Необходимо отметить, что помимо моторных проявлений, клиническая картина БП представлена немоторными симптомами, которые могут проявляться задолго до двигательных расстройств и прогрессировать по мере развития болезни [4].

В свою очередь, ЭТ, согласно новым критериям, разработанных экспертами Международного общества по изучению расстройств движений в 2017 г., определяется как синдром изолированного тремора продолжительностью не менее 3 лет, вовлекающего верхние конечности в момент движения, с тремором в других сегментах тела или без него [5]. Нередко на практике встречаются пациенты, клиническая картина заболевания которых выходит за рамки ЭТ и представлена такими дополнительными неврологическими проявлениями, как тремор покоя, нарушение тандемной ходьбы и т.д. Подобные случаи классифицируют как «ЭТ-плюс». Кроме двигательных нарушений, у многих пациентов с ЭТ описаны различные немоторные симптомы [2], которые обычно не обладают определенной клинической значимостью, но вызывают ряд сложностей при дифференцировании ЭТ и БП.

Полезными инструментами дифференциальной диагностики указанных двигательных расстройств являются методы радиоизотопной визуализации, например позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и однофотонно-эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), а также транскраниальная сонография (ТКС). Перечисленные методы позволяют оценить состояние черной субстанции (ЧС), которая является ключевой структурой-мишенью нейродегенеративного процесса при БП и остается сохранной при ЭТ [6, 7]. Однако наличие ряда объективных ограничений данных методов существенно осложняет их использование в неврологической клинической практике.

Применение магнитно-резонансной томографии (МРТ) для диагностики БП и проведения дифференциальной диагностики с недегенеративными формами паркинсонизма стало возможным по мере распространения высокопольных МР-томографов и дополнения стандартного протокола МР-исследования дополнительными режимами.

Известно, что дофаминергические нейроны ЧС организованы в особые клеточные кластеры — нигросомы [8]. При проведении МРТ высокого разрешения в режиме SWI (изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости) нигросома-1, самая крупная из пяти описанных нигросом, представляет собой зону овальной формы слабо повышенной интенсивности МР-сигнала, расположенную в дорсальной части ЧС. Нигросома-1 разделяет ЧС на две доли, что внешне напоминает «ласточкин хвост», поэтому указанный МРТ-признак получил название «симптом ласточкиного хвоста» [9]. В последнее время показано, что локализация гиперинтенсивного сигнала нигросомы-1 внутри окружающих гипоинтенсивных структур ЧС может быть достаточно вариабельной и не всегда соответствует профилю «ласточкина хвоста» [10]. При БП наблюдается потеря дорсолатеральной нигральной гиперинтенсивности вследствие вовлечения нигросомы-1 в нейродегенеративный патологический процесс [9, 11]. Структурно-функциональные изменения при ЭТ описаны в мозжечке и в стволе головного мозга (преимущественно в голубом пятне) [12]. Несмотря на противоречивые результаты патоморфологических исследований и малоизученный патогенез ЭТ в целом, достоверных данных о наличии выраженных дегенеративных изменений ЧС, сопоставимых с таковыми при БП, не получено. Поэтому целью работ, проведенных отдельными группами зарубежных исследований, являлось определение диагностической значимости визуальной оценки изображений нигросомы-1 в

дифференциальной диагностике БП с ЭТ. Полученные результаты продемонстрировали высокие чувствительность и специфичность данной методики, что наравне с отсутствием необходимости в постпроцессинговой обработке изображений делает этот метод доступным и эффективным для применения в клинической практике [13, 14].

Ранее не проводили исследования, касающиеся анализа описанного нейровизуализационного паттерна изменений ЧС при двигательных расстройствах на российской группе пациентов. Целью работы было оценить дифференциально-диагностическую роль потери дорсолатеральной нигральной гиперинтенсивности в качестве биомаркера при сопоставлении БП с фенотипически схожим двигательным расстройством — ЭТ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники

Набор участников для проведения данного исследования осуществлялся из пациентов, находящихся как на стационарном, так и на амбулаторном лечении в ФГБНУ НЦН в период с января по октябрь 2020 г. В исследование были включены 20 пациентов с дрожательной/смешанной формой БП (1-я группа) и 10 пациентов с ЭТ (2-я группа). Диагноз устанавливали на основании действующих критериев для каждого заболевания. Стадийность БП определяли с помощью функциональной шкалы Hoehn-Yahr: 40% пациентов были с 1-й стадией ($n = 8$), 30% пациентов — со 2-й стадией ($n = 6$), 30% пациентов — с 3-й стадией ($n = 6$). Все участники подписали добровольное информированное согласие на обследование и обработку персональных данных.

Критерии исключения из исследования: другие неврологические/психические заболевания в анамнезе; злоупотребление психоактивными веществами, алкоголем; прием треморогенных препаратов; метаболические нарушения, ассоциированные с тремором; выявление у пациента структурных повреждений головного мозга (опухоль, инфаркт, последствия черепно-мозговой травмы) и наличие артефактов, мешающих дальнейшему анализу МРТ-изображений; возраст менее 18 лет и старше 80 лет.

Протокол МРТ и анализ полученных изображений

Протокол визуализации

Все МРТ-изображения получены на томографе с величиной магнитной индукции 3 Тесла (Siemens MAGNETOM Verio) с использованием 8-канальной головной катушки. Для визуализации нигросомы-1 использовали протокол, включающий в себя режим SWI со следующими параметрами: TR — 27 мс, TE — 20 мс, толщина среза — 1,5 мм, dist. factor — 20%, FoV — 172×230 мм², время — 2 мин 59 с. Кроме этого, были получены изображения в режимах T2, T1 MPR, T2 FLAIR и DWI с целью исключения других причин паркинсонизма. Плоскость аксиальных срезов была параллельна линии, соединяющей переднюю и заднюю спайку с захватом всех структур головного мозга.

Качественный анализ полученных изображений

На полученных МР-изображениях нигросома-1 выглядела как зона овальной формы слабо повышенной интенсивности МР-сигнала в режиме SWI, расположенная в дорсальной

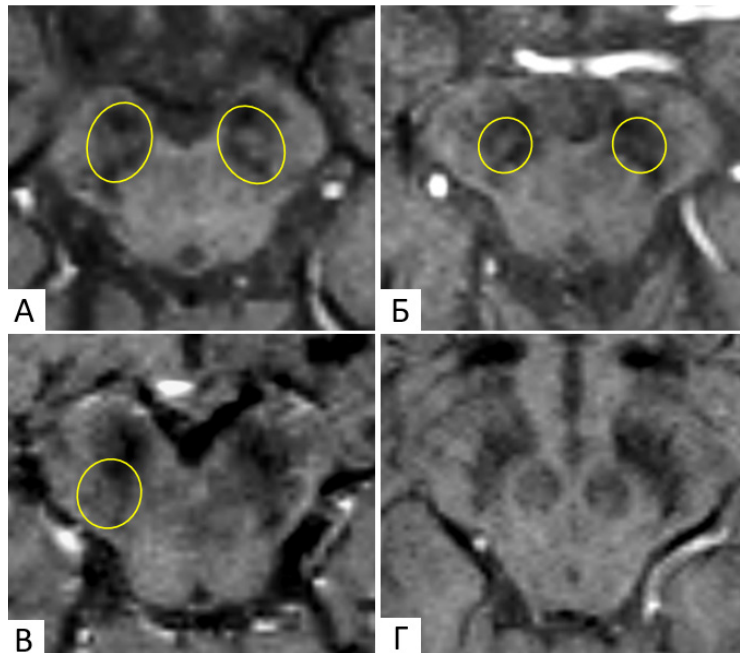


Рис. 1. МРТ, режим SWI, аксиальная плоскость, срезы проходят через ножки мозга. Черная субстанция имеет пониженную интенсивность МР-сигнала в режиме SWI, тогда как нигросомы-1 (обведены желтыми линиями) имеют слабо повышенную интенсивность МР-сигнала. Представлены различные паттерны визуализации нигросомы-1 у пациентов с БП (А — 0 баллов, Б — 1 балл (уменьшение объема нигросомы-1 слева), В — 2 балла, Г — 3 балла)

части гипоинтенсивного участка среднего мозга (ЧС). Визуальный анализ изображений нигросомы-1 проводили с использованием четырехчленной порядковой шкалы по следующим критериям: 0 баллов — норма (нигросома-1 визуализируется с двух сторон), 1 балл — неинформативное в диагностическом отношении изображение (нечеткая одно/двусторонняя визуализация или уменьшение объема (неполное исчезновение) нигросомы-1), 2 балла — патология (отсутствие нигросомы-1 с одной стороны), 3 балла — патология (отсутствие нигросомы-1 с двух сторон). Для наглядности представлены МРТ-изображения четырех пациентов с разным паттерном визуализации нигросомы-1 (рис. 1). Качественный анализ проводили два специалиста в области лучевой диагностики независимо друг от друга, без доступа к персональным данным пациентов. В случае возникновения значимых противоречий в заключениях, полученных двумя экспертами, окончательное решение принимали в пользу заключения специалиста с большим стажем работы.

Статистический анализ

Полученные результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, Iq, uq). Для сравнения демографических данных двух групп (пол, возраст, длительность заболевания) использовали точный критерий Фишера и U-критерий Манна-Уитни. Сравнение рейтингового распределения визуализации нигросомы-1

в зависимости от вида нозологии проводили с помощью критерия хи-квадрата Пирсона. Для всех статистических тестов использовали двусторонний критический уровень значимости $p < 0,05$. Анализ данных выполняли с помощью программы StatTech v1.1.0, SPSS Statistics.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Демографические данные

Среди пациентов с БП и ЭТ не выявили существенных различий по гендерному и возрастному составу ($p = 0,246$, $p = 0,082$). Продолжительность болезни была значительно больше среди пациентов с ЭТ по сравнению с пациентами с БП ($p < 0,003$). Анализ зависимости заболевания от пола проводили с помощью точного критерия Фишера, зависимости возраста и длительности заболевания — с помощью U-критерия Манна-Уитни. Демографические данные всех участников исследования представлены в таблице.

Данные нейровизуализации

У всех пациентов с ЭТ нигросома-1 четко визуализировалась с обеих сторон ($n = 10$), соответственно, всем представителям 2-й группы присвоили 0 баллов (100%).

Среди пациентов с БП отсутствие нигросомы-1 зарегистрировали у 70% участников исследования ($n = 14$),

Таблица. Демографические данные участников исследования

Показатель	Категории / Единицы измерения	Заболевание		p
		БП	ЭТ	
Пол, абс. (%)	Женщины	11 (55)	8 (80)	0,246
	Мужчины	9 (45)	2 (20)	
Возраст, Ме [Q_1 – Q_3]	Полных лет	60 [52,25–66,5]	73,5 [58,5–77,25]	0,082
Длительность заболевания, Ме [Q_1 – Q_3]	Полных лет	3 [2–6,5]	10 [8,5–15,75]	0,003

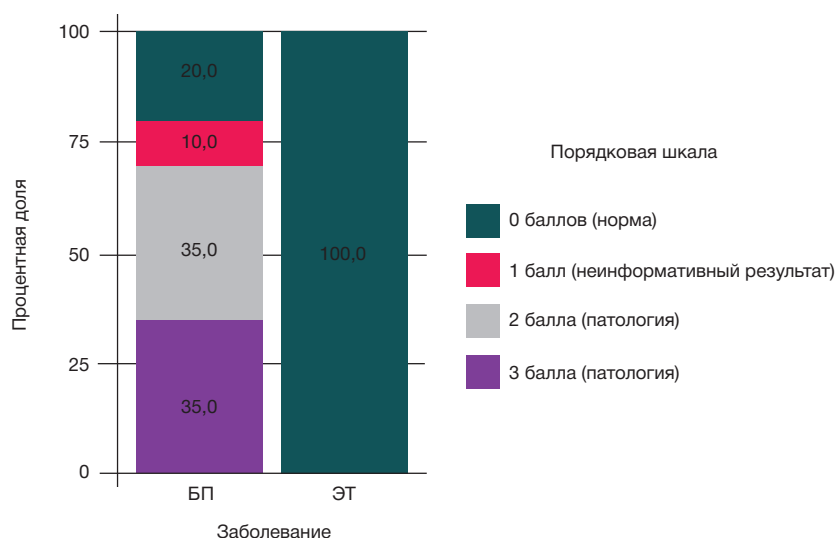


Рис. 2. Анализ зависимости полученных результатов при визуализации нигросомы-1 от заболевания

при этом соотношение одно- и двусторонней потери дорсолатеральной нигральной интенсивности составило 1 : 1. Соответственно, семи пациентам с БП присвоили 2 балла (35%), семи пациентам — 3 балла (35%).

Нигросомы оказались сохранными (0 баллов) у четырех пациентов с БП (20%), а оставшимся двум пациентам (10%) присвоили 1 балл, поскольку в ходе качественного анализа у них отмечали одностороннее уменьшение объема нигросомы-1, что рассматривалось нами как малоинформативный диагностический результат. При сравнении двух групп выявили значительную разницу в процентном соотношении результатов ($p < 0,001$ при использовании критерия χ^2 Пирсона).

Таким образом, показана высокая диагностическая значимость визуализации нигросомы-1 при дифференцировании БП и ЭТ: чувствительность и специфичность данного метода составили 70% и 100% соответственно. Полученные результаты представлены на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В неврологической практике диагностика БП на ранних стадиях, а также дифференцирование данной патологии с клинически схожими заболеваниями нередко вызывает ряд определенных трудностей. Целью данного исследования являлась оценка значимости визуализации нигросомы-1 ЧС в дифференциальной диагностике БП и ЭТ.

С момента открытия неоднородности структуры компактной части ЧС (подразделение на нигросомы и матрикс в соответствии со специфическими свойствами иммуногистохимического окрашивания), а также патоморфологически подтвержденной стадийности вовлечения нигросом в нейродегенеративный процесс при БП прошло более 20 лет [8, 15]. Неинвазивная визуализация нигросомы-1 стала возможна только с распространением высокопольных томографов и дополнением стандартного протокола МР-исследования головного мозга режимом SWI [9, 16]. SWI (Susceptibility Weighted Imaging) — трехмерная импульсная последовательность МРТ, с помощью которой получают изображения, взвешенные по неоднородности магнитного поля. Основным принцип данной методики заключается в том, что такие вещества, как железо, кальций, дезоксигемоглобин, способны усиливать локальное магнитное поле, и, следовательно,

создавать положительный фазовый сдвиг по сравнению с окружающими тканями головного мозга. Ткани, содержащие данные парамагнитные вещества, на SWI-томограммах представлены как участки с гипоинтенсивным МР-сигналом [17, 18].

У здоровых людей ЧС на МРТ-изображениях в режиме SWI представлена как гипоинтенсивный участок среднего мозга, дорсально разделенный на две части зоной овальной формы слабо гиперинтенсивного МР-сигнала. Гистопатологическое исследование подтвердило, что эта дорсолатеральная нигральная гиперинтенсивность соответствует нигросоме-1, а повышение сигнала, вероятно, связано с низким содержанием железа в этой области, по сравнению с окружающей ее ЧС [19].

При БП наблюдается отсутствие визуализации нигросомы-1, что может быть связано не только с утратой дофаминергических нейронов, но и с параллельно протекающим процессом значительного накопления железа [20, 21]. Потеря дорсолатеральной нигральной гиперинтенсивности рассматривается в настоящее время как один из наиболее перспективных биомаркеров БП. Так, согласно результатам недавно проведенного метаанализа, диагностическая точность визуализации нигросомы-1 при дифференцировании пациентов с идиопатической БП от здоровых лиц обладает высокими чувствительностью и специфичностью [22].

Оценка информативности данного нейровизуализационного маркера при дифференцировании БП от ЭТ проводилась в двух исследованиях, опубликованных в 2019 г. Jin L. и соавторы проанализировали МРТ-изображения 68 пациентов с БП, 25 пациентов с ЭТ и 34 пациента из группы контроля и показали высокую чувствительность и специфичность (79,4 и 92,0% соответственно) данного метода [13]. Другая группа ученых под руководством M. S. Perez Akly при исследовании дорсолатеральной нигральной гиперинтенсивности у 16 пациентов с БП и 16 пациентов с ЭТ получила сопоставимые результаты: чувствительность и специфичность методики в дифференцировании БП и ЭТ по заключениям первого специалиста лучевой диагностики составили 93,75 и 87,5% соответственно, по заключениям второго специалиста — 93,75 и 75%, соответственно [14]. Таким образом, авторы независимо друг от друга показали высокую эффективность данного метода в дифференциальной диагностике БП и ЭТ.

В настоящем исследовании мы также показали дифференциально-диагностическую ценность визуализации нигросомы-1. По сравнению с данными, полученными при обследовании пациентов с ЭТ, у преобладающего числа пациентов с БП отмечали исчезновение дорсолатеральной нигральной гиперинтенсивности в ЧС. Чувствительность и специфичность данного метода в настоящем пилотном исследовании, проведенном на сравнительно небольшой выборке пациентов, составили 70 и 100% соответственно.

Необходимо отметить, что значительным ограничением при визуализации нигросомы-1, выявленным в ходе исследования, было наличие артефактов от движения, а также от металлических зубных имплантов. Из первоначально обследованных 39 пациентов (26 пациентов с БП, 13 пациентов с ЭТ) в исследование из-за вышеуказанных ограничений включили только 30 больных, чьи МРТ-изображения были пригодны для дальнейшего

качественного анализа. Для уменьшения количества артефактов от движения описано применение дополнительной фиксации головы пациента внутри катушки (например, мешочками с песком или поролоновыми прокладками), а также использование предварительной легкой медикаментозной седации [16].

Выводы

Результаты настоящей работы в совокупности с данными зарубежной литературы позволяют сделать вывод о том, что представленное неинвазивное нейровизуализационное исследование может стать полезным инструментом дифференциальной диагностики заболеваний, сопровождающихся тремором и другими двигательными расстройствами, в первую очередь для четкого дифференцирования БП и ЭТ, в том числе на ранней стадии патологического процесса.

Литература

- Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2020; 27 (1): 27–42. DOI: 10.1111/ene.14108. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31631455.
- Sepúlveda Soto MC, Fasano A. Essential tremor: New advances. *Clin Park Relat Disord*. 2019; 3: 100031. DOI: 10.1016/j.prdoa.2019.100031. PMID: 34316617; PMCID: PMC8298793.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015; 30 (12): 1591–601. DOI: 10.1002/mds.26424. PMID: 26474316.
- Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18 (7): 435–50. DOI: 10.1038/nrn.2017.62. Epub 2017. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18 (8): 509. PMID: 28592904.
- Bhatia KP, Bain P, Bajaj N, Elble RJ, Hallett M, Louis ED, et al. Tremor Task Force of the International Parkinson and Movement Disorder Society. Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. *Mov Disord*. 2018; 33 (1): 75–87. DOI: 10.1002/mds.27121. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29193359.
- Brooks DJ. Technology insight: imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008; 4 (5): 267–77. DOI: 10.1038/ncpneu0773. Epub 2008. PMID: 18382437.
- Tao A, Chen G, Mao Z, Gao H, Deng Y, Xu R. Essential tremor vs idiopathic Parkinson disease: Utility of transcranial sonography. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99 (20): e20028. DOI: 10.1097/MD.00000000000020028. PMID: 32443307.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D (28K) immunohistochemistry. *Brain*. 1999; 122 (Pt 8): 1421–36. DOI: 10.1093/brain/122.8.1421. PMID: 10430829.
- Blazejewska AI, Schwarz ST, Pitiot A, Stephenson MC, Lowe J, Bajaj N, et al. Visualization of nigrosome 1 and its loss in PD: pathoanatomical correlation and in vivo 7 T MRI. *Neurology*. 2013; 81 (6): 534–40. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31829e6fd2. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23843466.
- Cheng Z, He N, Huang P, Li Y, Tang R, Sethi SK, et al. Imaging the Nigrosome 1 in the substantia nigra using susceptibility weighted imaging and quantitative susceptibility mapping: An application to Parkinson's disease. *Neuroimage Clin*. 2020; 25: 102103. DOI: 10.1016/j.nicl.2019.102103. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31869769.
- Reiter E, Mueller C, Pinter B, Krismer F, Scherfler C, Esterhammer R, et al. Dorsolateral nigral hyperintensity on 3.0T susceptibility-weighted imaging in neurodegenerative Parkinsonism. *Mov Disord*. 2015; 30 (8): 1068–76. DOI: 10.1002/mds.26171. Epub 2015 Mar 15. PMID: 25773707.
- Mavroudis I, Petridis F, Kazis D. Neuroimaging and neuropathological findings in essential tremor. *Acta Neurol Scand*. 2019; 139 (6): 491–6. DOI: 10.1111/ane.13101. Epub 2019. PMID: 30977113.
- Jin L, Wang J, Wang C, Lian D, Zhou Y, Zhang Y, et al. Combined Visualization of Nigrosome-1 and Neuromelanin in the Substantia Nigra Using 3T MRI for the Differential Diagnosis of Essential Tremor and de novo Parkinson's Disease. *Front Neurol*. 2019 Feb 12; 10: 100. DOI: 10.3389/fneur.2019.00100. PMID: 30809189.
- Perez Akly MS, Stefani CV, Ciancaglini L, Bestoso JS, Funes JA, Bauso DJ et al. Accuracy of nigrosome-1 detection to discriminate patients with Parkinson's disease and essential tremor. *Neuroradiol J*. 2019 Dec; 32 (6): 395–400. DOI: 10.1177/1971400919853787. Epub 2019 May 31. PMID: 31149866.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*. 1999; 122 (Pt 8): 1437–48. DOI: 10.1093/brain/122.8.1437. PMID: 10430830.
- Schwarz ST, Afzal M, Morgan PS, Bajaj N, Gowland PA, Auer DP. The 'swallow tail' appearance of the healthy nigrosome — a new accurate test of Parkinson's disease: a case-control and retrospective cross-sectional MRI study at 3T. *PLoS One*. 2014; 9 (4): e93814. DOI: 10.1371/journal.pone.0093814. PMID: 24710392.
- Haacke EM, Xu Y, Cheng YC, Reichenbach JR. Susceptibility weighted imaging (SWI). *Magn Reson Med*. 2004; 52 (3): 612–8. DOI: 10.1002/mrm.20198. PMID: 15334582.
- Gao P, Zhou PY, Li G, Zhang GB, Wang PQ, Liu JZ, et al. Visualization of nigrosomes-1 in 3T MR susceptibility weighted imaging and its absence in diagnosing Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19 (23): 4603–9. PMID: 26698258.
- Pavese N, Tai YF. Nigrosome Imaging and Neuromelanin Sensitive MRI in Diagnostic Evaluation of Parkinsonism. *Mov Disord Clin Pract*. 2018; 5 (2): 131–40. DOI: 10.1002/mdc3.12590. PMID: 30363419.
- Lehéricy S, Bardin E, Poupon C, Vidailhet M, François C. 7 Tesla magnetic resonance imaging: a closer look at substantia nigra anatomy in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2014; 29 (13): 1574–81. DOI: 10.1002/mds.26043. Epub 2014. PMID: 25308960.
- Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*. 2019; 18 (6): e13031. DOI: 10.1111/acer.13031. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31432604.
- Chau MT, Todd G, Wilcox R, Agzarian M, Bezak E. Diagnostic accuracy of the appearance of Nigrosome-1 on magnetic

resonance imaging in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020; 78: 12–20.

DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.07.002. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32668370.

References

- Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 2020; 27 (1): 27–42. DOI: 10.1111/ene.14108. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31631455.
- Sepúlveda Soto MC, Fasano A. Essential tremor: New advances. *Clin Park Relat Disord.* 2019; 3: 100031. DOI: 10.1016/j.prdoa.2019.100031. PMID: 34316617; PMCID: PMC8298793.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015; 30 (12): 1591–601. DOI: 10.1002/mds.26424. PMID: 26474316.
- Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18 (7): 435–50. DOI: 10.1038/nrn.2017.62. Epub 2017. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18 (8): 509. PMID: 28592904.
- Bhatia KP, Bain P, Bajaj N, Elble RJ, Hallett M, Louis ED, et al. Tremor Task Force of the International Parkinson and Movement Disorder Society. Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. *Mov Disord.* 2018; 33 (1): 75–87. DOI: 10.1002/mds.27121. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29193359.
- Brooks DJ. Technology insight: imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008; 4 (5): 267–77. DOI: 10.1038/ncpneuro0773. Epub 2008. PMID: 18382437.
- Tao A, Chen G, Mao Z, Gao H, Deng Y, Xu R. Essential tremor vs idiopathic Parkinson disease: Utility of transcranial sonography. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99 (20): e20028. DOI: 10.1097/MD.00000000000020028. PMID: 32443307.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D (28K) immunohistochemistry. *Brain.* 1999; 122 (Pt 8): 1421–36. DOI: 10.1093/brain/122.8.1421. PMID: 10430829.
- Blazejewska AI, Schwarz ST, Pittiot A, Stephenson MC, Lowe J, Bajaj N, et al. Visualization of nigrosome 1 and its loss in PD: pathoanatomical correlation and in vivo 7 T MRI. *Neurology.* 2013; 81 (6): 534–40. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31829e6fd2. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23843466.
- Cheng Z, He N, Huang P, Li Y, Tang R, Sethi SK, et al. Imaging the Nigrosome 1 in the substantia nigra using susceptibility weighted imaging and quantitative susceptibility mapping: An application to Parkinson's disease. *Neuroimage Clin.* 2020; 25: 102103. DOI: 10.1016/j.nicl.2019.102103. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31869769.
- Reiter E, Mueller C, Pinter B, Krismer F, Scherfler C, Esterhammer R, et al. Dorsolateral nigral hyperintensity on 3.0T susceptibility-weighted imaging in neurodegenerative Parkinsonism. *Mov Disord.* 2015; 30 (8): 1068–76. DOI: 10.1002/mds.26171. Epub 2015 Mar 15. PMID: 25773707.
- Mavroudis I, Petridis F, Kazis D. Neuroimaging and neuropathological findings in essential tremor. *Acta Neurol Scand.* 2019; 139 (6): 491–6. DOI: 10.1111/ane.13101. Epub 2019. PMID: 30977113.
- Jin L, Wang J, Wang C, Lian D, Zhou Y, Zhang Y, et al. Combined Visualization of Nigrosome-1 and Neuromelanin in the Substantia Nigra Using 3T MRI for the Differential Diagnosis of Essential Tremor and de novo Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 2019 Feb 12; 10: 100. DOI: 10.3389/fneur.2019.00100. PMID: 30809189.
- Perez Akly MS, Stefani CV, Ciancaglini L, Bestoso JS, Funes JA, Bauso DJ et al. Accuracy of nigrosome-1 detection to discriminate patients with Parkinson's disease and essential tremor. *Neuroradiol J.* 2019 Dec; 32 (6): 395–400. DOI: 10.1177/1971400919853787. Epub 2019 May 31. PMID: 31149866.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain.* 1999; 122 (Pt 8): 1437–48. DOI: 10.1093/brain/122.8.1437. PMID: 10430830.
- Schwarz ST, Afzal M, Morgan PS, Bajaj N, Gowland PA, Auer DP. The 'swallow tail' appearance of the healthy nigrosome — a new accurate test of Parkinson's disease: a case-control and retrospective cross-sectional MRI study at 3T. *PLoS One.* 2014; 9 (4): e93814. DOI: 10.1371/journal.pone.0093814. PMID: 24710392.
- Haacke EM, Xu Y, Cheng YC, Reichenbach JR. Susceptibility weighted imaging (SWI). *Magn Reson Med.* 2004; 52 (3): 612–8. DOI: 10.1002/mrm.20198. PMID: 15334582.
- Gao P, Zhou PY, Li G, Zhang GB, Wang PQ, Liu JZ, et al. Visualization of nigrosomes-1 in 3T MR susceptibility weighted imaging and its absence in diagnosing Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19 (23): 4603–9. PMID: 26698258.
- Pavese N, Tai YF. Nigrosome Imaging and Neuromelanin Sensitive MRI in Diagnostic Evaluation of Parkinsonism. *Mov Disord Clin Pract.* 2018; 5 (2): 131–40. DOI: 10.1002/mdc3.12590. PMID: 30363419.
- Lehéricy S, Bardinet E, Poupon C, Vidailhet M, François C. 7 Tesla magnetic resonance imaging: a closer look at substantia nigra anatomy in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014; 29 (13): 1574–81. DOI: 10.1002/mds.26043. Epub 2014. PMID: 25308960.
- Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2019; 18 (6): e13031. DOI: 10.1111/acer.13031. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31432604.
- Chau MT, Todd G, Wilcox R, Agzarian M, Bezak E. Diagnostic accuracy of the appearance of Nigrosome-1 on magnetic resonance imaging in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020; 78: 12–20. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.07.002. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32668370.

СРЕДНЕСРОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕСУСТАВНОЙ КОРРЕГИРУЮЩЕЙ ОСТЕОТОМИИ БЕДРА ПРИ ЮНОШЕСКОМ ЭПИФИЗЕОЛИЗЕ ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

К. А. Егiazарян¹, А. В. Григорьев² ✉, А. П. Ратьев¹, А. Б. Бут-Гусаим¹, И. В. Сиротин¹

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

² Московская областная клиническая травматолого-ортопедическая больница, Москва, Россия

Несмотря на множество предложенных методов хирургического лечения юношеского эпифизеолиз головки бедренной кости ЮЭГБК, продолжают поиски варианта операции, обеспечивающей удовлетворительную коррекцию, стабильную фиксацию костных фрагментов и низкий уровень осложнений. Целью работы было усовершенствовать технику лечения пациентов с ЮЭГБК средне-тяжелой степени. В исследование вошли 52 ребенка в возрасте 10–15 лет (средний возраст 13,1), из них 16 девочек и 36 мальчиков, страдающие ЮЭГБК тяжелой степени (3-я стадия по классификации Кречмара), хронического течения, стабильного типа (классификация Loder). Пациентам контрольной группы ($n = 16$) выполнена стандартная операция по Imhauser, исследуемой ($n = 36$) — авторская трехплоскостная остеотомия. Пациентов обследовали до операции и в отдаленные сроки (средний срок наблюдения составил 4,7 года (от 1 до 10 лет) с помощью клинического метода (сбор анамнеза, объективное исследование), рентгенологического метода (определение степени соскальзывания и угла соскальзывания), а также опросника функционального состояния (Harris hip score). В среднем через 4,7 года в обеих группах отмечено увеличение объема движений в сравнении с дооперационными показателями ($p \leq 0,05$), хорошие функциональные показатели HHS (в исследуемой группе — 94 балла, в контрольной — 81 балл); на контрольных рентгенограммах отмечена консолидация костных фрагментов с сохранением коррекции проксимального отдела бедра, длина конечностей также восстановилась в обеих группах. Предложенная внесуставная остеотомия позволяет восстановить длину конечности, анатомо-физиологические взаимоотношения в тазобедренном суставе, проста в исполнении и менее травматична.

Ключевые слова: юношеский эпифизеолиз головки бедренной кости, внесуставная корригирующая остеотомия бедра, тазобедренный сустав, операция Imhauser

Вклад авторов: все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 213 от 13 декабря 2021 г.) выполнено в соответствии с этическими стандартами Хельсинской декларации; родители пациентов дали согласие на обработку и публикацию их персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Владимирович Григорьев
Поперечный просек, д. 3/5, каб. 23, г. Москва, Россия; avgrigoriev@mail.ru

Статья получена: 10.01.2022 **Статья принята к печати:** 24.01.2022 **Опубликована онлайн:** 31.01.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.003

MEDIUM-TERM OUTCOMES OF EXTRAARTICULAR CORRECTIVE OSTEOTOMY FOR SLIPPED CAPITAL FEMORAL EPIPHYSIS

Egiazaryan KA¹, Grigoriev AV² ✉, Ratiev AP¹, But-Gusaim AB¹, Sirotin IV¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Moscow Regional Clinical Hospital for Trauma and Orthopedics, Moscow, Russia

Despite the diversity of surgical options for slipped capital femoral epiphysis (SCFE), there is an ongoing search for the technique that would ensure a satisfactory outcome, stable fixation of bone fragments and a low rate of complications. The aim of this study was to improve the surgical technique for SCFE in patients with moderate and severe SCFE. The study included 52 children (16 girls and 36 boys) aged 10–15 years (the mean age was 13.2 years) with chronic severe (Krethmar's stage III) stable (according to Loder's classification) SCFE. The control group ($n = 16$) underwent a classic Imhauser procedure; the main group ($n = 36$) underwent a triplane osteotomy proposed by the authors of the study. The patients were examined prior to surgery and in the late follow-up period (the mean follow-up time was 4.7 years, ranging from 1 to 10 years). The procedure included a clinical examination, history taking, radiography to measure the slip angle and the severity of the slip, and the Harris hip score to assess hip function. After 4.7 years, both groups demonstrated an increase in the range of motion, in comparison with their preoperative results ($p \leq 0.05$), good Harris hip scores (94 points in the main group and 81 points in the control group). Postoperative radiographs showed consolidation of the bone, recovery of the proximal femur anatomy. Leg length discrepancy improved significantly in both groups. The proposed technique for extraarticular osteotomy allows recovering the length of the affected leg, the anatomy and physiology of the hip joint, is simple and less traumatic.

Keywords: slipped capital femoral epiphysis, corrective extraarticular femoral osteotomy, hip joint, Imhauser procedure

Author contribution: all authors contributed equally to the study and the manuscript, all read and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University and complied with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the patients' parents.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandr V. Grigoriev
Poperechny prosek 3/5, kab. 23, Moscow, Russia; avgrigoriev@mail.ru

Received: 10.01.2022 **Accepted:** 24.01.2022 **Published online:** 31.01.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.003

Юношеский эпифизеолиз головки бедренной кости (ЮЭГБК) — сравнительно редкое заболевание, встречающееся преимущественно в юношеском возрасте [1]. Различные причины, в первую очередь, гормональные, вызывают изменения структуры костной ткани шейки бедренной кости на границе с эпифизом, что находит

выражение в нарушении клеточного состава (остеокласты/остеобласты), а также в пространственной организации внеклеточных элементов соединительной ткани. Происходит резорбция костной ткани и «соскальзывание» эпифиза [2, 3]. Типичный патологический механизм болезни обусловлен вектором осевой нагрузки и характеризуется

смещением эпифиза в задне-нижнем направлении с ротацией эпифиза кзади (ретроверсия) [4].

Заболевание встречается в 4–5 случаях на 100 000 человек. Клиническая картина ЮЭГБК имеет характерные особенности: как правило, это мальчики пубертатного возраста 12–13 лет (соотношение «мужчины : женщины» как 3 : 2) с избыточной массой тела, жалобами на боль по наружной поверхности бедра и боль в области тазобедренного и коленного суставов (боль в коленном, как правило, доминирует), что часто приводит к ошибочному диагнозу и поиску патологии коленного сустава, тогда как истинная причина боли — соскальзывание проксимального эпифиза бедренной кости — остается не выявленной.

На практике используют несколько классификаций ЮЭГБК. Классификация по величине смещения (*Southwick Slip Angle Classification*) основана на величине шеечно-эпифизарного угла:

- легкая степень — до 30°;
- средняя степень — от 30°;
- тяжелая степень — больше 50°.

Классификация по стабильности эпифиза бедренной кости (*Loder Classification*) основана на возможности нагружать пораженную конечность:

- стабильная форма — пациент может нагружать больную ногу с костылями или без;
- нестабильная форма — нагрузка невозможна даже с костылями.

Классификация Кречмара (1982 г.):

I стадия — предсмещение. Отсутствие признаков смещения эпифиза, выраженные структуральные изменения в проксимальной ростковой зоне и ШБК;

II стадия — смещение эпифиза назад до 30° и вниз до 15° на фоне структуральных изменений в шейке бедренной кости (ШБК) при «открытой» проксимальной ростковой зоне бедренной кости;

III стадия — смещение эпифиза назад более 30° и вниз более 15° на фоне структуральных изменений в ШБК при «открытой» ростковой зоне бедренной кости;

IV стадия — острое смещение эпифиза назад и вниз при неадекватной травме и «открытой» ростковой зоне бедренной кости;

V стадия — остаточная деформация ПОВК при различной степени смещения эпифиза и синостозе проксимальной ростковой зоны.

Данная классификация сочетает в себе несколько вышеописанных классификаций и, на наш взгляд, наиболее удобна.

При клиническом обследовании у пациентов с ЮЭГБК отмечают: хромоту; укорочение нижней конечности на стороне заболевания; прогрессирующее со временем значительное увеличение наружной ротации и, соответственно, уменьшение внутренней ротации в тазобедренном суставе; болезненность движений в крайних точках. При 3-й стадии (по классификации Кречмара) появляется положительный симптом Hofmeister. Диагноз подтверждают при выполнении рентгенограмм тазобедренных суставов в прямой проекции и в положение по Лауэнштейну. Стоит отметить, что двустороннее поражение отмечают в 20% случаев [5].

Из-за редкой встречаемости заболевания патологию часто диагностируют на поздних стадиях. До настоящего времени большинство детей поступают на стационарное лечение поздно, уже с выраженной деформацией проксимального отдела бедренной кости [1]. Социальная значимость лечения ЮЭГБК состоит в профилактике

развития раннего остеоартрита тазобедренного сустава, импинджмент-синдрома тазобедренного сустава, а также асептического некроза головки бедренной кости, корреляция с которыми доказана во многих исследованиях [6, 7].

Основной целью лечения ЮЭГБК является предотвращение дальнейшего прогрессирования деформации путем стабилизации проксимального эпифиза бедренной кости с сохранением кровоснабжения головки бедренной кости [8].

Предложено множество вариантов хирургического лечения детей с хроническим течением ЮЭГБК. Они включают фиксацию *in situ* спицами, винтами, пластинами; эпифизеодез; различные варианты остеотомии проксимального отдела бедренной кости [9].

В настоящее время при среднетяжелом и тяжелом течении (смещение эпифиза более 30°) предпочтение отдается корригирующим остеотомиям в разных модификациях [10]. Все остеотомии можно разделить по локализации выполнения: субкапитальные (*Dunn-osteotomy*, *Fish-osteotomy*), остеотомии на уровне основания шейки бедренной кости (внутрисуставная остеотомия по *Kramer*, внесуставная остеотомия по *Badama*), межвертельные остеотомии (по *Southwick* и *Imhauser*). Успешность выполненной остеотомии определяют по оценке функционального статуса тазобедренного сустава, оценке проведенной коррекции (каково остаточное смещение), травматичности выполненного вмешательства (сохранено ли кровоснабжение головки бедренной кости), технической сложности операции [11].

Проксимальные остеотомии (по *Dunn*) шейки бедренной кости теоретически являются идеальным инструментом для восстановления анатомии проксимального отдела бедра, так как именно в этой зоне и возникает деформация [12]. Однако, по данным разных исследователей, данный вид остеотомии негативно влияет на кровоснабжение головки бедренной кости и в 10–26% случаев ведет к развитию асептического некроза головки бедренной кости (АНГБК). Ввиду высокого риска возникновения такого осложнения предложено выполнять остеотомию в межвертельной области бедра [13].

В течение многих лет для оперативного лечения данной патологии использовали остеотомию по *Southwick*, схема которой стала классической. Данная операция позволяет изменить шеечно-диафизарный угол и устранить избыточную наружную ротацию бедра, при этом незначительно опосредованно влияет на положение проксимального эпифиза бедренной кости во впадине. Результаты данного вмешательства полностью не удовлетворяли ни больных, ни ортопедов, поэтому были разработаны так называемые многоплоскостные остеотомии [14].

Известен способ трехплоскостной корригирующей остеотомии по А. И. Краснову (RU 2364365, C2). Данный способ лечения патогенетически более оправдан, поскольку корригирует деформацию одновременно в трех плоскостях — фронтальной, горизонтальной и сагиттальной с фиксацией фрагментов углообразной пластиной [15].

Основные недостатки известного способа — сложность самой остеотомии и необходимость отсечения большого вертела, что усложняет и удлинит хирургическое вмешательство. Кроме того, ротационный компонент коррекции при данных вмешательствах осуществляют соответственно введенному клинку углообразной

пластины, т. е. вокруг продольной оси шейки бедра. В тех частых анатомических ситуациях, когда эпифиз головки смещен в основном назад, на величину более 40 градусов, и незначительно вниз, ротация проксимального фрагмента бедра вокруг оси шейки бедра приводит к вальгусному положению эпифиза головки и варусному положению шейки. Таким образом, в тазобедренном суставе возникает положение подвывиха (по эпифизу головки) и/или варусная деформация шейки бедра с высоким стоянием большого вертела, что, соответственно, приводит к дисфункции ягодичных мышц и хромоте [16].

Известен способ трехплоскостной корригирующей остеотомии с помощью углообразной пластины (RU 2604039, С1). Преимущество данной методики в том, что изменение оси ротации проксимального отдела бедренной кости позволяет осуществлять его полноценную коррекцию во фронтальной, горизонтальной и сагиттальной плоскостях, что предотвращает угловую деформацию диафиза бедра, развитие подвывиха и варусную деформацию шейки [17].

В 1966 г. Imhauser описал остеотомию в межвертельной области, которая устраняет варус, разгибание и ротацию шейки бедра. Операция заключается в клиновидной остеотомии, при которой производят иссечение переднего или передне-латерального костного фрагмента в межвертельной области с дальнейшей фиксацией углообразной пластиной [18]. Многочисленные публикации свидетельствуют о популярности данной операции. Стоит отметить, что после выполнения данного вмешательства часто возникал подвывих головки бедренной кости при избыточной вальгизации или формировалась штыкообразная деформация проксимального отдела бедренной кости [19–21].

Учитывая все имеющиеся варианты хирургического лечения, их осложнения, стабильность фиксации, длительность иммобилизации и исход, был разработан собственный способ хирургического лечения при ЮЭГБК, основанный на анализе большинства методов, приведенных выше. Цель работы — улучшение результатов лечения детей с ЮЭГБК, оценка результатов эффективности усовершенствованного метода хирургического лечения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В наше ретроспективное исследование вошли 52 ребенка с диагнозом ЮЭГБК, находившиеся на лечении в детской больнице (клиническая база кафедры травматологии и ортопедии и хирургии катастроф) с 2010 по 2020 г. Всем пациентам проведено клинико-инструментальное обследование, которое включало сбор анамнеза и жалоб, демографические характеристики, клиническую картину, симптомы, измерение амплитуды движений, выполнение рентгенограмм в специфических проекциях, заполнение опросников (Harris hip score) [22].

Все исследуемые пациенты были разделены на две группы: контрольную и исследуемую. Контрольную группу составили пациенты, которым выполнена стандартная межвертельная остеотомия Imhauser, исследуемую — пациенты, которым выполнена остеотомия по авторской методике [23].

Критерии включения в исследование: смещение проксимального эпифиза бедренной кости назад более 30° и/или вниз более 15° при открытой зоне роста; отсутствие предшествующих хирургических вмешательств на тазобедренных суставах; отсутствие технических ошибок при выполнении вмешательства.

Критерии исключения: смещение эпифиза кзади менее 30° или более 75°; закрытая зона роста бедренной кости; наличие предшествующих вмешательств на тазобедренном суставе; полное разобщение эпифиза и метафиза бедренной кости (острое соскальзывание).

Клиническое исследование включало сбор жалоб и оценку походки: наличие хромоты, возможность ходить, боль при ходьбе, боль при движениях, наличие фиксированной наружной ротации пораженной конечности, ограничение сгибания, внутренней ротации и приведения.

На всех этапах лечения (до и после операции, а также в отдаленные сроки) выполняли рентгенографию тазобедренных суставов в прямой проекции, а также в проекции по Лауэнштейну. В работе использовали рентгенологические классификации А. Н. Кречмара и Loder [24, 25].

Основным показателем служила оценка функции тазобедренного сустава по шкале Harris. Это шкала, разработанная для оценки хирургических вмешательств на тазобедренном суставе, предполагает оценку четырех категорий: боли, функции, деформации, амплитуды движений. Для каждой категории суммируется число баллов (максимальное число баллов — 100). Чем выше сумма, тем выше качество жизни. При оценке показателей через год после операции отличным считали результат выше 90 баллов, хорошим — 80–90 баллов, удовлетворительным — 65–79 и неудовлетворительным — менее 65 баллов.

Всех пациентов обследовали до операции, а также в отдаленные сроки. Всем участникам исследования выполняли остеотомию, затем проводили разгрузку оперированной конечности 4–12 месяцев, затем удаление фиксатора, затем наблюдали в отдаленные сроки.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программ SPSS (IBM SPSS Statistics 22; США), Excel (Microsoft; США). Статистическую значимость различий переменной по нескольким группам определяли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса, зависимости двух количественных переменных с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Хирургическая техника

Разработанный метод корригирующей остеотомии бедренной кости отличается пространственным расположением оси вращения проксимального отдела бедренной кости и характером остеотомии (рис. 1). Для фиксации фрагментов бедра использовали пластину Троценко–Нуждина. Точки введения бранш пластины определяли в области, расположенной на 0,3–0,5 см вверх от зоны роста большого вертела и отстоящей от срединной линии латеральной поверхности большого вертела на величину смещения головки бедренной кости назад. Направление введения бранш пластины намечали таким образом, чтобы угол, образованный линией, проходящей вдоль оси диафизарной накладки пластины и линией, проходящей вдоль диафиза бедра, соответствовал углу ретроверсии головки. Формировали каналы для введения бранш пластины в проксимальный фрагмент бедренной кости. Выполняли высокую межвертельную остеотомию. Затем вводили бранши пластины в сформированные каналы. Выполняли одновременно

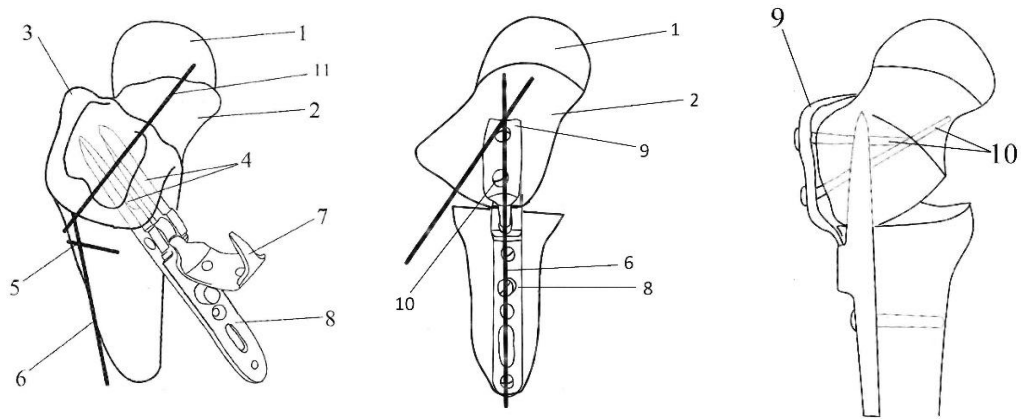


Рис. 1. Схема выполнения предложенной остеотомии. 1 — головка бедренной кости; 2 — шейка бедренной кости; 3 — большой вертел; 4 — ветви пластины Троценко–Нуждина; 5 — уровень остеотомии; 6 — продольная ось диафиза бедренной кости; 7 — фиксирующая накладка пластины Троценко–Нуждина; 8 — диафизарная накладка пластины Троценко–Нуждина; 9 — накладка пластины Троценко–Нуждина, фиксированная к большому вертелу; 10 — винты, проведенные через накладки пластины Троценко–Нуждина; 11 — продольная ось шейки бедренной кости

выведение головки бедра из положения ретроверсии и проводили ее деротацию путем тракции за диафизарную накладку, отводя назад до совпадения срединных линий, проведенных через центральную ось пластины и диафиза бедра, сохраняя при этом зазор между диафизарной накладкой и диафизом бедра. Затем прижимали диафизарную накладку к диафизу бедра, устраняли смещение эпифиза книзу. Устанавливали фиксирующую накладку пластины на большой вертел, проводя винты вне канала шейки бедра. Фиксировали диафизарную накладку пластины к бедру. Следует отметить, что максимальный угол вращения проксимального фрагмента вперед составляет 45° , более 45° ротировать проксимальный фрагмент нельзя из-за опасности ишемических осложнений. При смещении эпифиза назад более 45° остаточное смещение устраняли при помощи деротации проксимального фрагмента, исходя из формулы: ШЭУ — 45° , где ШЭУ — шейечно-эпифизарный угол до операции. Параллельно устраняли смещение эпифиза вниз (при наличии такового) при помощи вальгизации проксимального фрагмента. При фиксации пластиной Троценко–Нуждина, ветви пластины вводят в большой вертел, при этом не травмируется шейка бедренной кости, что положительно сказывается на кровоснабжении проксимального отдела бедра.

Послеоперационная реабилитация

Ведение пациентов в послеоперационном периоде различалось для пациентов исследуемой и контрольной групп. В исследуемой группе назначали постельный режим на шесть недель после операции с фиксацией конечности в деротационном сапожке, в контрольной группе — постельный режим на три месяца после операции с фиксацией в кокситной гипсовой повязке. Соответственно вертикализация пациента в исследуемой группе начиналась с шестой недели, а в контрольной — через три месяца. Полная нагрузка на оперированную конечность происходила через четыре месяца после операции в исследуемой группе, через шесть месяцев — в контрольной группе. Раннюю реабилитацию проводили, соответственно, только у пациентов исследуемой группы в виде сначала пассивной, а затем и активной ЛФК.

Удаление пластины выполняли через 10–12 месяцев после операции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 52 пациентов (16 девочек — 30,8%, 36 мальчиков — 69,2%) 36 человек вошли в исследуемую группу, 16 — в

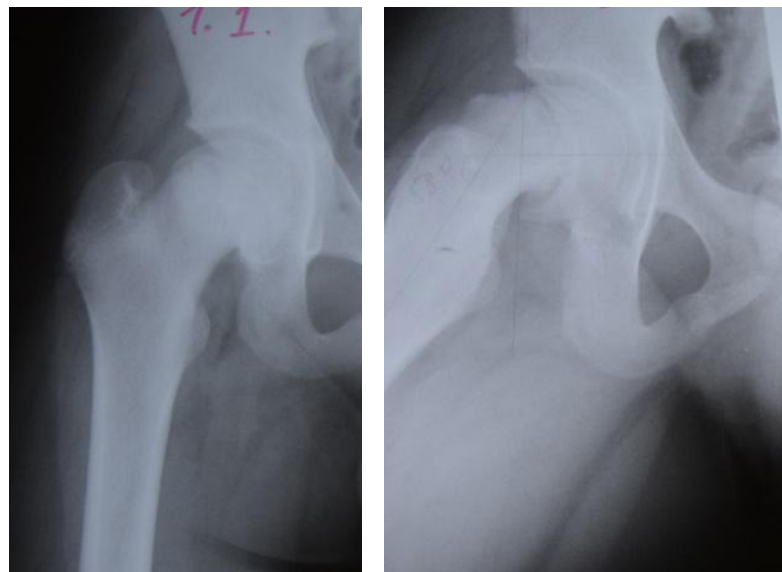


Рис. 2. Рентгенограммы правого тазобедренного сустава пациента М., 12 лет, в прямой проекции и в проекции Лауэнштейн; ЮЭГБК 3-й стадии, хроническое течение

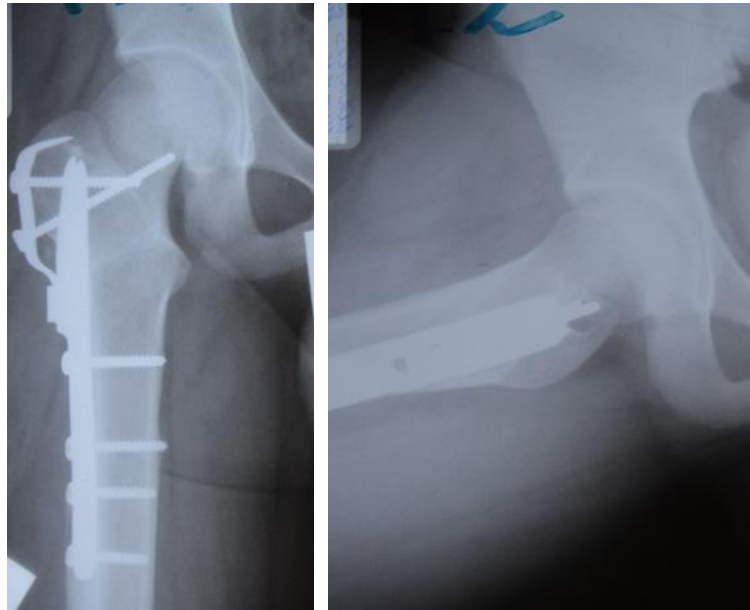


Рис. 3. Рентгенограммы правого тазобедренного сустава пациента М., 12 лет, в прямой проекции и в проекции Лауэнштейн после выполнения межвертельной остеотомии бедра с фиксацией пластины

контрольную. Все пациенты были в возрасте 10–15 лет, средний возраст составил $13 \pm 1,1$ лет.

В исследуемой группе (36 пациентов) было 12 девочек (33,4%) и 24 мальчика (66,6%), в контрольной (16 пациентов) — 4 девочки (25%) и 12 мальчиков (75%). Средний возраст в исследуемой группе составил $13 \pm 1,1$ лет ($p = 0,1$).

Все пациенты обеих групп (100%) испытывали боль и имели нарушение походки. При клиническом обследовании у всех отмечался симптом Hofmeister.

У всех пациентов обеих групп выявлено порочное положение конечности за счет наружной ротации. Среднее значение наружной ротации после операции составило $41,2^\circ$ (в исследуемой группе — $40,8^\circ$, в контрольной группе — $42,2^\circ$; $p = 0,3$). Избыточная амплитуда наружной ротации до операции составила в среднем $69,0^\circ$ (в исследуемой группе — $68,4^\circ$, в контрольной — $69,9^\circ$; $p = 0,2$).

У всех пациентов обнаружено ограничение внутренней ротации, среднее значение составило $5,2^\circ$ (в исследуемой

группе — $4,8^\circ$, в контрольной — $6,9^\circ$; $p = 0,006$). Кроме того, отмечена сопоставимая разница в длине нижних конечностей за счет укорочения на стороне поражения, в среднем 1,25 см (в исследуемой группе — 1,20 см, в контрольной — 1 см; $p = 0,02$).

На рентгенограммах оценивали шейечно-эпифизарный угол (ШЭУ) в проекции Лауэнштейна и эпифизарно-диафизарный угол (ЭУ) в передне-задней проекции (рис. 2–4). На основании исследований угол смещения эпифиза назад составил в среднем $46,8^\circ$ (в исследуемой группе — $47,7^\circ$, в контрольной — $45,8^\circ$; $p = 0,002$).

Ввиду риска острого соскальзывания исследование функционального статуса по шкале Harris не выполняли.

Оценивали также сроки госпитализации в двух группах. Так, в исследуемой группе среднее время госпитализации составило около 14,4 дня, в контрольной — 15,7 дней ($p = 0,0075$). Среднее время операции в исследуемой группе составило 71 мин, в контрольной — 137 мин ($p = 0,0011$).

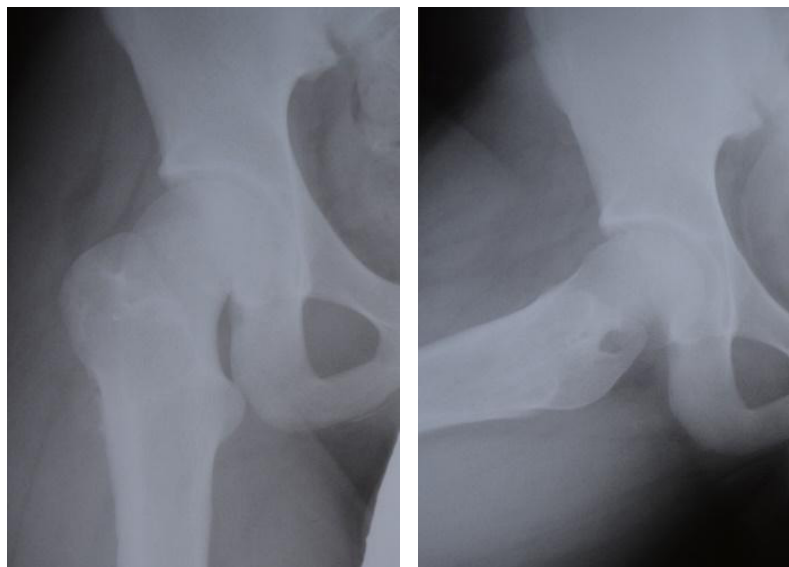


Рис. 4. Рентгенограммы правого тазобедренного сустава пациента М., 12 лет, в прямой проекции и в проекции Лауэнштейн через 12 месяцев после операции (после сращения бедра и удаления пластины)

Таблица. Динамика изменения длины конечностей через 4,7 г. после операции

Группа	Укорочение конечности до операции, см		Укорочение конечности после операции, см	
	Me	Q ₁ –Q ₃	Me	Q ₁ –Q ₃
Исследуемая	1,25	0,63–2	0	0–0,5
Контрольная	1	0,5–1,38	1	0,5–1

На контрольном осмотре в отдаленные сроки после операции (в среднем через 4,7 г.) у всех пациентов установлено увеличение внутренней ротации, среднее значение составило 16,7° (в исследуемой группе — 20,1°, в контрольной — 9,1°; $p = 0,0024$). Отмечена также компенсация длины пораженной конечности, а изменение длины конечностей стало в среднем 0,5 см (в исследуемой группе — 0 см, в контрольной — 1 см; $p = 0,5$) (см. табл.).

Оценку функции тазобедренного сустава проводили лишь на контрольном осмотре через 4,7 г. после операции, поэтому невозможно оценить динамику данного показателя, однако можно оценить различие в функциональном статусе тазобедренного сустава в обеих группах. Среднее значение по шкале Harris составило 89 баллов (в исследуемой группе — 94 балла, в контрольной — 81 балл; $p = 0,001$) (рис. 5).

Тяжелым осложнением течения и хирургического лечения ЮЭГБК является хондролиз. Данное осложнение отмечено у одного пациента исследуемой группы (2,8%) и двух пациентов контрольной группы (5,6%), $p = 0,0013$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В литературе описано множество способов хирургического лечения ЮЭГБК при хроническом течении. Выбор способа хирургической коррекции зависит от стадии заболевания, опыта и квалификации хирурга.

В настоящее время при ЮЭГБК применяют варианты межвертельных или подвертельных остеотомий бедренной кости с фиксацией фрагментов углообразной пластинкой с винтами или остеотомий шейки бедренной кости с фиксацией винтами.

Авторская методика остеотомии бедренной кости при ЮЭГБК показала хорошие функциональные результаты и низкий процент осложнений.

Демографические показатели (возраст и пол), среднее значение наружной ротации, разница в длине конечностей исследуемой и контрольной групп были сопоставимы ($p \geq 0,05$). Статистически достоверно различалась амплитуда внутренней ротации: в исследуемой группе — 4,8°, в контрольной группе — 6,9° ($p = 0,006$). Сроки

госпитализации были сопоставимы, однако среднее время операции достоверно различалось (в исследуемой группе оно меньше).

При исследовании в отдаленные сроки после операции (через 4,7 г. в среднем) у всех пациентов отмечено увеличение внутренней ротации, причем статистически достоверно ротация увеличилась в исследуемой группе больше (20,1°), чем в контрольной (9,1°; $p = 0,0024$).

Также стоит отметить функциональный статус по опроснику Harris: среднее значение в исследуемой группе составило 94 балла, в контрольной — 81 балл, при $p = 0,001$.

В результате проведенного анализа выявлено, что пациенты из основной группы, прооперированные с применением трехплоскостной остеотомии и фиксации пластиной Троценко–Нуждина, более легко переносили хирургическое вмешательство (которое было значительно короче по времени за счет технической простоты исполнения). Минимальная иммобилизация пациента в послеоперационном периоде (при помощи деротационного сапожка) способствовала раннему началу реабилитационных мероприятий. В результате у большинства пациентов улучшилась до нормальных значений внутренняя ротация в тазобедренном суставе и максимально восстановилась длина конечности. Благодаря особенностям пластины Троценко–Нуждина (сдвоенный клинок пластины вводится в большой вертел) не травмировалась шейка бедренной кости, что положительно влияет на кровоснабжение головки бедренной кости.

Проведение корригирующей остеотомии бедра с изменением оси ротации проксимального отдела бедренной кости в результате предлагаемого способа позволяет восстановить правильную центрацию эпифиза головки бедра, предотвратить угловую деформацию диафиза бедра, развитие подвывиха, варусную деформацию шейки и снизить вероятность развития аваскулярных осложнений, минимизировать развитие таких осложнений, как асептический некроз головки бедренной кости, хондролиз суставного хряща, а также

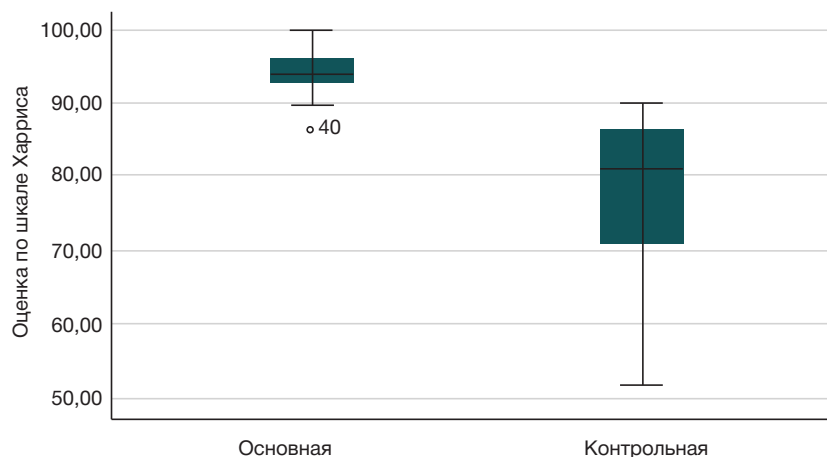


Рис. 5. Показатели шкалы Harris через 4,7 г. после операции в исследуемой и контрольной группах

замедлить прогрессирование артроза тазобедренного сустава и отсрочить необходимость повторного хирургического вмешательства (эндопротезирования тазобедренного сустава).

ВЫВОДЫ

Предложенный способ корригирующей остеотомии бедренной кости у пациентов с 3-й стадией хронического

течения ЮЭГБК позволяет предотвратить подвывих в пораженном суставе, исключить образование деформации проксимального отдела бедренной кости, а также сократить сроки реабилитации. Простота хирургического исполнения в сочетании со стабильной фиксацией фрагментов позволяют значительно сократить время операции, интраоперационную кровопотерю, облегчить послеоперационное ведение пациентов.

Литература

- Соколовский А. М., Соколовский О. А., Гольдман Р. К., Юношеский эпифизеолиз головки бедренной кости. Медицинские новости. 2006; 2.
- Witbreuk M, van Kemenade FJ, van der Sluijs JA, Jansma EP, Rotteveel J, van Royen BJ. Slipped capital femoral epiphysis and its association with endocrine, metabolic and chronic diseases: a systematic review of the literature. *J Child Orthop*. 2013; 7 (3): 213–23.
- Tayton K. The epiphyseal tubercle in adolescent hips. *Acta Orthop*. 2009; 80: 416–9.
- Gholve PA, Cameron DB, Millis MB. Slipped capital femoral epiphysis update. *Curr Opin Pediatr*. 2009; 21 (1): 39–45.
- Carney BT, Weinstein SL. Natural history of untreated chronic slipped capital femoral epiphysis. *Clin Orthop Relat Res*. 1996; (322): 43–7.
- Abu Amara S, Cunin V, Ilharborde B; French Society of Pediatric Orthopaedics (SOFO). Severe slipped capital femoral epiphysis: a French multicenter study of 186 cases performed by the SOFO. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2015; 101 (6 Suppl): S275–9.
- Bittersohl B, Hosalkar HS, Zilkens C, Krauspe R. Current concepts in management of slipped capital femoral epiphysis. *Hip Int*. 2015; 25 (2): 104–14.
- Mahran MA, Baraka MM, Hefny HM. Slipped capital femoral epiphysis: a review of management in the hip impingement era. *SICOT J*. 2017; 3: 35.
- Meier MC, Meyer LC, Ferguson RL. Treatment of slipped capital femoral epiphysis with a spica cast. *J Bone Joint Surg Am*. 1992; 74: 1522–9.
- Bellemore JM, Carpenter EC, Yu NY, Birke ODG. Little Biomechanics of Slipped Capital Femoral Epiphysis: Evaluation of the Posterior Sloping Angle. *J Pediatr Orthop*. 2016; 36 (6): 651–5.
- Thawrani DP, Feldman DS, Sala DA. Current practice in the management of slipped capital femoral epiphysis. *J Pediatr Orthop*. 2016; 36 (3): e27–e37.
- Slongo T, Kakaty D, Krause F, Ziebarth K. Treatment of slipped capital femoral epiphysis with a modified Dunn procedure. *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92 (18): 2898–908.
- Rathey T, Piehl F, Wright JG. Acute slipped capital femoral epiphysis. Review of outcomes and rates of avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1996; 78: 398–402.
- Salvati EA, Robinson JH Jr, O'Down TJ. Southwick osteotomy for severe chronic slipped capital femoral epiphysis: results and complications. *J Bone Joint Surg Am*. 1980; 62 (4): 561–70.
- Барсуков Д. Б., Баиндурашвили А. Г., Поздникин И. Ю., Басков В. Е., Краснов А. И., Бортулёв П. И. Новый метод корригирующей остеотомии бедра у детей с юношеским эпифизеолизом головки бедренной кости. *Гений ортопедии*. 2018; 24 (4): 450–9.
- Тихоненков Е. С., Краснов А. И., редакторы. Диагностика, хирургическое и восстановительное лечение юношеского эпифизеолиза головки бедренной кости у подростков: метод. рекомендации. СПб., 1994; 39 с.
- Поздникин И. Ю., Барсуков Д. Б., авторы. Способ корригирующей остеотомии бедра при юношеском эпифизеолизе головки бедренной кости. Патент РФ № 2604039. 18.05.2015.
- Imhäuser GZ. Imhäuser's osteotomy in the flared gliding process. Observations on the corresponding work of B.G. Weber. *Orthop Ihre Grenzgeb*. 1966; 102 (2): 327–9.
- Kartenbender K, Cordier W, Katthagen BD. Long-term follow-up study after corrective Imhäuser osteotomy for severe slipped capital femoral epiphysis. *J Pediatr Orthop*. 2000; 20 (6): 749–56.
- Trisolino G, Pagliazzi G, Di Gennaro GL, Stilli S. Long-term Results of Combined Epiphysiodesis and Imhäuser Intertrochanteric Osteotomy in SCFE: A Retrospective Study on 53 Hips. *J Pediatr Orthop*. 2017; 37 (6): 409–15.
- Erickson JB, Samora WP, Klingele KE. Treatment of chronic, stable slipped capital femoral epiphysis via surgical hip dislocation with combined osteochondroplasty and Imhäuser osteotomy. *J Child Orthop*. 2017; 11 (4): 284–8.
- Aguilar CM, et al. Clinical evaluation of avascular necrosis in patients with sickle cell disease: Children's Hospital Oakland Hip Evaluation Scale--a modification of the Harris Hip Score. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005.
- Егизарян К. А., Гордиенко Д. И., Григорьев Александр В., Григорьев Алексей В., Чеботарев В. В., авторы. Способ хирургического лечения юношеского эпифизеолиза головки бедренной кости. Патент РФ № 2692325. 24.06.2019.
- Кречмар А. Н. Юношеский эпифизеолиз головки бедра (клинико-экспериментальное исследование) [диссертация]. Л., 1982; 34 с.
- Loder RT, Skopelja EN. The epidemiology and demographics of slipped capital femoral epiphysis. *ISRN Orthop*. 2011; 2011: 486512.

References

- Sokolovskij AM, Sokolovskij OA, Goldman RK, Junosheskiy jepifizeoliz golovki bedrennoj kosti. *Medicinskie novosti*. 2006; 2. Russian.
- Witbreuk M, van Kemenade FJ, van der Sluijs JA, Jansma EP, Rotteveel J, van Royen BJ. Slipped capital femoral epiphysis and its association with endocrine, metabolic and chronic diseases: a systematic review of the literature. *J Child Orthop*. 2013; 7 (3): 213–23.
- Tayton K. The epiphyseal tubercle in adolescent hips. *Acta Orthop*. 2009; 80: 416–9.
- Gholve PA, Cameron DB, Millis MB. Slipped capital femoral epiphysis update. *Curr Opin Pediatr*. 2009; 21 (1): 39–45.
- Carney BT, Weinstein SL. Natural history of untreated chronic slipped capital femoral epiphysis. *Clin Orthop Relat Res*. 1996; (322): 43–7.
- Abu Amara S, Cunin V, Ilharborde B; French Society of Pediatric Orthopaedics (SOFO). Severe slipped capital femoral epiphysis: a French multicenter study of 186 cases performed by the SOFO. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2015; 101 (6 Suppl): S275–9.
- Bittersohl B, Hosalkar HS, Zilkens C, Krauspe R. Current concepts

- in management of slipped capital femoral epiphysis. *Hip Int.* 2015; 25 (2): 104–14.
8. Mahran MA, Baraka MM, Hefny HM. Slipped capital femoral epiphysis: a review of management in the hip impingement era. *SICOT J.* 2017; 3: 35.
 9. Meier MC, Meyer LC, Ferguson RL. Treatment of slipped capital femoral epiphysis with a spica cast. *J Bone Joint Surg Am.* 1992; 74: 1522–9.
 10. Bellemore JM, Carpenter EC, Yu NY, Birke ODG. Little Biomechanics of Slipped Capital Femoral Epiphysis: Evaluation of the Posterior Sloping Angle. *J Pediatr Orthop.* 2016; 36 (6): 651–5.
 11. Thawrani DP, Feldman DS, Sala DA. Current practice in the management of slipped capital femoral epiphysis. *J Pediatr Orthop.* 2016; 36 (3): e27–e37.
 12. Slongo T, Kakaty D, Krause F, Ziebarth K. Treatment of slipped capital femoral epiphysis with a modified Dunn procedure. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92 (18): 2898–908.
 13. Rattey T, Piehl F, Wright JG. Acute slipped capital femoral epiphysis. Review of outcomes and rates of avascular necrosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1996; 78: 398–402.
 14. Salvati EA, Robinson JH Jr, O'Donnell TJ. Southwick osteotomy for severe chronic slipped capital femoral epiphysis: results and complications. *J Bone Joint Surg Am.* 1980; 62 (4): 561–70.
 15. Barsukov DB, Baindurashvili AG, Pozdnikin IYu, Baskov VE, Krasnov AI, Bortulov PI. Novyj metod korrirujushhej osteotomii bedra u detej s junosheskim jepifizeolizom golovki bedrennoj kosti. *Genij ortopedii.* 2018; 24 (4): 450–9. Russian.
 16. Tihonenkov ES, Krasnov AI, redaktory. Diagnostika, hirurgicheskoe i vosstanovitel'noe lechenie junosheskogo jepifizeoliza golovki bedrennoj kosti u podrostkov: metod. rekomendacii. SPb., 1994; 39 s. Russian.
 17. Pozdnikin IYu, Barsukov DB, avtory. Sposob korrirujushhej osteotomii bedra pri junosheskom jepifizeolize golovki bedrennoj kosti. Patent RF # 2604039. 18.05.2015. Russian.
 18. Imhäuser GZ. Imhäuser's osteotomy in the florid gliding process. Observations on the corresponding work of B.G. Weber. *Orthop Ihre Grenzgeb.* 1966; 102 (2): 327–9.
 19. Kartenbender K, Cordier W, Katthagen BD. Long-term follow-up study after corrective Imhäuser osteotomy for severe slipped capital femoral epiphysis. *J Pediatr Orthop.* 2000; 20 (6): 749–56.
 20. Trisolino G, Pagliazzi G, Di Gennaro GL, Stilli S. Long-term Results of Combined Epiphysiodesis and Imhäuser Intertrochanteric Osteotomy in SCFE: A Retrospective Study on 53 Hips. *J Pediatr Orthop.* 2017; 37 (6): 409–15.
 21. Erickson JB, Samora WP, Klingele KE. Treatment of chronic, stable slipped capital femoral epiphysis via surgical hip dislocation with combined osteochondroplasty and Imhäuser osteotomy. *J Child Orthop.* 2017; 11 (4): 284–8.
 22. Aguilar CM, et al. Clinical evaluation of avascular necrosis in patients with sickle cell disease: Children's Hospital Oakland Hip Evaluation Scale--a modification of the Harris Hip Score. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005.
 23. Egiazarjan KA, Gordienko DI, Grigorev Aleksandr V, Grigorev Aleksej V, Chebotarev VV, avtory. Sposob hirurgicheskogo lechenija junosheskogo jepifizeoliza golovki bedrennoj kosti. Patent RF # 2692325. 24.06.2019. Russian.
 24. Krechmar AN. Junosheskij jepifizeoliz golovki bedra (kliniko-jeksperimental'noe issledovanie) [dissertacija]. L., 1982; 34 s. Russian.
 25. Loder RT, Skopelja EN. The epidemiology and demographics of slipped capital femoral epiphysis. *ISRN Orthop.* 2011; 2011: 486512.

ПРИВЕРЖЕННОСТЬ К ЛЕЧЕНИЮ ЛИЦ С НАРУШЕНИЕМ ЗРЕНИЯ

М. М. Бикбов, Г. З. Исрафилова [✉], Т. Р. Гильманшин, Р. М. Зайнуллин, Э. М. Якупова

Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней, Уфа, Россия

Проблема приверженности к лечению — одна из наиболее значимых для современной медицины. На сегодняшний день основной причиной обратимой слепоты и инвалидности по зрению является катаракта. Целью исследования было оценить приверженность к своевременному хирургическому лечению у лиц с катарактой. В работе использованы данные поперечного популяционного исследования «Ural Eye and Medical Study». Из 546 участников 46,3% мужчин и 53,7% женщин, жителей города — 59,6%, жителей села — 40,4%, средний возраст которых составил $66,36 \pm 9,47$ года (диапазон 40–88 лет). Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistic. Результаты исследования показали, что основной фактор, влияющий на мотивацию пациента к лечению катаракты, — недостаточная информированность о заболевании и заинтересованность в хирургическом лечении. При этом частота посещений офтальмолога находится в обратной зависимости от возраста пациентов (ОШ 1,24; 95% ДИ 1,04–1,49), длительности снижения зрения (ОШ 1,08; 95% ДИ 0,81–1,43) и в прямой зависимости от длительности времени с момента установления диагноза катаракты (ОШ 1,20; 95% ДИ 1,04–1,38), наличия офтальмолога в поликлинике по месту жительства (ОШ 1,71; 95% ДИ 1,29–2,26), доверия врачу (ОШ 3,62; 95% ДИ 3,02–4,35), разъяснения офтальмологом осложнений и современных методов лечения катаракты (ОШ 1,62; 95% ДИ 1,34–1,97). Понимание основных причин, снижающих приверженность пациентов с катарактой к лечению, позволит разработать наиболее эффективные мероприятия по совершенствованию медицинской помощи, связанной с увеличением охвата хирургическим лечением пациентов с данной патологией.

Ключевые слова: приверженность к хирургическому лечению, катаракта, информированность, качество жизни

Вклад авторов: М. М. Бикбов — концепция и дизайн исследования, консультирование, редактирование; Г. З. Исрафилова, Т. Р. Гильманшин — сбор и обработка материала, написание текста; Г. З. Исрафилова, Т. Р. Гильманшин, Р. М. Зайнуллин, Э. М. Якупова — написание текста, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Уфимского НИИ глазных болезней; выполнено в соответствии с основополагающими этическими принципами Хельсинкской декларации, правилами GCP и действующими нормативными требованиями; все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Гульнара Зуфаровна Исрафилова
ул. Пушкина, д. 90, 450008, г. Уфа, Россия; israfilova_gulnara@mail.ru

Статья получена: 01.02.2022 **Статья принята к печати:** 15.02.2022 **Опубликована онлайн:** 22.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.008

ADHERENCE TO TREATMENT IN VISUALLY IMPAIRED INDIVIDUALS

Bikbov MM, Israfilova GZ [✉], Gilmanshin TR, Zainullin RM, Yakupova EM

Ufa Eye Research Institute, Ufa, Russia

Adherence to treatment is one of the major challenges posed by modern medicine. Today, cataract is the leading cause of reversible blindness and visual disability. The study was aimed to assess adherence to timely surgical treatment in individuals with cataract. The data of the cross-sectional, population-based Ural Eye and Medical Study were assessed. Among 546 participants, there were 46.3% men and 53.7% women, 59.6% urban residents, 40.4% rural residents. Their average age was 66.36 ± 9.47 years (40–88 years). Statistical data analysis was performed using the IBM SPSS Statistic software package. The findings showed that the lack of awareness of the disorder and low interest in surgery were the main factors, affecting the patients' motivation for cataract treatment. At the same time, the frequency of ophthalmology visits was inversely related to the patients' age (OR 1.24; 95% CI 1.04–1.49) and the duration of vision loss (OR 1.08; 95% CI 0.81–1.43), and directly related to the cataract diagnosis age (OR 1.20; 95% CI 1.04–1.38), the presence of ophthalmologist in the community clinic (OR 1.71; 95% CI 1.29–2.26), trust in the doctor (OR 3.62; 95% CI 3.02–4.35), ophthalmologist's explanation of the cataract complications and advanced treatment methods (OR 1.62; 95% CI 1.34–1.97). Understanding the main factors, contributing to low treatment adherence in patients with cataracts, would make it possible to optimize the measures to improve healthcare delivery to such patients, associated with the increased coverage of surgical treatment.

Keywords: adherence to surgical treatment, cataract, awareness, quality of life

Author contribution: Bikbov MM — study concept and design, advising, editing; Israfilova GZ, Gilmanshin TR — data acquisition and processing, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Ufa Eye Research Institute and conducted in accordance with the fundamental ethical principles of the Declaration of Helsinki, GCP (Good Clinical Practice) principles, and current regulatory requirements; the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Gulnara Z. Israfilova
Pushkina, 90, 450008, Ufa, Russia; israfilova_gulnara@mail.ru

Received: 01.02.2022 **Accepted:** 15.02.2022 **Published online:** 22.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.008

Термин «приверженность к лечению» появился в отечественной научной литературе около 20 лет назад, но использовать широко его стали в последние 5–6 лет. Согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), «приверженность к лечению» — это степень соответствия поведения пациента назначениям врача в отношении приема лекарственных препаратов, выполнения рекомендаций по питанию и/или изменения образа жизни. Существует мнение, что несоблюдение пациентами врачебных рекомендаций является следствием

недостаточно эффективной системы взаимодействия врача и пациента. Другими причинами низкой приверженности к лечению служат личностные и психологические особенности самих пациентов, клинические особенности заболевания, характер проводимого лечения, социально-экономические факторы и особенности организации медицинской помощи в различных странах [1]. Особо актуальной данная проблема касается заболеваний органа зрения, поражения которого не предполагают летального исхода, тем более, если носят устранимый

характер. Многие больные не придают наличию катаракты у себя достаточной важности, поскольку выраженная субъективная симптоматика у них нередко отсутствует в течение длительного времени. Однако даже устранимые поражения глаза представляют собой серьезную медико-социальную проблему. Психология пациента в плане диагностики и лечения катаракты — одна из лидирующих причин слепоты и слабовидения в мире [2]. Высокая медико-социальная значимость катаракты обусловлена несколькими факторами: высоким уровнем слепоты (обратимой) и инвалидности по зрению, значительными прямыми (затраты на хирургическое и консервативное лечение, лечение послеоперационных осложнений) и косвенными (вследствие утраты трудового потенциала общества, дорожно-транспортных происшествий, травм и падений вследствие нарушений зрения) экономическими потерями, широкой распространенностью данного заболевания, четкой тенденцией к увеличению числа людей с нарушениями прозрачности хрусталика как пенсионного, так и трудоспособного возраста [3–7].

Следует отметить, что успех лечения зависит не только от правильно построенной системы здравоохранения, но и от приверженности самих пациентов к выполнению назначенных медицинским работником рекомендаций по профилактике и лечению заболеваний [8, 9]. Неудовлетворительная приверженность является доказанным фактором риска при любых заболеваниях, который снижает эффективность и повышает затраты на лечение, увеличивает риск развития различных осложнений, ухудшает прогноз заболевания и снижает качество жизни больных [10, 11]. Экспертами ВОЗ определено большое число факторов, влияющих на приверженность пациента к лечению. Согласно классификации ВОЗ (2003 г.), все факторы разделены на пять взаимосвязанных между собой групп: 1) факторы, связанные с пациентами; 2) факторы, связанные с медицинским персоналом и организацией системы здравоохранения; 3) факторы, связанные с проводимой терапией; 4) факторы, связанные с состоянием (заболеванием) пациента; 5) группа социально-экономических факторов [12]. В этом аспекте большой интерес вызывают работы, в которых авторы предложили структурированный подход к описанию причин низкой приверженности к лечению, разделив их на пять основных категорий: социально-демографические; психологические; обусловленные заболеванием и его лечением; экономические; связанные с системой здравоохранения [1].

Восполнение дефицита исследований в отношении различных факторов, отрицательно влияющих на способность пациентов с катарактой к преодолению барьеров, связанных с приверженностью к лечению, приведет к существенному снижению частоты данной социально значимой патологии. Это представляется особенно важным для улучшения взаимного сотрудничества врача и пациента, способствует более быстрому выздоровлению, улучшению качества жизни и формированию здорового образа жизни, а также позволит разработать мероприятия по совершенствованию, повышению качества медицинской помощи пациентам с катарактой.

В связи с вышеописанным кажутся актуальными выявление и анализ существующих причин, в том числе психологических, влияющих на приверженность к лечению пациентов с катарактой.

Целью работы было оценить отношение лиц с катарактой к факторам, влияющим на приверженность к своевременному хирургическому лечению.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали данные поперечного популяционного исследования, проведенного в 2015–2017 гг. на базе Уфимского НИИ глазных болезней в рамках научно-исследовательского проекта «Ural Eye and Medical Study» (UEMS). В настоящее время UEMS является наиболее масштабным офтальмологическим популяционным исследованием в Российской Федерации, целью которого было изучение распространенности социально значимых глазных заболеваний и связанных с ними факторов риска.

Этапы исследования соответствовали общепринятым нормам и включали: разработку протокола и выбор инструмента исследования, сбор данных, шкалирование и формирование их базы, статистическую обработку, анализ и интерпретацию результатов [13, 14]. Критерии включения в исследование: добровольное согласие на участие в данном проекте; возраст старше 40 лет; постоянное проживание в исследуемых городских и сельских районах.

Для оценки нарушений прозрачности хрусталика в данном исследовании использовали системную классификацию LOCS III (Lens Opacities Classification System, 1993 г.), в соответствии с которой выделяют три типа помутнения хрусталика: ядерное, кортикальное и субкапсулярное [15]. Согласно данной классификации, ядерные помутнения хрусталика были распределены на шесть стадий. Следует отметить, что изменения ядра хрусталика, соответствующие третьей стадии и выше, имеют наибольшее значение, в связи с этим в данной работе наличие ядерной катаракты связывали с указанными изменениями.

Для изучения информированности респондентов о заболевании хрусталика и их приверженности к своевременному лечению нами было проведено анкетирование среди лиц с выявленной катарактой. Исследование проводили путем письменного опроса по специально составленной анкете. Она содержала 25 вопросов, касающихся демографических сведений (пол, возраст), социально-экономических данных (уровень образования), частоты и возможности посещения врача-офтальмолога, информированности о своем заболевании, о его факторах риска, методах лечения, а также вопросы, позволяющие оценить причины, препятствующие своевременному хирургическому лечению катаракты.

В исследовании приняли участие 546 человек, из них 253 мужчины (46,3%) и 293 женщины (53,7%), жителей города — 325 человек (59,6%), жителей села — 221 человек (40,4%), средний возраст которых составил $66,36 \pm 9,47$ года (диапазон 40–88 лет). Обоснование необходимого объема наблюдений выполнено по методике К. А. Отдельновой [16].

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета IBM SPSS Statistic версия 23.0 (SPSS: An IBM Company; США). Выбор методов описательной и сравнительной статистики для количественных признаков выполнен с учетом оценки типа их распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. По качественным признакам сравнение групп проводили, используя критерий χ^2 Пирсона или точный тест Фишера (в случае, если хотя бы в одной из ячеек таблицы сопряженности число наблюдений было менее пяти). Для характеристики одномерных регрессионных моделей и оценки степени влияния каждого предиктора на развитие заболевания (исхода) были рассчитаны следующие параметры: коэффициент регрессионной модели (β), стандартная

Таблица 1. Причины, препятствующие пациентам с катарактой посещать офтальмолога

Причина неявки на осмотр к офтальмологу	Ответы, <i>n</i> (%)
Не знал о необходимости осмотра врача	29 (19,6)
Занятость (трудовая, бытовая, сельскохозяйственная и др.)	27 (18,2)
Отсутствие нарушения зрения	22 (15,2)
Отсутствие офтальмолога в поликлинике по месту жительства	20 (13,4)
Длительная очередь на прием к офтальмологу	12 (8,2)
Отсутствие сопровождающего	9 (6,3)
Транспортные проблемы	8 (5,8)
Иное	21 (14,1)
Всего ответов	148

ошибка коэффициента модели (SE), статистика критерия χ^2 Уальда (W). На основе этих данных рассчитывали отношение шансов (ОШ), 95%-й доверительный интервал (ДИ) для ОШ и статистическую значимость предиктора. В процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень статистической значимости (p), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенного анализа установлено, что большинство опрошенных лиц отметили наличие среднего специального образования — 60,85%. Высшее образование имели 21,70% респондентов, среднее общее — 13,62% и лишь 3,83% — основное школьное. Опрос лиц старше 40 лет о поведенческих факторах, связанных со здоровьем, позволил выяснить, что 39,2% респондентов ежегодно наблюдаются у офтальмолога, 33,7% — посещают врача два раза в год или чаще, 27,1% человек проходят прием специалиста реже одного раза в год. Следует отметить, что женщины значительно чаще обращаются к офтальмологу за медицинской помощью в течение года (78,9 против 66,4%, $\chi^2 = 8,34$; $p = 0,01$). При этом практически все пациенты (68,9 мужчин и 71,9% женщин, $\chi^2 = 6,51$; $p = 0,04$) отметили, что нуждаются в постоянном медицинском наблюдении. Среди сельских жителей, при меньшей доступности для них медицинской помощи, доля обратившихся в медицинскую организацию в течение года незначительно меньше, чем среди городских (соответственно 71,6 и 73,6%, $\chi^2 = 1,13$; $p = 0,2$). Таким образом, сельские жители сохраняют активность относительно обращений в медицинские организации.

Установлено, что основная причина, не позволившая респондентам с катарактой ежегодно посещать офтальмолога, — отсутствие знаний о необходимости осмотра врача (19,6%) при сниженном зрении. Не менее важными причинами, по мнению опрошенных, являются трудовая занятость (18,2%) и отсутствие специалиста в поликлинике по месту жительства (13,4%) (табл. 1).

Для пациентов с катарактой характерна низкая тревожность, и зачастую недооценка тяжести ситуации. Они не считают свою болезнь состоянием, причиняющим значительные ограничения в повседневной жизни, предполагая, что хирургическое лечение способно полностью восстановить зрительные функции.

Для исследования уровня знаний респондентов о катаракте в анкету исследования были включены вопросы, позволяющие оценить информированность респондента об особенностях своей офтальмопатологии. Данный опрос показал хорошие знания о своем заболевании у большинства респондентов — 60,2%; 17,8% лиц обладали

только некоторыми представлениями о катаракте и 5,9% не были информированными совсем, тогда как 16,1% респондентов затруднялись с ответом на данный вопрос.

Вместе с тем нужно отметить и активную позицию по этому вопросу значительной части пациентов. Так, 60,4% из них хотели бы знать о своей болезни как можно больше, для 25,1% человек было достаточно, что информацией о заболевании владеет врач. Дополнительную информацию о заболевании большинство пациентов (65,6%) хотели бы получить именно от врача-офтальмолога, как от компетентного специалиста. При этом для получения подобной информации самостоятельно или дополнительно ресурсами Интернета воспользуются 19,3% респондентов, информационными ресурсами в самом лечебном учреждении (стенды, брошюры) — 11,1%, сведениями из научно-популярных журналов — 2,6% и 1,4% обратятся по данному вопросу к знакомым.

Одними из важных условий соблюдения рекомендаций пациентами являются высокие профессиональные качества и личностные характеристики врача, поскольку нехватка данной составляющей увеличивает вероятность самолечения [10, 20]. Результаты нашего опроса показали, что большинство из опрошенных лиц (63,6%) полностью доверяют своему лечащему врачу и высоко оценивают его профессиональный уровень, а треть респондентов (27,9%) отметили очень высокую квалификацию и личностные качества врача. Меньшинство респондентов (1,4%) не испытывают полного доверия своему врачу и не считают его специалистом высокой квалификации. Затруднились выразить свое отношение лишь 7,1% респондентов. В группе причин «неудовлетворения» своим врачом основными факторами были: недостаточное внимание врача (52,7%), неумение врача расположить к себе пациента (14,9%) и низкая компетентность врача (12,4%). Тем не менее полученные результаты могут свидетельствовать о высокой степени доверия к квалификации и личности врача.

При обращении пациента к офтальмологу врачу крайне важно объяснить клинические особенности катаракты, такие как нарушение функционального зрения, снижающее качество жизни, и предоставить информацию о современных методах лечения с индивидуальным подходом в случае обратимого снижения зрения. Так, 70,3% человек исследуемой группы указали на то, что узнали о своем заболевании глаз во время беседы с врачом; для 15,2% человек источником информации явились знакомые и родственники; для 14,5% респондентов — средства массовой информации, в том числе ТВ, Интернет, печатная продукция. Более молодые пациенты чаще получали сведения о катаракте из интернет-ресурсов, от друзей или родственников, тогда как респонденты более старших возрастных групп — от врача-офтальмолога (рис. 1).

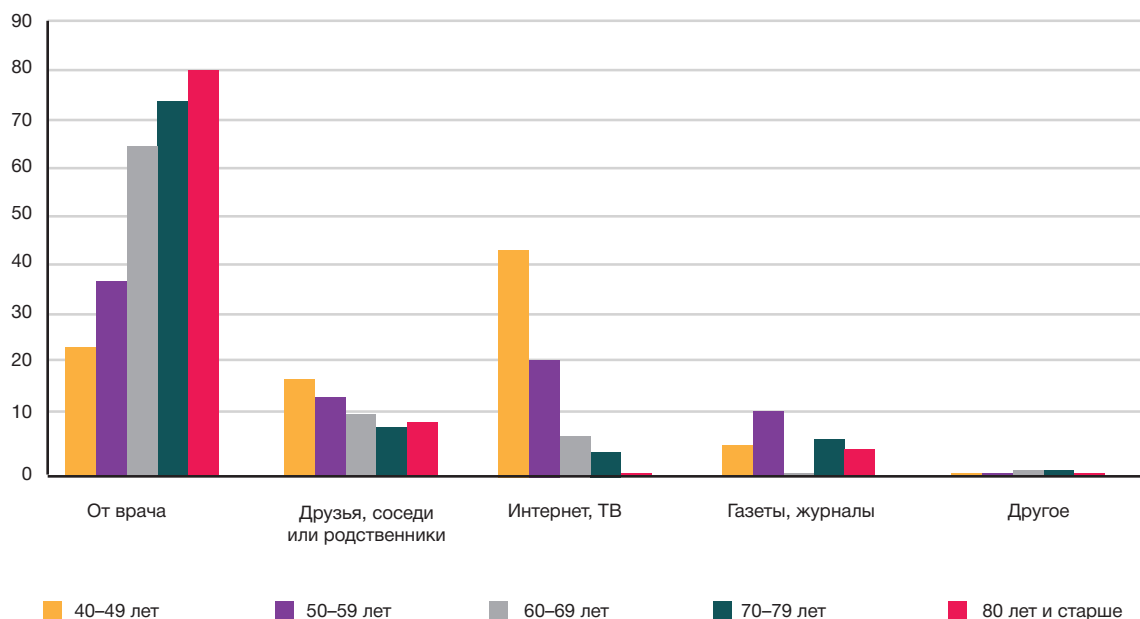


Рис. 1. Распределение респондентов по возрасту с учетом используемого источника информации о катаракте

Определена частота посещений офтальмолога в зависимости от длительности снижения зрения, возраста пациентов, наличия офтальмолога в поликлинике по месту жительства (табл. 2).

В результате анализа установлено влияние возраста пациентов на частоту посещений врача-офтальмолога. Так, увеличение возраста на один год снижает вероятность посещения специалиста в 1,24 раза. Увеличение длительности времени от момента установления диагноза катаракты среди исследуемых приводит к увеличению частоты посещения офтальмолога в 1,2 раза. Среди лиц, у которых по месту жительства в поликлинике имеется офтальмолог, вероятность ежегодного посещения данного специалиста в 1,71 раза выше, по сравнению с лицами, у которых в поликлинике по месту жительства врач отсутствует.

При изучении доверия к врачу как фактора, который оказывает влияние на приверженность к регулярному посещению врача, и готовность выполнять рекомендации специалиста, выявлена прямая связь. Рассчитанный показатель отношения шансов (ОШ = 3,6) свидетельствует о том, что шансы прохождения осмотра у офтальмолога выше среди лиц, которые испытывают доверие к врачу. Выявлена также статистически значимая зависимость между частотой посещения офтальмолога и проведением разъяснительной беседы об имеющейся офтальмопатологии. Так, вероятность посещения офтальмолога в 1,6 раза выше среди лиц, с которыми специалист проводит информационно-профилактическую беседу о течении катаракты, ее осложнениях и современных методах лечения.

Ранжированы факторы, которые, по мнению респондентов, препятствовали своевременному оперативному лечению катаракты (рис. 2). Установлено, что 36,1% опрошенных не знали о необходимости хирургического лечения катаракты. Для каждого четвертого респондента одним из значимых факторов, сдерживающих выбор в пользу своевременного оперативного лечения катаракты, была трудовая или бытовая занятость. На наличие страха предстоящего лечения указали 16,8% человека, 10,3% человек отложили оперативное лечение в связи с наличием сопутствующей соматической патологии.

Данный результат свидетельствует о недостаточной информированности пациентов о заболевании и современных методах его лечения. В этой связи актуальной задачей является информирование населения, особенно старше 40 лет, о катаракте как о серьезном заболевании, являющимся одной из причин обратимой слепоты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании выявлено, что основными факторами уменьшающими мотивацию пациента к лечению катаракты, является недостаточная информированность о заболевании и заинтересованность в хирургическом лечении. При этом частота посещений офтальмолога находится в обратной зависимости от возраста пациентов, длительности снижения зрения и в прямой зависимости от наличия офтальмолога в поликлинике по месту жительства, доверия врачу, разъяснения офтальмологом осложнений и современных методов лечения катаракты. Следует отметить, что отсутствие знаний о необходимости хирургического лечения катаракты явилось основным препятствием своевременному оперативному лечению, по мнению 36,1% респондентов, трудовая или бытовая занятость — 25,3%, наличие страха предстоящего лечения — 16,8%, в связи с наличием сопутствующей соматической патологии — 10,3%. Данный результат согласуется с показателями исследований приверженности больных к лечению в некоторых областях медицины. Так, анкетирование пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями выявило, что ведущими факторами, снижающими мотивацию к лечению, являются непонимание инструкций врача (33,7%), страх побочных эффектов и привыкания к терапии (40,2%), наличие сопутствующей патологии (35,9%) [17], а также отсутствие симптомов заболевания [18], нежелание пациента иметь зависимость от лекарств или медицинского персонала, отрицание самого факта наличия заболевания [19].

При исследованиях пациентов стоматологического профиля преобладали следующие факторы, негативно влияющие на мотивацию к лечению: возраст пациентов (преобладающее большинство лиц от 35 до 49 лет); пол (женщины обращались за помощью чаще мужчин) [20]; качество оказываемой стоматологической помощи [21];

Таблица 2. Факторы, ассоциированные с частотой посещения офтальмолога пациентами с катарактой

Показатель (фактор)	β	W	p	ОШ	95% ДИ
Возраст (лет)	-1,54	22,54	< 0,001	1,24	1,04–1,49
Длительность снижения зрения (лет)	-0,39	8,26	0,004	1,08	0,81–1,43
Длительность установленного диагноза катаракты (лет)	0,59	6,39	0,01	1,2	1,04–1,38
Наличие офтальмолога в поликлинике (1 — есть, 2 — нет)	0,55	13,54	< 0,001	1,71	1,29–2,26
Доверие врачу (1 — есть, 2 — нет)	0,33	19,248	< 0,001	3,62	3,02–4,35
Рассказал ли офтальмолог о катаракте и методах лечения (1 — да, 2 — нет)	0,48	23,63	< 0,001	1,62	1,34–1,97

Примечание: β — коэффициент регрессионной модели; SE — стандартная ошибка коэффициента модели, W — статистика критерия Уальда χ^2 , ОШ — отношение шансов, 95% ДИ ОШ — двусторонний 95% ДИ для отношения шансов.

недооценка пациентом серьезности патологии; материальные затраты, связанные с лечением [22]; страх болезненных процедур: в большинстве случаев визит к стоматологу необходим при острой боли (58,9%), 31,1% посещают стоматолога запланированно, а с целью профилактического осмотра обратились бы всего 22,8% респондентов [23].

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что факторы, связанные с личностью пациента (отсутствие информированности, занятость, страх и др.), включая психосоциальные (убеждения, мироощущение, отсутствие мотивации), так же как и недостаточно доверительные взаимоотношения между пациентом и врачом, являются наиболее значимыми барьерами в приверженности к лечению катаракты. Недостаточное владение пациентом сведений о катаракте и ее последствиях, отсутствие мотивации, положительных ожиданий от оперативного вмешательства, современных способах лечения, приводит к позднему обращению за эффективным хирургическим вмешательством, снижению качества жизни, что отражают результаты данной работы.

ВЫВОДЫ

Одна из важных задач системы здравоохранения в настоящее время — усиление работ по профилактике и лечению медико-социальных заболеваний, которые являются основной причиной слепоты и слабовидения. Повышение приверженности пациентов к лечению на современном этапе выступает одним из главных факторов улучшения состояния здоровья и повышения качества жизни населения. При анализе отношения к факторам, влияющим на приверженность к своевременному лечению лиц с катарактой, выявлено, что наиболее значимыми являются факторы, связанные с самим пациентом (недостаточная информированность о своем заболевании и заинтересованность самого пациента). Результаты исследования дают возможность оптимизировать мероприятия по совершенствованию организации медицинской помощи пациентам с катарактой с целью увеличения охвата хирургическим лечением пациентов с данной патологией.

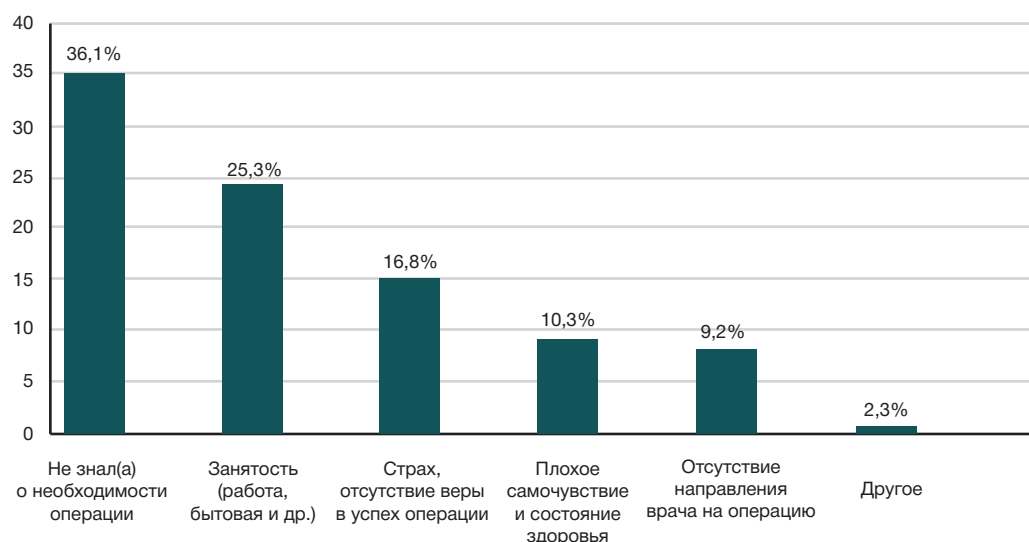


Рис. 2. Распределение причин отказа от хирургического лечения катаракты

Литература

1. Лиходей Н. В., Калашникова М. Ф., Лиходей Е. М., Фадеев В. В. Анализ факторов, препятствующих формированию приверженности лечению среди больных сахарным диабетом, и стратегий, способствующих ее повышению. Сахарный диабет. 2018; 21 (1): 5–14.
2. Brian G, Taylor H. Cataract blindness – challenges for the 21st century. Bull World Health Organ. 2001;79 (3): 249–56.
3. Бранчевский С. Л., Малюгин Б. Э. Распространенность нарушения зрения вследствие катаракты по данным исследования РААВ в Самаре. Офтальмохирургия. 2013; 3: 82–85.
4. Либман Е. С., Шахова Е. В. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России. Вестник офтальмологии. 2006; 1: 35–37.
5. Синяпко С. Ф. Состояние нормальной остроты зрения, слабости зрения, слепоты, видов рефракции, воспалительных и невоспалительных заболеваний глаз у населения Красноярского края. Вопросы офтальмологии. Абакан. 2004: 4–13.
6. Южаков А. М. Основные направления в ликвидации устранимой слепоты в Российской Федерации. Ликвидация устранимой слепоты: Всемирная инициатива ВОЗ. Материалы Российского межрегионального симпозиума. Москва, 2003; с. 27–31.
7. World Health Organization Press Office Control of major blinding diseases and disorders: Vision 2020: the Right to Sight, WHO Fact Sheet. Geneva. 2010. № 214. Available from: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact214.html/>.
8. Chowdhury R, Khan H, Heydon E, Shroufi A, Fahimi S, Moore C, et al. Adherence to cardiovascular therapy: a meta-analysis of prevalence and clinical consequences. Eur Heart J. 2013; 34 (38): 2940–8. DOI: 10.1093/eurheartj/ehd295.
9. Шварц Ю. Г., Наумова Е. А. Приверженность пациентов к лечению с позиций доказательной медицины. Международный медицинский журнал. 2005; 3: 120–125.
10. Койчужев А. А. Приверженность в лечении: методики оценки, технологии коррекции недостаточной приверженности терапии. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2013; 8 (3): 65–69.
11. Лукина Ю. В., Кутишенко Н. П., Марцевич С. Ю. Приверженность лечению: современный взгляд на знакомую проблему. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2017; 16 (1): 91–95. DOI: 10.15829/1728-8800-2017-1-91-95.
12. World Health Organization. Adherence to long-term therapies: evidence for action. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, WHO 2003; 230 pp. Available from: http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence_report/en.
13. Bikbov MM, Kazakbaeva GM, Gilmanshin TR, Zainullin RM, Arslangareeva II, Salavatova VF. et al. Axial length and its associations in a Russian population: The Ural Eye and Medical Study. PLoS One. 2019; 14 (2): e0211186. DOI: 10.1371/journal.pone.0211186.
14. Bikbov M, Fayzrakhmanov RR, Kazakbaeva G, Jonas JB. Ural Eye and Medical Study: description of study design and methodology. Ophthalmic Epidemiol. 2018; 25 (3): 187–98. DOI: 10.1080/09286586.2017.1384504.
15. Chylack LT Jr, Wolfe JK, Singer DM, Leske MC, Bullimore MA, Bailey IL, et al. The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. Arch Ophthalmol. 1993; 111 (6): 831–6. DOI: 10.1001/archophth.1993.01090060119035.
16. Отдельнова К. А. Определение необходимого числа наблюдений в социально-гигиенических исследованиях. Сборник трудов 2-го ММИ. 1980; 150 (6): 18–22.
17. Семенова О. Н., Наумова Е. А. Факторы, влияющие на приверженность к терапии: параметры ВОЗ и мнение пациентов кардиологического отделения. Бюл. мед. Интернет-конференций. 2013; 3 (3): 507–11.
18. Качковский М. А., Симерзин В. В., Краснослободская О. В. Приверженность лечению больных с фибрилляцией предсердий в условиях амбулаторно-поликлинической практики. Известия Самарского науч. центра Рос. акад. наук. 2010; 12; 1 (6): 1606–9.
19. Конобеева Е. В., Шварц Ю. Г., Корсунова Е. Н., Гафанович Е. Я. Возможности повышения осознанной мотивации пациентов кардиологического профиля. Использование стандартизированных наглядных рекомендаций. Фундаментальные исследования. 2013; 9 (1): 58–61.
20. Иванова Е. И. Мотивация обращения пациентов за пародонтологической помощью. Молодой ученый. 2014; 6: 298–301.
21. Аванесян Р. А., Сирак С. В., Ходжаян А. Б., Гевандова М. Г. Социальный состав и мотивация пациентов при обращении за имплантологической стоматологической помощью. Современ. пробл. науки и образов. 2013; 4.
22. Фирсова И. В., Михальченко В. Ф., Попова А. Н., Чаплиева Е. М. К вопросу изучения комплаентности стоматологического пациента. Volgostom. Волгоградский стоматологический портал. Доступно по ссылке: <http://www.volgostom.ru/k-voprosu-izucheniya-komplaentnosti-stomato-logicheskogo-patsienta>.
23. Фирсова И. В. Концепция комплаентности в стоматологической практике [диссертация]. Волгоград, 2009; 52 с.

References

1. Likhodey NV, Kalashnikova MF, Likhodey EM, Fadeev VV. Analiz faktorov, prepjatsstvujushhih formirovaniyu priverzhennosti lecheniju sredi bol'nyh saharnym diabetom, i strategij, sposobstvujushhih ee povysheniju. Saharnyj diabet. 2018; 21 (1):5–14. Russia.
2. Brian G, Taylor H. Cataract blindness – challenges for the 21st century. Bull World Health Organ. 2001;79 (3): 249–56.
3. Branchevsky SL, Malyugin BE. Rasprostranennost' narushenija zrenija vsledstvie katarakty po dannym issledovaniya RAAB v Samare. Oftal'mohirurgija. 2013; 3: 82–85. Russia.
4. Libman E. S., Shahova E. V. Slepota i invalidnost' vsledstvie patologii organa zrenija v Rossii. Vestnik oftal'mologii. 2006; 1: 35–37. Russia.
5. Sinjapko SF. Sostojanie normal'noj ostroty zrenija, slabovidenija, slepoty, vidov refrakcii, vospalitel'nyh i nevospalitel'nyh zabolevanij glaz u naselenija Krasnojarskogo kraja. Voprosy oftal'mologii. Abakan. 2004: 4–13. Russia.
6. Juzhakov AM. Osnovnye napravlenija v likvidacii ustranimoj slepoty v Rossijskoj Federacii. Likvidacija ustranimoj slepoty: Vsemirnaja iniciativa VOZ. Materialy Rossijskogo mezhregional'nogo simpoziuma. Moskva, 2003; s. 27–31. Russia.
7. World Health Organization Press Office Control of major blinding diseases and disorders: Vision 2020: the Right to Sight, WHO Fact Sheet. Geneva. 2010. № 214. Available from: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact214.html/>.
8. Chowdhury R, Khan H, Heydon E, Shroufi A, Fahimi S, Moore C, et al. Adherence to cardiovascular therapy: a meta-analysis of prevalence and clinical consequences. Eur Heart J. 2013; 34 (38): 2940–8. DOI: 10.1093/eurheartj/ehd295.
9. Shvarc YuG, Naumova EA. Priverzhennost' pacientov k lecheniju s pozicij dokazatel'noj mediciny. Mezhdunarodnyj medicinskij zhurnal. 2005; 3: 120–125.
10. Koichuev AA. Priverzhennost' v lechenii: metodiki ocenki, tehnologii korekcii nedostatochnoj priverzhennosti terapii. Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza. 2013; 8 (3): 65–69.
11. Lukina YuV, Kutishenko NP, Marcevic SYu. Priverzhennost' lecheniju: sovremennij vzgljad na znakovuju problemu. Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika. 2017; 16 (1): 91–95. DOI: 10.15829/1728-8800-2017-1-91-95. Russia.
12. World Health Organization. Adherence to long-term therapies: evidence for action. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, WHO 2003; 230 pp. Available from: http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence_report/en.

13. Bikbov MM, Kazakbaeva GM, Gilmanshin TR, Zainullin RM, Arslangareeva II, Salavatova VF. et al. Axial length and its associations in a Russian population: The Ural Eye and Medical Study. PLoS One. 2019; 14 (2): e0211186. DOI: 10.1371/journal.pone.0211186.
14. Bikbov M, Fayzrakhmanov RR, Kazakbaeva G, Jonas JB. Ural Eye and Medical Study: description of study design and methodology. Ophthalmic Epidemiol. 2018; 25 (3): 187–98. DOI: 10.1080/09286586.2017.1384504.
15. Chylack LT Jr, Wolfe JK, Singer DM, Leske MC, Bullimore MA, Bailey IL, et al. The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. Arch Ophthalmol. 1993; 111 (6): 831–6. DOI: 10.1001/archoph.1993.01090060119035.
16. Otdelnova KA. Opredelenie neobhodimogo chisla nabljudenij v social'no-gigienicheskikh issledovaniyah. Sbornik trudov 2-go MMI. 1980; 150 (6): 18–22. Russia.
17. Semenova ON, Naumova EA. Faktory, vlijajushhie na priverzhennost' k terapii: parametry VOZ i mnenie pacientov kardiologicheskogo otdelenija. Bjul med Internet-konferencij. 2013; 3 (3): 507–11. Russia.
18. Kachkovskij MA, Simerzin VV, Krasnoslobodskaya OV. Priverzhennost' lecheniju bol'nyh s fibrilljaciej predserdij v uslovijah ambulatorno-poliklinicheskoi praktiki. Izvestija Samarskogo nauch. centra Ros. akad. nauk. 2010; 12; 1 (6): 1606–9. Russia.
19. Konobeeva EV, Shvarc YuG, Korsunova EN, Gafanovich EYa. Vozmozhnosti povyshenija osoznannoi motivacii pacientov kardiologicheskogo profilja. Ispolzovanie standartizirovannyh nagljadnyh rekomendacij. Fundamental'nye issledovaniya. 2013; 9 (1): 58–61. Russia.
20. Ivanova EI. Motivacija obrashhenija pacientov za parodontologicheskoi pomoshh'ju. Molodoi uchenyi. 2014; 6: 298–301. Russia.
21. Avanesyan RA, Sirak SV, Hodzhayan AB, Gevandova MG. Social'nyi sostav i motivacija pacientov pri obrashhenii za implantologicheskoi stomatologicheskoi pomoshh'ju. Sovrem. probl. nauki i obrazov. 2013; 4. Russia.
22. Firsova IV, Mihalchenko VF, Popova AN, Chaplieva EM. K voprosu izucheniya komplaentnosti stomatologicheskogo pacienta. Volgostom. Volgogradskij stomatologicheskij portal. Dostupno po ssylke: <http://www.volgostom.ru/k-voprosu-izucheniya-komplaentnosti-stomato-logicheskogo-patsienta>. Russia.
23. Firsova IV. Konceptija komplaentnosti v stomatologicheskoi praktike [dissertacija]. Volgograd, 2009; 52 s. Russia.