

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 Наталия Усман

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. Боженко, 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.2022-02

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

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

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



Подписано в печать 30.04.2022

Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
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 Natalia Usman

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)

Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)

Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Platonova AG, DSc (Kiev, Ukraine)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)

Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Skoblina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)

Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Takhchidi KhP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2021: 0.5



Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5



Five-year h-index is 8



SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14



Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive



Issue DOI: 10.24075/brsmu.2022-02

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

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

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



Approved for print 30.04.2022

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5

Разработка рекомбинантного онколитического штамма полиовируса 3-го типа с измененным клеточным тропизмом

А. Н. Хамад, А. В. Соболева, П. О. Воробьев, М. А. Махмуд, К. В. Василенко, П. М. Чумаков, А. В. Липатова

Development of a recombinant oncolytic poliovirus type 3 strain with altered cell tropism

Hamad A, Soboleva AV, Vorobyev PO, Mahmoud M, Vasilenko KV, Chumakov PM, Lipatova AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

12

Модели митохондриальной дисфункции с индуцируемой экспрессией мутантного варианта гена *Polg*

М. В. Кубекина, А. А. Калинина, Д. С. Коршунова, А. В. Брутер, Ю. Ю. Силаева

Models of mitochondrial dysfunction with inducible expression of *Polg* pathogenic mutant variant

Kubekina MV, Kalinina AA, Korshunova DS, Bruter AV, Silaeva YY

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

20

Следы взаимодействия финноязычного, славянского и тюркоязычного населения в современном генофонде и их отражение в фармакогенетике

Е. В. Балановская, И. О. Горин, Г. Ю. Пономарев, В. Ю. Пылёв, В. С. Петрушенко, Н. В. Маркина, А. Д. Мамаева, А. К. Ларин, А. Т. Агджоян

Footprints of interaction among Finnic-speaking, Slavic, and Turkic-speaking populations in modern gene pool and their reflection in pharmacogenetics

Balanovska EV, Gorin IO, Ponomarev GY, Pylev VY, Petrushenko VS, Markina NV, Mamaeva AD, Larin AK, Agdzhoian AT

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

30

Активность ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом

Д. Г. Кулцова, С. В. Петричук, Н. Н. Мурашкин, О. В. Курбатова, Т. В. Радыгина, А. А. Хотко, Р. А. Иванов

Activity of nuclear factor κB in lymphocyte populations of children with psoriasis

Kuptsova DG, Petrichuk SV, Murashkin NN, Kurbatova OV, Radygina TV, Khotko AA, Ivanov RA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

39

Влияние векторной вакцины от COVID-19 на профиль аутоантител у женщин репродуктивного возраста

А. А. Довгань, Ю. С. Драпкина, Н. В. Долгушина, И. В. Менжинская, Л. В. Кречетова, Г. Т. Сухих

Effects of COVID-19 vector vaccine on autoantibody profile in reproductive age women

Dovgan AA, Drapkina YuS, Dolgushina NV, Menzhinskaya IV, Krechetova LV, Sukhikh GT

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

47

Опыт применения тоцилизумаба у стационарных пациентов со среднетяжелым течением COVID-19

О. А. Бургасова, С. В. Долинный, В. Б. Тетова, Д. А. Огаркова, М. А. Одноралов, В. В. Бакалин, С. В. Сметанина, Н. А. Антипаят, М. В. Таранова

Experience of tocilizumab in hospital patients with moderate COVID-19

Burgasova OA, Dolinniy SV, Tetova VB, Ogarkova DA, Odnoralov MA, Bacalin VV, Smetanina SV, Antipyat NA, Taranova MV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

54

Микроглия и предполагаемые макрофаги субфорникального органа: структурно-функциональные особенности

В. В. Гусельникова, В. А. Разенкова, Д. А. Суфиева, Д. Э. Коржевский

Microglia and putative macrophages of the subfornical organ: structural and functional features

Guselnikova VV, Razonkova VA, Sufieva DA, Korzhevskii DE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

62

Регенеративные эффекты пептидов Gly-His-Lys и Gly-His-Lys -D-Ala при кожной инфицированной ране

К. К. Рахметова, Е. С. Мишина, А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, М. Е. Долгинцев, А. И. Бежин

Regenerative effects of Gly-His-Lys and Gly-His-Lys-D-Ala peptides in infected skin wounds

Rakhmetova KK, Mishina ES, Vorvul AO, Bobyntsev II, Dolgintsev ME, Bezhin AI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

69

Особенности процессов консолидации и реконсолидации памяти при зрительных и слуховых нарушениях в пожилом возрасте

И. А. Захарова, Е. А. Петраш, В. Б. Никишина, Т. Н. Разуваева, Т. В. Шутеева

Specific features of memory consolidation and reconsolidation in older individuals with vision and hearing impairments

Zakharova IA, Petrash EA, Nikishina VB, Razuvaeva TN, Shuteeva TV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

77

Гемоперфузия и функциональное состояние макулы после сочетанной трансплантации почки и поджелудочной железы

И. В. Воробьева, Е. В. Булава, Л. К. Мошетова, А. В. Пинчук

Hemoperfusion and functional state of the macula after simultaneous pancreas and kidney transplantation

Vorobyeva IV, Bulava EV, Moshetova LK, Pinchuk AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

83

Влияние фактора миграции на становление менструальной функции у девочек

О. Ю. Милушкина, В. И. Попов, Н. А. Скоблина, Н. А. Бокарева, Е. В. Асташкевич, А. А. Захарова, Е. В. Скоблина

The influence of migration factor on the establishment of menstrual function in girls

Milushkina OYu, Popov VI, Skoblina NA, Bokareva NA, Astashkevich EV, Zakharova AA, Skoblina EV

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

88

Застарелый задний переломовывих плеча

К. А. Егиазарян, Д. С. Ершов, Д. А. Бадриев, Д. Ю. Сошников

Chronic non-treated posterior fracture-dislocation of the shoulder

Egjazaryan KA, Ershov DS, Badriev DA, Soshnikov DY

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

93

Влияние ориентационных характеристик изображения на распределение зрительных фиксаций при решении простых когнитивных задач

В. Б. Никишина, Е. А. Петраш, О. Ф. Природова, Р. С. Ахраменко, А. В. Данилова, А. А. Кузнецова

The impact of image orientation on distribution of visual fixations while solving simple cognitive problems

Nikishina VB, Petrash EA, Prirodova OF, Akhramenko RS, Danilova AV, Kuznetsova AA

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ШТАММА ПОЛИОВИРУСА 3-ГО ТИПА С ИЗМЕНЕННЫМ КЛЕТЧНЫМ ТРОПИЗМОМ

А. Н. Хамад^{1,2,3}, А. В. Соболева¹, П. О. Воробьев¹, М. А. Махмуд^{1,2}, К. В. Василенко⁴, П. М. Чумаков¹, А. В. Липатова¹✉

¹ Московский физико-технический институт (МФТИ), Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия

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

Диффузная глиома является неизлечимым заболеванием, наиболее распространенным и агрессивным типом опухолей ЦНС. Разработка высокоонкоселективных вирусных штаммов для терапии злокачественных новообразований является актуальной задачей. Целью работы было создание онколитического вируса на базе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа, обладающего природной противоопухолевой активностью, путем замены IRES полиовируса соответствующим участком из риновируса человека 30 типа. В результате был успешно получен рекомбинантный онколитический штамм RVP3, сохранивший серотип полиовируса 3-го типа, что было подтверждено микрореакцией нейтрализации специфической антисывороткой. Онколитическая эффективность RVP3 была оценена *in vitro* на широкой панели клеточных культур. RVP3 изменил тропизм, потеряв способность эффективно реплицироваться в условно нормальных клеточных линиях эмбриональных астроцитов и эмбриональных фибробластов, сохранив способность эффективно реплицироваться в опухолевых клетках.

Ключевые слова: онколитическая виротерапия, глиома, вакцинный штамм полиовируса

Финансирование: проект был поддержан Российским научным фондом (Соглашение №20-75-10157 от 14 августа 2020 г. «Изучение возможностей получения рекомбинантных штаммов онколитических вирусов с опухоль-специфической репликацией и экспрессией иммуномодулирующих белков»).

Вклад авторов: П. М. Чумаков, А. В. Липатова — разработка концепции и плана экспериментов, анализ данных; А. Н. Хамад, П. О. Воробьев, А. В. Соболева, М. А. Махмуд, К. В. Василенко и А. В. Липатова — проведение лабораторных экспериментов; А. Н. Хамад, А. В. Соболева и А. В. Липатова — подготовка рисунков и интерпретация результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) и последующих ее пересмотров; с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Валерьевна Липатова
ул. Вавилова, д. 32/1, г. Москва, 119991, Россия; lipatovaanv@gmail.com

Статья получена: 18.04.2022 **Статья принята к печати:** 28.04.2022 **Опубликована онлайн:** 30.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.023

DEVELOPMENT OF A RECOMBINANT ONCOLYTIC POLIOVIRUS TYPE 3 STRAIN WITH ALTERED CELL TROPISM

Hamad A^{1,2,3}, Soboleva AV¹, Vorobyev PO¹, Mahmoud M^{1,2}, Vasilenko KV⁴, Chumakov PM¹, Lipatova AV¹✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), Moscow, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Diffuse gliomas are incurable, prevalent, and aggressive central nervous system tumors. Therefore, the development of selective oncolytic viral strains for malignant neoplasms is highly relevant. This study aimed to create an oncolytic virus based on a vaccine strain of poliovirus type 3 with natural antitumor activity. To achieve this goal, we replaced the internal ribosome entry site (IRES) of poliovirus with the corresponding fragment of human rhinovirus 30. The resulting recombinant oncolytic strain RVP3 retained the serotype of poliovirus type 3, as confirmed by virus neutralization micro-test with specific antiserum. In addition, the oncolytic efficacy of RVP3 was assessed *in vitro* on a broad panel of cell cultures. According to the results, RVP3 has changed its tropism, losing the ability to replicate in conditionally normal cell lines of embryonic astrocytes and embryonic fibroblasts while retaining the ability to replicate in tumor cells.

Keywords: oncolytic viral therapy, glioma, vaccine strain of poliovirus

Funding: the project was supported by the Russian Science Foundation (agreement number 20-75-10157 of 14 August 2020 "Research on the possibilities of obtaining recombinant strains of oncolytic viruses with tumor-specific replication and immunomodulatory protein expression").

Author contribution: Chumakov PM, Lipatova AV — study concept and planning, data analysis; Hamad A, Vorobyev PO, Soboleva AV, Mahmoud M, Vasilenko KV, and Lipatova AV — laboratory experimental work; Hamad A, Soboleva AV, and Lipatova AV — preparation of figures and data interpretation.

Compliance with ethical standards: the study was conducted per the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki 2000 and its subsequent revisions; in compliance with the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia V. Lipatova
Vavilova, 32/1, Moscow, 119991, Russia; lipatovaanv@gmail.com

Received: 18.04.2022 **Accepted:** 28.04.2022 **Published online:** 30.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.023

Диффузная глиома является наиболее распространенным и агрессивным типом первичных злокачественных новообразований центральной нервной системы [1]. Рецидивы глиобластомы наблюдаются почти в 100% случаев и несмотря на использование всех стандартных лечебных подходов, включающих хирургическое удаление опухоли, лучевую, химио- и таргетную терапию, средняя выживаемость пациентов остается в пределах 12–18 месяцев после постановки диагноза [2]. В качестве альтернативного метода лечения была предложена вирусная терапия, основанная на применении непатогенных онколитических штаммов. Такие штаммы могут обладать природной тропностью к опухолевым клеткам, или их противоопухолевые свойства могут быть целенаправленно усилены путем модификации их генома. Развитие продуктивной инфекции в опухоли приводит к активации систем врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета [3–5], что способствует уничтожению опухолевых клеток.

Для терапии глиобластомы был разработан и испытан эффективный рекомбинантный онколитический штамм PVS-RIPO [6]. Внутриопухолевое введение PVS-RIPO в сочетании с химиотерапией и лучевой терапией привело к долговременным ремиссиям (более трех лет) у 21% пациентов [7].

PVS-RIPO представляет собой аттенуированный непатогенный онколитический вирус, созданный на основе вакцинного штамма полиовируса 1-го типа Сэбина, в котором внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) на значительном протяжении содержит участок IRES риновируса человека типа 2 (HRV2). Его противоопухолевое действие основано на естественном тропизме полиовирусов к опухолевым клеткам, в том числе к опухолям нервной системы. Полиовирусы проникают в клетки через клеточный рецептор PVR/CD155, экспрессия которого существенно повышена в клетках солидных опухолей и клетках опухолевого микроокружения [7–9]. Однако существуют опасения, что при системном и внутриопухолевом введении полиовирусы могут проявлять нейротоксичность в связи с их способностью заражать нормальные нейроны. Тропизм полиовирусов обусловлен не только присутствием на клетке поверхностного рецептора, но и структурой вирусного IRES, обеспечивающего взаимодействие с рядом тканеспецифических клеточных факторов, влияющих на эффективность инициации трансляции вирусных РНК [10, 11]. Так, клеточный фактор DRBP76 способен связываться со структурным элементом на 3'-участке IRES риновируса HRV2, подавляя инициацию трансляции полиовирусной РНК в клетках нейронного происхождения [12]. Тропизм полиовирусов в отношении нейронов можно частично объяснить отсутствием ингибирующего связывания DRBP76 с полиовирусным IRES. Химерный IRES, сохранивший крестообразную 5'-концевую шпильку полиовирусной РНК и содержащий внутреннюю часть IRES риновируса сужает круг чувствительных к вирусу клеток, в результате чего его тропизм ограничивается опухолевыми клетками, происходящими из глии и

некоторых других тканей, дающих начало злокачественным новообразованиям человека, но не поражает нейроны [13]. Помимо опухолей головного мозга PVS-RIPO испытывают для терапии неоперабельных случаев меланом [14]. В целом многие чувствительные к иммунотерапии опухоли могут оказаться восприимчивы к виротерапии. Разработка таких штаммов в условиях увеличивающейся заболеваемости злокачественными новообразованиями становится особенно актуальной задачей. Связанные с использованием гетерологичных IRES изменения в тропизме вирусов в отношении индивидуальных опухолей пациентов расширяют потенциальный арсенал штаммов, из которых возможен персонализированный подбор онколитических препаратов. В связи с этим мы создали на основе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа Сэбина рекомбинантный онколитический вирус, в котором IRES полиовируса был заменен соответствующим участком из риновируса человека 30-го типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание рекомбинантного вирусного штамма RVP3

Рекомбинантный штамм RVP3 создавали на базе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа (Сэбин – PV3S). Плазмидная конструкция на основе pUC18, кодирующая геном PV3S под управлением T7 промотора, была разработана в лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН. Генетическую последовательность 5'-некодирующего участка риновируса A30 заимствовали из базы данных GenBank (Human rhinovirus 30 strain ATCC VR-1140, FJ445179.1). Участок генома HRV30 (от 108-го до 521-го нуклеотида) был синтезирован IDT DNA (США). Плазмидную конструкцию, кодирующую геном рекомбинантного штамма, получили путем безлигазного клонирования двух фрагментов, наработанных в ходе ПЦР с праймерами, приведенными в таблице в соответствии с протоколом, описанным ранее [15]. Схема итоговой последовательности представлена на рис. 1.

Для получения инфекционной геномной РНК плазмидную конструкцию трансфецировали в клетки линии HEK293T совместно с плазмидой, экспрессирующей кодон-оптимизированную полимеразу бактериофага T7, в соответствии с описанным ранее протоколом [16], спустя 36–48 ч собирали питательную среду и использовали для заражения свежих клеток HEK293T, после чего отслеживали появление фокусов цитопатического действия и формирование бляшек.

Наработка вирусных штаммов

Наработку энтеровирусов PV3S и RVP3 проводили на клеточных линиях RD и HEK293T. Клетки рассевали за сутки до заражения, при 70%-й конфлюэнтности и множественности (MOI), равной 0,1 инф. ед. на клетку. Цитопатическое действие развивалось спустя 24 ч. Вирусосодержащий супернатант осветляли от клеточного

Таблица. Перечень олигонуклеотидных последовательностей, используемых для наработки последовательности ДНК RVP3

№	Название	Последовательность	Температура плавления, °C
1	HRV30 IRES for	tttatacctccctccctagaagtttacataaagaccaataggt	56
2	HRV30 IRES rev	taagttaaggagtaaaacgcgaattgctcattacgact	56
3	P3vect for	ttttactcctaacttattgaaattgtttgaagac	57
4	P3vect rev	ggggaggagatataaacaggcgta	57

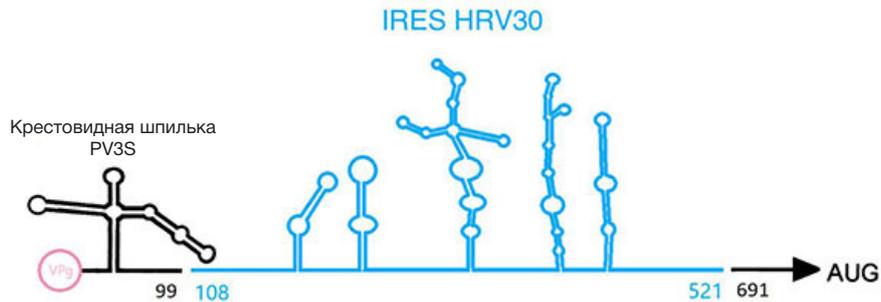


Рис. 1. Схема RVP3. Химерный участок составлен из IRES риновируса и полиовируса 3-го типа

дебриса центрифугированием при +4 °С, 2500 об./мин в течение 15 мин. Вирусосодержащую жидкость делили на аликвоты по 0,5 мл и хранили при –80 °С до проведения экспериментов.

Получение противовирусной нейтрализующей антисыворотки иммунизированной овцы и проведение микрореакции нейтрализации

В исследовании использовали шестимесячного ягненка породы Дорпер. Ягненок был получен от заводчиков фермы «Капри» (Калужская область). Содержали ягненка в условиях фермы, в рацион входило сено, комбикорм, витаминные добавки, проводились регулярные мероприятия по обработке против гельминтов.

Смешивали 1 мл вирусосодержащей жидкости (10^9 инф. ед) с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (DIFCO; США), гомогенизировали до получения стабильной суспензии и вводили ягненку внутрикожно в объеме по 0,1 мл с двух сторон в область заднего бедра и по 0,4 мл внутримышечно с двух сторон в область бедер. Далее инъекции проводили аналогично, но в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (DIFCO; США) 4 раза с интервалом 7 дней. В ходе проведения эксперимента ягненок содержался отдельно от стада. Через 7 суток после пятого введения проводили забор крови с помощью нескольких вакуумных пробирок с коагулянтом объемом 9 мл — суммарно 40 мл из яремной вены. Животное не подлежало умерщвлению и присоединялось к стаду. Отобранную кровь оставляли на 4 ч до формирования сгустка, после чего осветляли центрифугированием при 5000 об./мин 15 мин. Полученную сыворотку делили на аликвоты и хранили при –70 °С.

В качестве дополнительного теста серотипа нового штамма проводили микротест на нейтрализацию инфекционности специфичной овечьей антисывороткой к полиовирусу 3-го типа, как подробно описано ранее [17]. Для этого вирусосодержащий раствор инкубировали в течение 2 ч с антисывороткой при 23 разведениях (1 : 10 000, 1 : 7500, 1 : 5 000, 1 : 4 000, 1 : 3500, 1 : 3000, 1 : 2500, 1 : 2000, 1 : 1500, 1 : 1000, 1 : 750, 1 : 500, 1 : 200, 1 : 100, 1 : 75, 1 : 50, 1 : 30, 1 : 20, 1 : 15, 1 : 10, 1 : 7, 1 : 5, 1 : 1). Кроме PV3S и RVP3 так же тестировали другие непатогенные онколитические штаммы: Коксаки B5 (GenBank: MG642820.1), Коксаки A7 (GenBank: JQ041367.1) и прототипный штамм Travis Эховируса 12 типа (GenBank: X79047.1).

Оценка чувствительности клеточных линий к заражению и продуктивности вирусной репликации

Для проверки чувствительности клеточной линии к заражению вирусами испытываемые клетки высевали

на 96-луночные планшеты до конфлюэнтности 40% (4000–8000 клеток на лунку, в зависимости от культуры). На следующий день клетки инфицировали вирусом в широком диапазоне множественности (MOI от 0,001 до 100) в бессывороточной среде DMEM. Через час после адсорбции вируса среду заменяли на DMEM с 1% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Через 72 ч оценивали жизнеспособность клеток постановкой МТТ-теста. Для удобства интерпретации значения $TCID_{50}$ рассчитывали по методу Рида и Менча [18]. Титрования проводили в четырех технических параллелях и трех независимых биологических повторностях эксперимента.

Для проверки продуктивности репликации клетки высевали на 12-луночный планшет, заражение проводили путем инкубации клеток 50%-й конфлюэнтности с вирусом в течение 1 ч (MOI = 0,1) при 37 °С в среде DMEM. Отмытые от вируса клетки помещали в свежую среду с 0,5% ФБС. Через 48 ч после инфицирования собирали супернатанты. Продуктивность вирусной репликации определяли путем титрования на клетках HEK293T заражением серийными разведениями супернатантов (метод Рида и Менча).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оживление и наработка RVP3 в культуре

В результате трансфекции плазмиды, кодирующей геном RVP3 в присутствии плазмиды, экспрессирующей кодон-оптимизированную полимеразу бактериофага T7, через 48 ч в клеточном супернатанте появились инфекционные частицы, наличие которых определяли по цитопатическому действию после повторного заражения свежего монослоя клеток HEK293T. В дальнейшем вирус прошел более 15

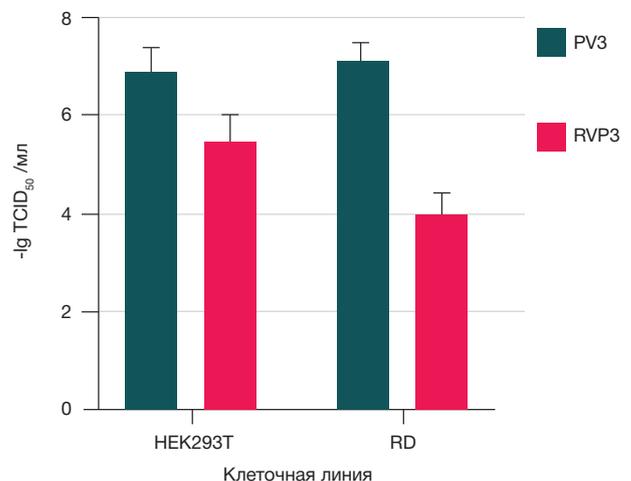


Рис. 2. Сравнение вирусного титра на чувствительных к энтеровирусам культурах клеток RD и HEK293T

адаптационных пассажей, после чего была проведена его наработка на линиях HEK293T и RD. Титр вируса был определен методом Рида и Менча и проведено сравнение продуктивности наработки в сравнении с PV3S (рис. 2). Для дальнейшей наработки вируса была выбрана культура HEK293T, поскольку на ней вирус реплицировался наиболее эффективно.

RVP3 сохраняет серотип полиовируса 3-го типа

Микрореакция нейтрализации подтвердила эффективную инактивацию PV3S в разведении 1/3000–1/2500. Данный тест подтвердил также высокую специфичность сыворотки: перекрестная инактивация энтеровирусов другого серотипа (вирусов Коксаки А7, В5 и эховируса 12) была эффективна лишь в разведениях 1/10–1/7. Вирус RVP3 инактивировался овечьей антисывороткой против PV3 в разведениях 1/2000–1/1500, что свидетельствует о сохранении серотипа полиовируса 3-го типа (рис. 3).

Сравнение цитолитической активности RVP3 и PV3S *in vitro*

Сравнительная оценка способности нового штамма RVP3 и исходного штамма PV3S оказывать цитолитическое действие на ряд линий опухолевых и условно нормальных культур клеток приведена на рис. 4. Опухолевые линии были представлены модельными культурами глиобластом DBTRG-05 MG, A-172 и U-251 MG (из коллекции ATCC; США) и малопассажными линиями глиобластом PrGI1, PrGI2, PrGI3, PrGI4, PrGI5 и PrGI6, полученными и охарактеризованными в лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН [19], тремя модельными линиями нейробластом SK-N-MC, Lan1 и IMR-32, приобретенными в коллекции Института цитологии РАН (Россия), а также две опухолевые линии клеток RD и HOS из коллекции лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН. В качестве условно нормальных клеток были использованы эмбриональные фибробласты человека (HEF) и нормальные эмбриональные астроциты, полученные из лаборатории иммунохимии НМИЦ ПН им. В. П. Сербского (Россия), а также мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от двух разных пациентов (peripheral blood mononuclear cells, PBMC).

Оба вируса продемонстрировали высокую онколитическую активность в отношении исследованной панели культур. Продуктивность репликации RVP3 была существенно ниже, причем особенно существенное снижение было отмечено на эмбриональных фибробластах и эмбриональных астроцитах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка онкоселективных штаммов, обладающих усиленной способностью реплицироваться в клетках злокачественных опухолей при отсутствии поражения нормальных клеток в органах и тканях является важным этапом на пути скорейшего внедрения онколитической вирусной терапии в клиническую практику.

Тропизм энтеровирусов в отношении различных типов клеток определяется не только различиями в экспрессии на поверхности клеток специфичных белков, используемых вирусами в качестве рецепторов проникновения, но и структурой 5'-концевых нетранслируемых участков, представленных областью внутренней посадки

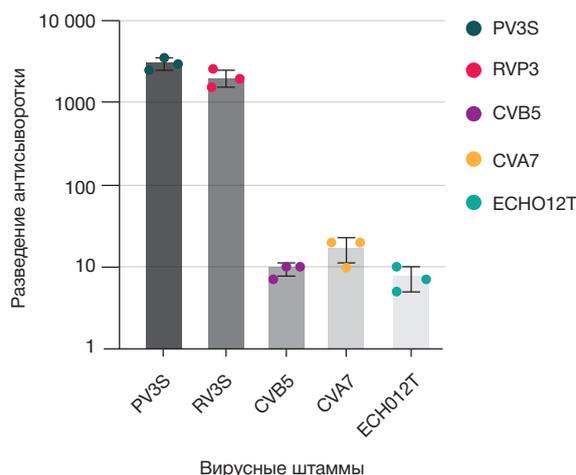


Рис. 3. Анализ результатов микрореакции нейтрализации штаммов антисывороткой к полиовирусу 3-го типа

рибосом. Эффективность трансляции вирусной РНК во многом зависит от связывания тех или иных клеточных регуляторных факторов, присутствие которых может варьироваться в широких пределах в клетках как различных тканей, так и индивидуальных опухолей пациентов. В этой связи один и тот же вирусный штамм может оказаться эффективным в отношении опухоли одного пациента, но не способным реплицироваться и убивать клетки другого пациента, в которых экспрессия необходимых рецепторов или внутренних факторов ограничена. На фоне такого разнообразия опухолевых клеток для онколитической вирусной терапии требуется персонализированный подбор препаратов из большого арсенала вирусных штаммов, обладающих различным клеточным тропизмом. Замена IRES может быть источником дополнительного разнообразия вирусных штаммов, а также инструментом для изучения влияния отдельных структурных элементов на способность заражать те или иные типы клеток.

Основываясь на этой концепции, мы сконструировали рекомбинантный вариант на основе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа (PV3S). Из трех вакцинных штаммов полиовирусов PV3S демонстрировал наиболее эффективные литические свойства в отношении первичных линий глиобластомы. В IRES PV3S есть всего лишь одна нуклеотидная замена, по сравнению с диким патогенным штаммом PV3 Leon, из которой он был получен путем длительного пассирования в клетках обезьян *in vitro* и *in vivo* [20]. PV3S при этом намного чаще чем PV1S был причиной ассоциированного с вакцинацией полиомиелита в результате реверсий [21]. Поэтому замена регуляторного участка на IRES риновируса полностью предотвращает возможность реверсий и повышает безопасность потенциального онколитического вируса.

В результате повсеместной вакцинации от полиомиелита трехвалентной живой полиовирусной вакциной, почти все население планеты обладает пожизненным иммунитетом. Однако эффективность нейтрализации PV3S антителами вакцинированных людей минимальна по сравнению с двумя другими вариантами полиовирусов [22], что может обеспечить ему большую эффективность при терапии онкологических заболеваний.

По результатам испытания продуктивности вирусной инфекции на панели опухолевых и нормальных клеток (рис. 4) обнаружено существенное изменение тропизма RVP3 по сравнению с PV3S. Только в клетках остеосаркомы HOS вирус RVP3 реплицировался так же эффективно, как

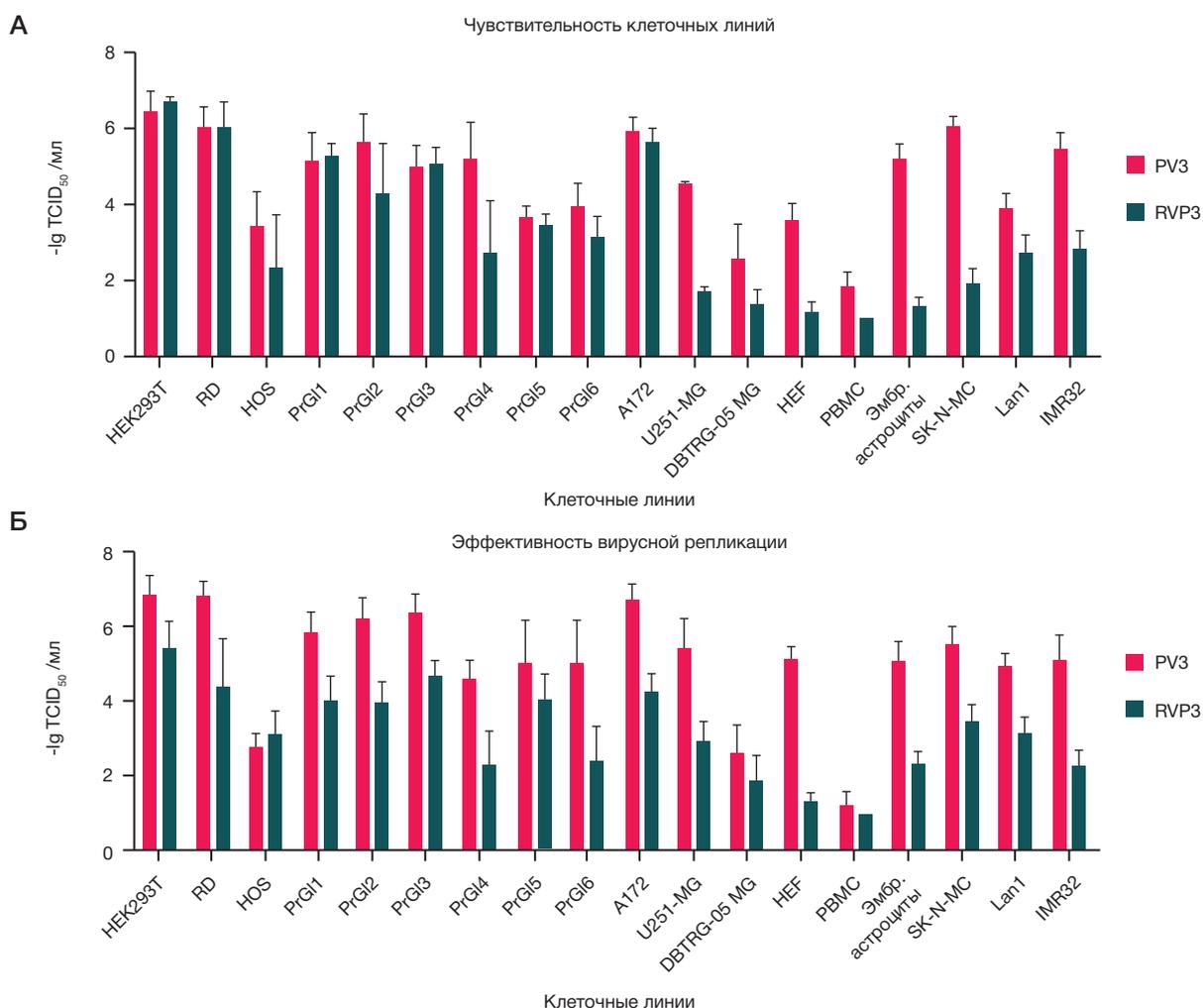


Рис. 4. Оценка потенциала RVP3 и PV3S *in vitro*. **А.** Чувствительность клеточных линий к вирусу. **Б.** Продуктивность вирусной репликации

PV3S, в остальных же типах клеток рекомбинантный вирус реплицировался на 2–4 порядка хуже. При этом менялась и относительная эффективность репликации: там, где PV3S показывал лучшую репликацию (например, в клетках PrG16 и U251MG), RVP3 мог показывать средние или худшие результаты. Мы не заметили также принципиальных различий между репликацией RVP3 в клетках нейронного происхождения, представленных нейробластомами. Хотя по сравнению с PV3S репликация RVP3 в клетках SK-N-MC, Lan1 и IMR-32 была снижена, она все же проходила и приводила к гибели клеток. Можно предположить, что нейробластомы существенно изменяют спектры экспрессии белковых факторов, взаимодействующих с IRES, что объясняет приобретение нейробластомами чувствительности к вирусу, который неспособен заражать нормальные нейроны.

Мы обнаружили также, что RVP3 обладает более высокой онкоселективностью, поскольку продуктивность его репликации в нормальных астроцитах и эмбриональных фибробластах была снижена по сравнению с репликацией PV3S на три и четыре порядка соответственно, а способность вируса реплицироваться в мононуклеарных клетках остается на минимальном уровне.

Более миллиарда случаев применения живой оральной полиомиелитной вакцины, способной попадать через Пейеровы бляшки в кровь и затем проходить гематоэнцефалический барьер, подтвердили, что использование таких вакцин, в частности, вакцинного

штамма полиовируса 3-го типа не приводит к неврологическим симптомам и появлению вируса в ЦНС. Клетки, пассируемые *in vitro*, как правило, более восприимчивы к вирусам, чем клетки организма. В процессе пассирования на искусственных средах метаболизм клеток существенно перестраивается [23]. Примечательно, что факт восприимчивости клеток *in vitro* не является показателем патогенности вируса. Однако для проявления патогенности репликация вируса в клетках важна, и, если вирус ограничен в репликации *in vitro*, он с меньшей вероятностью может оказаться патогенным. Поэтому терапевтические вирусные штаммы должны обладать максимальной репликативной способностью в клетках опухоли пациента, но оказывать минимальное воздействие на клеточные компоненты нормальных тканей.

Дальнейшее изучение роли IRES в определении способности энтеровирусов реплицироваться в различных типах опухолевых и нормальных клеток будет способствовать созданию еще большего разнообразия безопасных терапевтических вирусных штаммов и пополнять арсенал средств для персонализированной терапии онкологических больных.

ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный онколитический штамм RVP3, в котором IRES полиовируса был заменен соответствующим участком из риновируса человека 30-го типа. Данный

штамм может быть успешно наработан на модельных клеточных культурах. RVP3 сохранил серотип полиовируса 3-го типа. Онколитическая эффективность RVP3 была оценена *in vitro* на широкой панели клеточных культур. Штамм несколько изменил тропизм, существенно снизив способность реплицироваться в условно нормальных

клеточных линиях эмбриональных астроцитов и эмбриональных фибробластов. Отмечено также изменение спектра воздействия рекомбинантного вируса в отношении ряда линий опухолевых клеток, что придает ему отличные свойства по сравнению с исходным вакцинным штаммом полиовируса.

Литература

- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021; 23: 1231–51.
- Carpenter AB. Recombinant oncolytic poliovirus for glioblastoma: A current review of PVS (RIPO). *Georgetown Medical Review.* 2019; 3: 7789.
- Brown MC, Dobrikova EY, Dobrikov MI, Walton RW, Gemberling SL, Nair SK, et al. Oncolytic polio virotherapy of cancer. *Cancer.* 2014; 120: 3277–86.
- Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2018; 174: 1031–2.
- Twumasi-Boateng K, Pettigrew JL, Kwok YYE, Bell JC, Nelson BH. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18: 419–32.
- Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996; 93: 2370–5.
- Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; 379: 150–61.
- Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, et al. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer.* 2004; 4: 73.
- Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer research.* 2015; 35: 2287–97.
- Merrill MK, Gromeier M. The double-stranded RNA binding protein 76:Nf45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *Journal of Virology.* 2006; 80: 6936–42.
- López-Ulloa B, Fuentes Y, Pizarro-Ortega MS, López-Lastra M. RNA-Binding Proteins as Regulators of Internal Initiation of Viral mRNA Translation. *Viruses.* 2022; 14.
- Merrill MK, Dobrikova EY, Gromeier M. Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J Virol.* 2006; 80: 3147–56.
- Kauder SE, Racaniello VR. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1743–53.
- Beasley GM, Nair SK, Farrow NE, Landa K, Selim MA, Wiggs CA, et al. Phase I trial of intratumoral PVSRIPO in patients with unresectable, treatment-refractory melanoma. *J Immunother Cancer.* 2021; 9.
- Aslanidis C, de Jong PJ, Schmitz G. Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods Appl.* 1994; 4: 172–7.
- Yun T, Park A, Hill TE, Pernet O, Beaty SM, Juelich TL, et al. Efficient reverse genetics reveals genetic determinants of budding and fusogenic differences between Nipah and Hendra viruses and enables real-time monitoring of viral spread in small animal models of henipavirus infection. *J Virol.* 2015; 89: 1242–53.
- Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols.* 2021; 16: 3114–40.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology.* 1938; 27: 493–7.
- Lipatova AV, Soboleva AV, Gorshkov VA, Bubis JA, Solovyeva EM, Krasnov GS, et al. Multi-Omics Analysis of Glioblastoma Cells' Sensitivity to Oncolytic Viruses. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1–19.
- Sabin A. Oral poliovirus vaccine: History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. *JAMA.* 1965; 194 130–4.
- Boulger L, Magrath D. Differing neurovirulence of three Sabin attenuated type 3 vaccine seed pools and their progeny. *Journal of Biological Standardization.* 1973; 1: 139–47.
- Bianchi FP, Larocca AMV, Bozzi A, Spinelli G, Germinario CA, Tafuri S, et al. Long-term persistence of poliovirus neutralizing antibodies in the era of polio elimination: An Italian retrospective cohort study. *Vaccine.* 2021; 39: 2989–94.
- Golikov MV, Karpenko IL, Lipatova AV, Ivanova ON, Fedyakina IT, Larichev VF, et al. Cultivation of Cells in a Physiological Plasmax Medium Increases Mitochondrial Respiratory Capacity and Reduces Replication Levels of RNA Viruses. *Antioxidants.* 2021; 11: 97.

References

- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021; 23: 1231–51.
- Carpenter AB. Recombinant oncolytic poliovirus for glioblastoma: A current review of PVS (RIPO). *Georgetown Medical Review.* 2019; 3: 7789.
- Brown MC, Dobrikova EY, Dobrikov MI, Walton RW, Gemberling SL, Nair SK, et al. Oncolytic polio virotherapy of cancer. *Cancer.* 2014; 120: 3277–86.
- Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2018; 174: 1031–2.
- Twumasi-Boateng K, Pettigrew JL, Kwok YYE, Bell JC, Nelson BH. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18: 419–32.
- Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996; 93: 2370–5.
- Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; 379: 150–61.
- Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, et al. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer.* 2004; 4: 73.
- Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer research.* 2015; 35: 2287–97.
- Merrill MK, Gromeier M. The double-stranded RNA binding protein

- 76:NF45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *Journal of Virology*. 2006; 80: 6936–42.
11. López-Ulloa B, Fuentes Y, Pizarro-Ortega MS, López-Lastra M. RNA-Binding Proteins as Regulators of Internal Initiation of Viral mRNA Translation. *Viruses*. 2022; 14.
 12. Merrill MK, Dobrikova EY, Gromeier M. Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J Virol*. 2006; 80: 3147–56.
 13. Kauder SE, Racaniello VR. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1743–53.
 14. Beasley GM, Nair SK, Farrow NE, Landa K, Selim MA, Wiggs CA, et al. Phase I trial of intratumoral PVSRIPO in patients with unresectable, treatment-refractory melanoma. *J Immunother Cancer*. 2021; 9.
 15. Aslanidis C, de Jong PJ, Schmitz G. Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods Appl*. 1994; 4: 172–7.
 16. Yun T, Park A, Hill TE, Pernet O, Beaty SM, Juelich TL, et al. Efficient reverse genetics reveals genetic determinants of budding and fusogenic differences between Nipah and Hendra viruses and enables real-time monitoring of viral spread in small animal models of henipavirus infection. *J Virol*. 2015; 89: 1242–53.
 17. Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*. 2021; 16: 3114–40.
 18. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*. 1938; 27: 493–7.
 19. Lipatova AV, Soboleva AV, Gorshkov VA, Bubis JA, Solovyeva EM, Krasnov GS, et al. Multi-Omics Analysis of Glioblastoma Cells' Sensitivity to Oncolytic Viruses. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 1–19.
 20. Sabin A. Oral poliovirus vaccine: History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. *JAMA*. 1965; 194: 130–4.
 21. Boulger L, Magrath D. Differing neurovirulence of three Sabin attenuated type 3 vaccine seed pools and their progeny. *Journal of Biological Standardization*. 1973; 1: 139–47.
 22. Bianchi FP, Larocca AMV, Bozzi A, Spinelli G, Germinario CA, Tafuri S, et al. Long-term persistence of poliovirus neutralizing antibodies in the era of polio elimination: An Italian retrospective cohort study. *Vaccine*. 2021; 39: 2989–94.
 23. Golikov MV, Karpenko IL, Lipatova AV, Ivanova ON, Fedyakina IT, Larichev VF, et al. Cultivation of Cells in a Physiological Plasmax Medium Increases Mitochondrial Respiratory Capacity and Reduces Replication Levels of RNA Viruses. *Antioxidants*. 2021; 11: 97.

МОДЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ С ИНДУЦИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ГЕНА *POLG*

М. В. Кубекина¹✉, А. А. Калинина², Д. С. Коршунова¹, А. В. Брутер¹, Ю. Ю. Силаева¹

¹ Институт биологии гена, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

Митохондриальные дисфункции ответственны за развитие большого числа патологий различных органов и их систем у животных и человека. Наиболее часто они развиваются вследствие накопления мутаций в митохондриальном геноме. За репликацию и репарацию митохондриального генома отвечает продукт гена *Polg* фермент PolG- α . Целью данной работы было оценить влияние экспрессии мутантного гена *Polg* на развитие митохондриальных нарушений в *in vivo*- и *in vitro*-моделях. Исследование проводили на трансгенных животных и первичных культурах MEF с применением ПЦР-РВ, флуоресцентного окрашивания на проточном цитофлуориметре, тестов на функциональное состояние мышечной системы. Показано, что в эмбриональных фибробластах трансгенных животных с индуцируемой экспрессией мутантной формы гена *Polg*, созданных нами ранее, наблюдаются снижение митохондриального потенциала и увеличение уровня экспрессии маркеров митофагии по сравнению с контрольными эмбриональными фибробластами. Кроме того, в клетках организма этих животных развивается митохондриальная дисфункция, приводящая к снижению показателей выносливости животных и силы хвата, снижению экспрессии субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора в тотальной популяции спленоцитов по сравнению с животными дикого типа. Экспрессия мутантной формы гена *Polg* приводит к снижению клеточности тимуса трансгенных животных, однако не меняет его субпопуляционный состав. Таким образом, трансгенные животные с индуцируемой экспрессией мутантной формы *Polg* могут служить релевантной моделью для изучения процесса развития митохондриальной дисфункции и разработки терапевтических подходов *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, фермент PolG- α , трансгенные животные, митохондриальный мембранный потенциал, митофагия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-34-90073.

Вклад авторов: М. В. Кубекина — анализ литературы, проведение всех экспериментов, анализ и интерпретация результатов, подбор олигонуклеотидов, написание рукописи; А. А. Калинина, Д. С. Коршунова — проведение экспериментов; А. В. Брутер — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов; Ю. Ю. Силаева — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, научное редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол № от 5 декабря 2021 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Марина Владиславовна Кубекина
Бескудниковский бульвар, д. 32, корпус 1, г. Москва, 127474, Россия; marykumy@gmail.com

Статья получена: 14.04.2022 **Статья принята к печати:** 28.04.2022 **Опубликована онлайн:** 27.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.021

MODELS OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION WITH INDUCIBLE EXPRESSION OF *POLG* PATHOGENIC MUTANT VARIANT

Kubekina MV¹✉, Kalinina AA², Korshunova DS¹, Bruter AV¹, Silaeva YY¹

¹ Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

² Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Mitochondrial dysfunctions, which underlie many systemic diseases in animals and humans, may arise from accumulation of mutations in the mitochondrial genome. PolG-alpha enzyme encoded by *Polg* gene is crucial for replication and repair of the mitochondrial genome. The aim of this study was to assess the possible role of *Polg* mutations in mitochondrial dysfunctions using *in vitro* and *in vivo* animal models. The experiments involved transgenic mice with inducible expression of *Polg* mutant variant; the methods included cell culture, real time PCR assay, fluorescence flow cytometry, and skeletal muscle functional tests. The results indicate that mouse embryonic fibroblasts (MEFs) expressing *Polg* pathogenic mutant variant have decreased mitochondrial membrane potential and increased expression of mitophagy markers compared with control cultures. Transgenic animals with systemic expression of the pathogenic variant develop mitochondrial dysfunction which significantly affects muscular performance. In addition, systemic expression of mutated *Polg* in transgenic animals significantly inhibits expression of TCR subunit α and CD3 coreceptor complex subunits δ and ϵ in total splenocyte populations and significantly affects cellularity of the thymus without altering its CD4/CD8 subpopulation ratio. Thus, inducible expression of mutated *Polg* in transgenic animals provides a relevant model for studying mitochondrial dysfunction and its treatment *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: mitochondrial dysfunction, PolG-alpha enzyme, transgenic animals, genome editing, mitochondrial membrane potential, mitophagy

Funding: the study was supported by Russian Foundation for Basic Research, RFBR Project № 19-34-90073.

Author contribution: Kubekina MV — literature analysis, experimental research, data analysis and interpretation, oligo design, manuscript writing; Kalinina AA, Korshunova DS — experimental research; Bruter AV — literature analysis, research planning, data analysis and interpretation; Silaeva YY — literature analysis, research planning, data analysis and interpretation, scientific editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review board at the Institute of Gene Biology (Protocol of 05 December 2021) and carried out in strict compliance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina V. Kubekina
Beskudnikovsky bulvar, 32, korpus 1, Moscow, 127474, Russia; marykumy@gmail.com

Received: 14.04.2022 **Accepted:** 28.04.2022 **Published online:** 27.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.021

Митохондриальные дисфункции представляют собой группу разнообразных заболеваний, в том числе и наследственных, которые могут проявляться в любом возрасте и иметь широкий спектр клинических симптомов, что затрудняет их диагностику [1]. Часто развитие митохондриальных дисфункций обусловлено нарушениями в геноме митохондрий [2]. В ряде случаев мутации митохондриального генома вызваны экспрессией мутантной формы ядерного гена *Polg*, отвечающего за репликацию и репарацию мтДНК [3]. Известно, что мутация D257A гена *Polg* ведет к накоплению случайных мутаций в геноме митохондрий [4]. Митохондриальный геном в целом менее стабилен, чем ядерный, ввиду отсутствия гистонов, своеобразности репарационных механизмов и наличия свободных радикалов кислорода, которые являются побочными продуктами аэробного дыхания [5], поэтому в организме существуют механизмы поддержания гомеостаза митохондрий. Одним из них является митофагия [6] — процесс, направленный на элиминацию дисфункциональных митохондрий и являющийся частным случаем аутофагии [7].

Для исследования процессов развития митохондриальной дисфункции и патологических состояний, обусловленных ею, необходимо создание адекватных моделей. Один из наиболее простых способов моделирования развития митохондриальной дисфункции *in vivo* — создание трансгенных животных с экспрессией мутантной формы гена *Polg*, приводящей к нарушению процессов репарации митохондриального генома и накоплению мутаций. Для изучения развития процессов митохондриальной дисфункции в различных органах и тканях была создана универсальная модель — генетически модифицированные мыши с индуцируемой тканеспецифичной и системной экспрессией мутантного D257A варианта гена *Polg* [8]. Модель чрезвычайно удобна тем, что экспрессия мутантного варианта гена включается только после скрещивания трансгена с активаторной линией животных, что предотвращает спонтанное развитие дефектного фенотипа и передачу митондрий с мутантным геномом в ряду поколений.

Целью данного исследования было оценить возможность использования культуры трансгенных эмбриональных фибробластов мыши (mouse embryonic fibroblasts, MEF) *Polg**Cre-CMV (*Polg**B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J, далее *Polg**Cre-CMV) [https://www.jax.org/strain/006054] в качестве *in vitro* модели развития митохондриальной дисфункции, вызванной накоплением мутаций в митохондриальном геноме вследствие экспрессии мутантной формы гена *Polg*, а также оценить влияние системной экспрессии трансгена на мышечную систему животных и на процессы формирования пула периферических Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные культуры MEF были получены на стадии E13.5 путем скрещивания самок линии *Polg* и самца линии Cre-CMV по протоколу, описанному ранее [9]. Все используемые в эксперименте культуры были прогенотипированы методом ПЦР с помощью праймеров P1 и P2 (STOP-кассета 292 п.н.), P3 и P4 (терминатор 417 п.н.), P5 и P6 (Internal control 324 п.н.), P7 и P8 (CMV 100 п.н.). Последовательности всех праймеров представлены в таблице.

Эмбриональные фибробласты культивировали 5 недель и провели 10 пассажей. Культуральная среда для MEF: DMEM

с глутамином 450 мл (Панэко; Россия), эмбриональная телячья сыворотка 50 мл (BioSera; Франция), пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный (Панэко; Россия), аминокислоты, заменимые для MEM, 100-х раствор (Панэко; Россия) 5 мл. Для определения изменений функциональности митохондрий и уровня митофагии в исследуемых культурах MEF в зависимости от времени культивирования последовательно проводили серию измерений митохондриального мембранного потенциала (ММП) методом проточной цитометрии с использованием MitoTracker Orange (Thermo Fisher Scientific; США) и экспрессии маркеров митофагии методом ПЦР-РВ с интервалом в 7 дней. Для измерения ММП отбирали по 100 тыс. клеток каждой культуры, отмывали от среды в PBS (Панэко; Россия), инкубировали с 100 нм MitoTracker Orange (возбуждение/эмиссия — 550/580) при 37 °C в течение 30 мин. Далее клетки отмывали от красителя с помощью центрифугирования при 300 g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в свежем PBS, после чего производили измерение на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter; США). Полученные результаты наносили на гистограммы, а число событий нормировали.

Уровень экспрессии мутантного варианта гена *Polg* в культурах MEF был определен методом ПЦР в реальном времени с использованием qPCRMix-HS (Евроген; Россия) и с помощью праймеров P9 и P10, а также флуоресцентных

Таблица. Последовательности праймеров, используемых в работе

Код	Последовательность 5→3'
P1	GTTAGATCTGCTGCCACCGT
P2	AGGTGGCAAGTGATATCCG
P3	GCGAGTCCATGCTCACTCAGG
P4	GTGTTGCCCTTTGGAGCTTG
P5	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
P6	GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC
P7	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
P8	GTGAAACAGCATTGCTGCTCACTT
P9	CGGCTGACCTAATCCCTTTGG
P10	ATCGAGAAAACGCATCCGGG
P11	FAM-TGTTTCCTTTGACCCGAGCCCATATC-BHQ1
P12	ROX-TGTTTCCTTTGCTCGAGCCCATATC-BHQ2
P13	GCAGTACAGCCCCAAAATGG
P14	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT
P15	CGACCCGGCTTTCAAGCA
P16	CACCTTGTAGCGCTCGAT
P17	GTGCTTTCTGTCTAGAGCGT
P18	GGGCACAAGGAAGTTGTCTTCA
P19	GTGGGACTCAGATGGCTGTC
P20	CGCTCTACACTGGAGCTGTT
P21	AGTGGTTGCTAAGCGACAGG
P22	TGACTTCTCCTCCGTGGTCT
P23	GTGGCGATTTACATGCAGC
P24	TGAGGTCTGACTGACCCTGG
P25	CAGGACATGAGACCGGAAGG
P26	TTCCCTCCAAGACGGCTGTA
P27	CCTCTAGCTGTTGGCACTT
P28	ACTGTCTAGAGGGCACGTC
P29	AGACAAGCTTCACTGCCAA
P30	AGGAGGATTCGGAGTCCATA

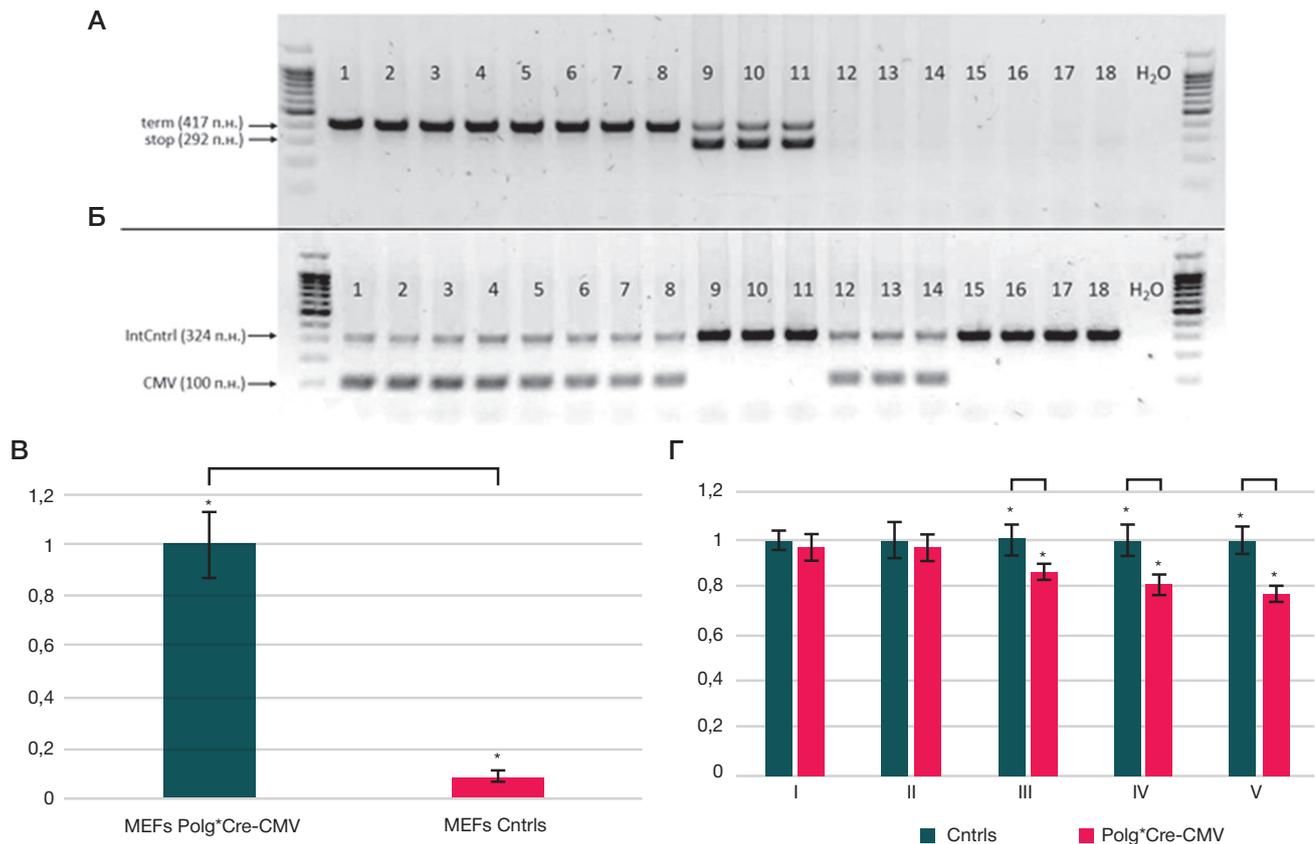


Рис. 1. Результаты генотипирования выбранных для экспериментов культур MEF, а также экспрессии мутантного гена *Polg* и определения ММП. **А.** Генотипирование на STOP-кассету (292 п.н.) и терминатор (417 п.н.). **Б.** Генотипирование на CMV (100 п.н.) и внутренний контроль (324 п.н.). **В.** Экспрессия мутантного гена *Polg* в культурах MEF Polg*Cre-CMV, Polg, CMV-Cre и WT. Измерения всех контрольных культур Polg, CMV-Cre и WT усреднены между собой. Экспрессия мутантного гена *Polg* в культурах Polg*Cre-CMV принята за единицу, относительно нее посчитана экспрессия в контрольных культурах. **Г.** Определение ММП в MEF в течение 5 недель. Измерения всех контрольных культур Polg, CMV-Cre и WT усреднены между собой и приняты за единицу, относительно нее посчитаны значения ММП экспериментальных культур Polg*Cre-CMV. * — различия достоверны

зондов P11 и P12, комплементарных нативному и мутантному вариантам гена соответственно.

В ходе культивирования MEF часть клеток (около 200 тыс.) каждой культуры еженедельно отбирали для выделения РНК реагентом ExtractRNA (Евроген; Россия), проведения реакции обратной транскрипции набором для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген; Россия) и последующего определения экспрессии маркеров митохондрии с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген; Россия). В качестве маркеров митохондрии были выбраны *Map1lc3a*, *Lamp2*, *Pink1*, *Parkin* и *Nix* [10]. Измерение проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров на референсный ген *Hprt* (P13 и P14) и на гены каждого маркера митохондрии: *Map1lc3a* (P15 и P16), *Lamp2* (P17 и P18), *Pink1* (P19 и P20), *Parkin* (P21 и P22) и *Nix* (P23 и P24) (см. табл.). Все манипуляции с клеточными лизатами, РНК и кДНК проводили в соответствии с протоколами фирмы-производителя (Евроген; Россия). Экспрессию генов в каждой отдельной экспериментальной точке сравнивали с экспрессией референсного гена *Hprt*. Величину экспрессии считали по формуле $2^{-\Delta Ct}$, где *Ct* (cycle threshold) — это цикл амплификации, на котором флуоресценция достигает порогового значения; $\Delta Ct = Ct(\text{референсного гена } Hprt) - Ct(\text{исследуемого гена})$. Величину экспрессии каждого гена интереса в контрольных клетках в каждой экспериментальной точке принимали за единицу, далее рассчитывали относительную экспрессию каждого гена интереса во всех образцах культур Polg*Cre-CMV [11].

Далее оценивали влияние экспрессии мутантной формы гена *Polg* на функциональное состояние мышечной

системы животных с системной экспрессией трансгена. В работе использованы гибридные мыши (CBA X C57BL/6) линии Polg*Cre-CMV, полученные нами ранее [8], а также гибридные мыши (CBA X C57BL/6) дикого типа (питомник «Столбовая»), по 5 мышей на группу, возраст — 3 месяца. Вес мышей линии Polg*Cre-CMV в среднем составлял $19,9 \pm 2,2$ г, мышей дикого типа — $22,7 \pm 2,5$ г. В эксперименте участвовали только самки. В процессе экспериментальной работы мышей содержали в виварии ЦКП ИБГ РАН в условиях постоянного доступа к воде и корму. Световой цикл — 12/12, температура воздуха — 23 ± 1 °C, влажность — $42 \pm 5\%$. С животными обеих групп проводили тест «Натянутая проволока» и тесты на силу хвата. Тест «Натянутая проволока» проводили согласно протоколу [12] с модификациями (общее время на 10 попыток было ограничено и составило 300 с). Тест на силу хвата — согласно протоколу [13] с модификациями (вместо перекладки использовали решетку). Все животные были выведены из данных экспериментов методом цервикальной дислокации, их селезенка и тимус были исследованы в следующих экспериментах.

Далее была проведена косвенная оценка функционального состояния периферических Т-лимфоцитов путем измерения уровня экспрессии генов субъединиц ϵ и δ комплекса CD3, локализованного на поверхности лимфоцитов и участвующего в проведении сигнала от Т-клеточного рецептора, и α -цепи Т-клеточного рецептора в тотальной популяции спленоцитов мышей Polg*Cre-CMV по сравнению с животными дикого типа. Была также оценена субпопуляция двойных негативных, двойных

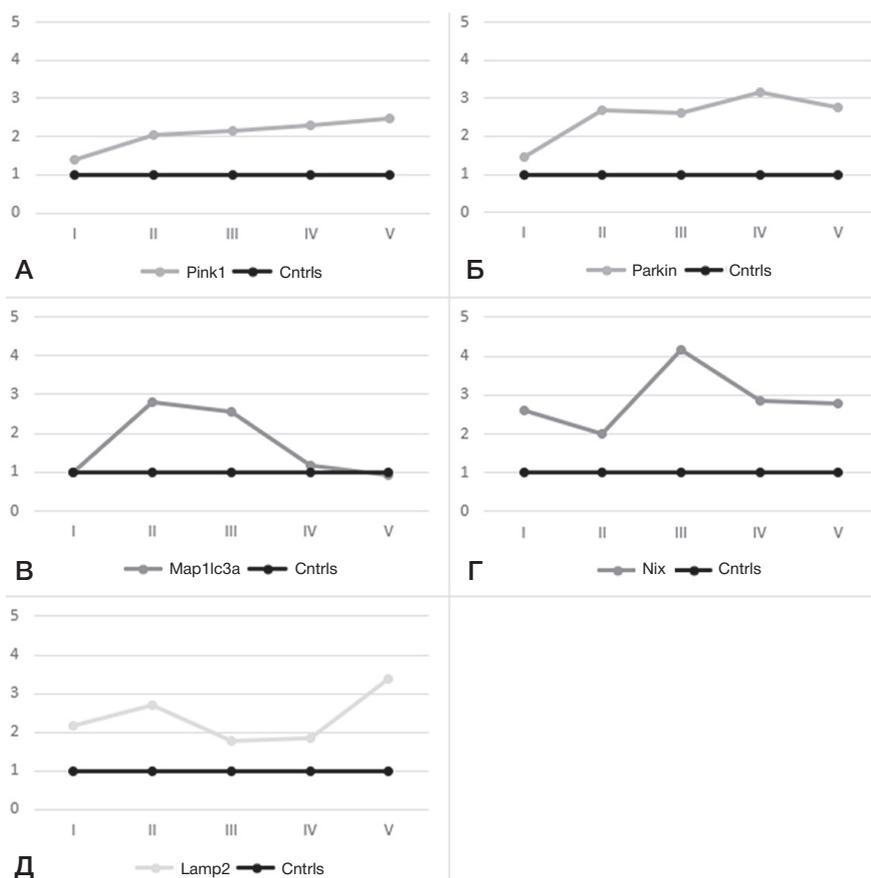


Рис. 2. Экспрессия генов *Pink1* (А), *Parkin* (Б), *Map1lc3a* (В), *Nix* (Г) и *Lamp2* (Д) в течение 5 недель культивирования MEF

позитивных и однопозитивных CD4⁺- и CD8⁺-клеток тимуса и его абсолютная клеточность. Экспериментальных и контрольных мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, ножницами разрезали брюшную стенку. Аккуратно вырезали селезенку и тимус, тщательно гомогенизировали ткани. Клетки селезенки лизировали, затем выделяли РНК, проводили реакцию обратной транскрипции с использованием реактивов и протоколов, описанных выше. Измерение уровня экспрессии генов *Cd3δ*, *Cd3ε* и *Tcr-α* проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров на референсный ген *Hprt* (P13 и P14) и на каждый маркер митофагии: *Cd3δ* (P25 и P26), *Cd3ε* (P27 и P28) и *Tcr-α* (P29 и P30). Относительную экспрессию рассчитывали по методике, приведенной выше. Одиночные клетки тимуса анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии в соответствии с протоколом [14]. Подсчет клеток тимуса осуществляли в камере Горяева.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программных пакетов Excel (Microsoft; США) и Statistica (Statsoft; Россия). Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического однофакторного двухвыборочного анализа. Для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все полученные культуры эмбриональных фибробластов были прогенотипированы (рис. 1А, Б). В двойных

трансгенах *Polg*Cre-CMV* благодаря системной активации Cre-рекомбиназы происходит вырезание кассеты STOP. Благодаря этому двойные трансгены *Polg*Cre-CMV*, помимо контрольного фрагмента, имеют в геноме только терминатор и фрагмент CMV. По результатам генотипирования были сформированы экспериментальная группа культур с генотипом *Polg*Cre-CMV* (восемь вариантов) и контрольная группа, представленная культурами с генотипами *Polg* (три варианта), *Cre-CMV* (три варианта) и дикого типа (четыре варианта) (далее — MEF Cntrls).

Во всех вариантах культур был определен уровень экспрессии мутантного варианта гена *Polg* (рис. 1В). Показано, что мутантный вариант гена *Polg* экспрессируется только в клеточных линиях *Polg*Cre-CMV*. Различия в экспрессии мутантного варианта гена *Polg* между культурами *Polg*Cre-CMV* и контрольными культурами достоверны ($p \leq 0,05$).

Результаты определения ММП в культурах MEF представлены на рис. 1Г. Согласно графику, ММП *Polg*Cre-CMV* достоверно снижается, начиная с 3-й недели культивирования, по сравнению с контрольными клетками ($p \leq 0,05$).

Исследование профилей экспрессии различных маркеров митофагии в контрольных и экспериментальных культурах MEF продемонстрировало значительные различия между ними (рис. 2А–Д).

1. Экспрессия генов *Pink1/Parkin*, хорошо известных маркеров митофагии, постепенно повышается с течением времени (рис. 2А, Б), что коррелирует с предположением о росте количества дисфункциональных митохондрий [15].

2. Накопление случайных мутаций в геноме митохондрий, а вместе с тем нарушение окислительного фосфорилирования

сопровождается гипоксией, которая в свою очередь ведет к повышению экспрессии гена *Nix* [16]. Экспрессия гена *Nix* резко повышается на третьей неделе культивирования, что может соответствовать накоплению продуктов нарушения энергетических процессов (рис. 2В). В процессе митохондриальной дисфункции продукт гена *Map1lc3a* связывается с белком *Nix*, заякоренным во внешней мембране митохондрий, тем самым связывая ее с аутофагосомой. Кроме этого, он тоже выступает инициатором аутофагии [17]. Этим можно объяснить его резкий подъем на второй неделе культивирования и дальнейшую корреляцию с экспрессией гена *Nix* (рис. 2Г). Не вполне понятно, однако, снижение экспрессии маркеров *Nix* и *Map1lc3a* на четвертой и пятой неделях культивирования трансгенных МЕФ. По всей видимости, это связано с невозможностью элиминации значительного процента митохондрий в клетке (несмотря на их дефектность) из-за потери жизнеспособности в этом случае.

3. Белок *Lamp2* является структурным компонентом лизосомной мембраны [18]. Экспрессия гена *Lamp2* в экспериментальных культурах *Polg*Cre-CMV* превосходит его экспрессию в контрольных культурах в 2 раза уже на первой неделе культивирования и остается повышенной на протяжении всех оставшихся недель, что может говорить о повышенном количестве лизосом, необходимых для эффективной аутофагии (рис. 2Д).

Для проверки гипотезы о влиянии развития митохондриальной дисфункции на мышечную систему трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* были проведены эксперименты по определению мышечной выносливости и силы хвата трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* в возрасте 3 месяцев по сравнению с животными дикого типа. Результаты теста «Натянутая проволока» представлены на рис. 3А. Мыши дикого типа удерживались на проволоке в течение всего времени эксперимента и потеряли максимум 4 балла. При этом у мышей линии *Polg*Cre-CMV* происходило снижение времени удерживания на проволоке, мыши выбывали из эксперимента в среднем за 199 с. В эксперименте на силу хвата показано, что мыши линии *Polg*Cre-CMV* демонстрируют худший результат по сравнению с мышами дикого типа (рис. 3Б) и эти различия достоверны ($p \leq 0,05$).

Для определения влияния экспрессии трансгена на жизнедеятельность периферических Т-лимфоцитов был установлен уровень экспрессии субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора в тотальной популяции спленоцитов трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* по сравнению с животными дикого типа. Оказалось, что экспрессия субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора снижены у трансгенов *Polg*Cre-CMV* по сравнению с животными дикого типа ($p \leq 0,05$) (рис. 4). Цитофлуориметрический анализ живых одиночных клеток тимуса не выявил изменений в относительном количестве субпопуляций двойных негативных, двойных позитивных и однопозитивных CD4⁺- и CD8⁺-клеток тимуса (рис. 5А, Б), однако его абсолютная клеточность оказалась достоверно сниженной у трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* по сравнению с животными дикого типа ($p \leq 0,05$) (рис. 5В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процесс развития митохондриальной дисфункции вследствие возникновения и накопления мутаций в митохондриальном геноме затрагивает практически

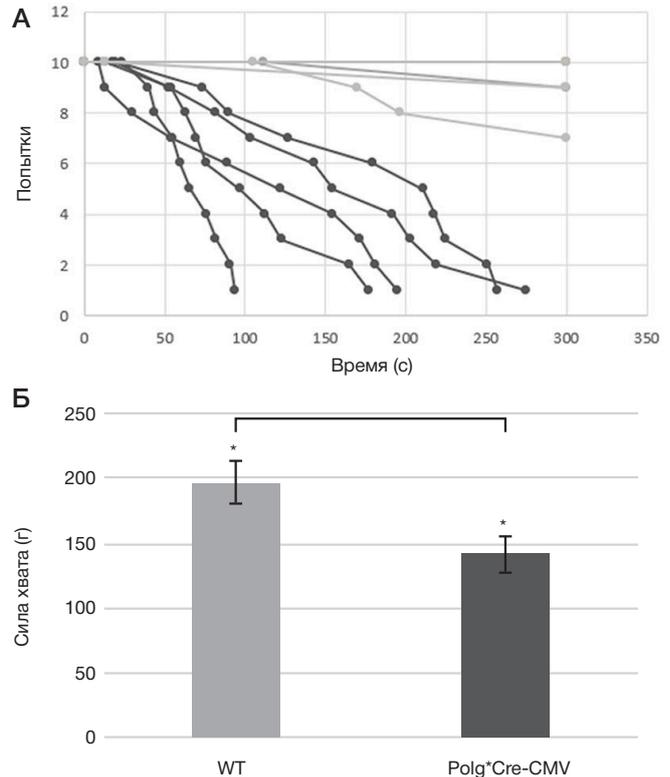


Рис. 3. Результаты тестов на выносливость мышей линии *Polg*Cre-CMV* (обозначены темно-серым цветом) и дикого типа (обозначены светло-серым цветом). **А.** Тест «Натянутая проволока». **Б.** Тест на силу хвата. * — различия достоверны

все ткани и органы. Изменения в тканях, вызванные митохондриальными мутациями, начинают происходить уже во время эмбриогенеза. Мы показали, что в первичной культуре трансгенных эмбриональных фибробластов с генотипом *Polg*Cre-CMV* происходит развитие митохондриальной дисфункции на фоне экспрессии мутантной формы гена *Polg* в течение первых трех недель культивирования *in vitro*. При этом клетки контрольных культур не демонстрируют признаков развития патологии. Таким образом, можно заключить, что культуры МЕФ *Polg*Cre-CMV* представляют собой удобную *in vitro* модель для изучения митохондриальной дисфункции, вызванной накоплением мутаций в митохондриальном геноме вследствие экспрессии мутантной формы гена *Polg*.

Для нормального функционирования тканей и систем органов необходима эффективная работа митохондрий. Это актуально для иммунной системы и в особенности для мышечной [19, 20]. В нашей работе показано, что экспрессия мутантной формы гена *Polg* оказывает крайне негативное влияние на функциональное состояние мышечной системы животных с системной экспрессией трансгена, животные *Polg*Cre-CMV* демонстрируют значительное снижение мышечной выносливости и силы хвата по сравнению с контролем. Кроме того, экспрессия трансгена оказывает негативное влияние и на иммунную систему животных *Polg*Cre-CMV*: снижение уровня экспрессии субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора косвенно свидетельствует о сниженной функциональности Т-лимфоцитов трансгенных животных. Результаты, полученные при исследовании тимуса трансгенных животных, позволяют сделать вывод об ускоренной инволюции этого органа без нарушения его основных функций. Эти результаты соотносятся с представлениями о влиянии накопления мутаций

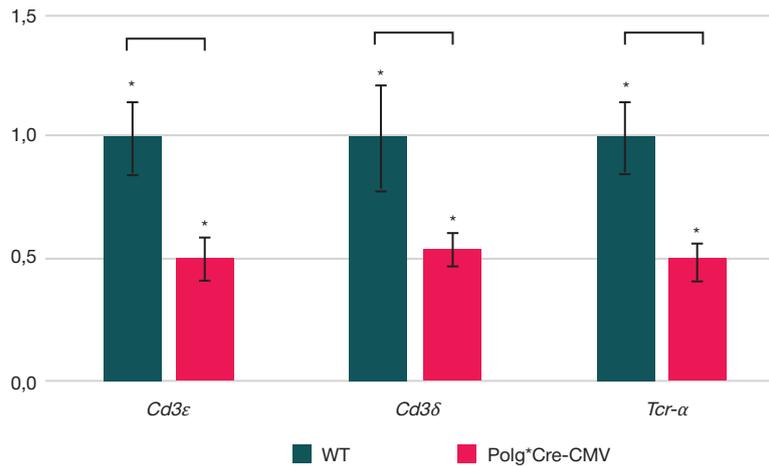


Рис. 4. Снижение экспрессии генов *Cd3ε*, *Cd3δ* и *Tcr-α* в смешанной культуре спленцитов мышей *Polg*Cre-CMV* по сравнению с мышами дикого типа. * — различия достоверны

в митохондриальном геноме на развитие ускоренного прогероидного фенотипа [4]. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что трансгенные мыши линии *Polg*Cre-CMV* с экспрессией трансгена тоже являются релевантной моделью для изучения развития митохондриальной дисфункции и ее последствий *in vivo*.

Выводы

Экспрессия мутантного варианта гена *Polg* приводит к увеличению уровня экспрессии маркеров митофагии и снижению уровня митохондриального мембранного потенциала в культуре эмбриональных фибробластов мышей *Polg*Cre-CMV* по сравнению с культурой эмбриональных фибробластов контрольных мышей.

Мышечная выносливость при проведении тестов «Натянутая проволока» и «Сила хвата» значительно снижена у мышей *Polg*Cre-CMV* по сравнению с контрольными животными. Экспрессия мутантного варианта гена *Polg* приводит к сниженной функциональности Т-лимфоцитов трансгенных животных линии *Polg*Cre-CMV*, а также к уменьшению клеточности тимуса, однако не влияет на его субпопуляционный состав. Можно заключить, что цель данного исследования достигнута в полном объеме, однако дальнейшая работа по изучению влияния экспрессии мутантного варианта гена *Polg* на другие органы и их системы еще не закончена. Полученные модели *in vitro* и *in vivo* приблизят нас к лучшему пониманию патогенеза митохондриальных дисфункций и позволят разработать подходы к терапии данных патологий, что является предметом дальнейших исследований.

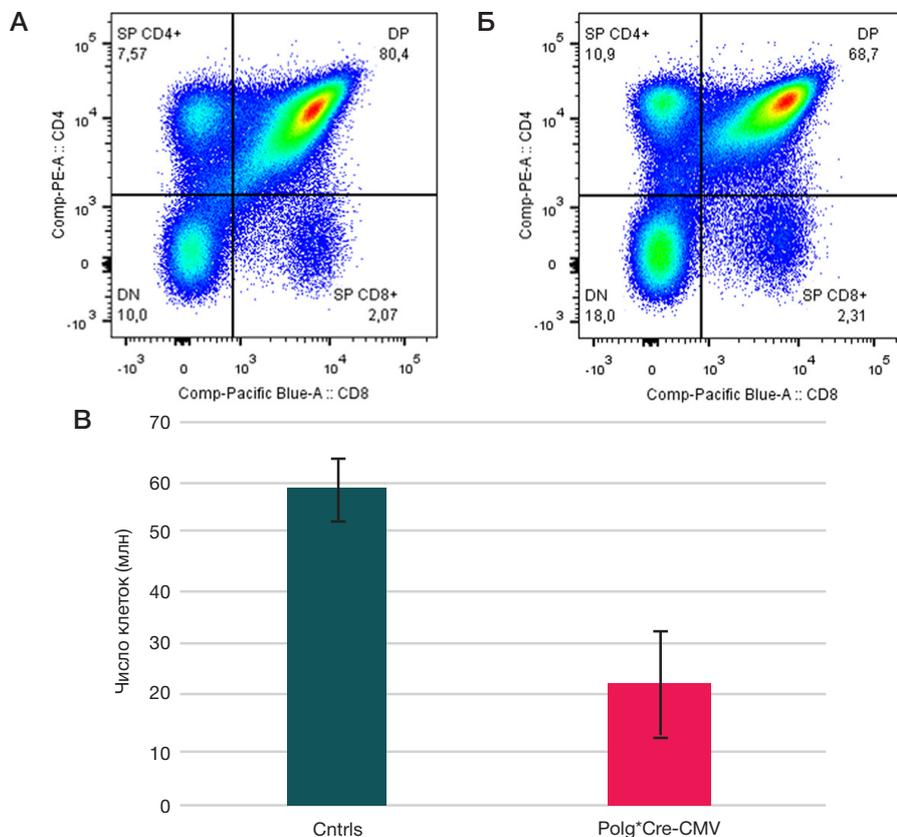


Рис. 5. Профиль экспрессии маркеров CD4 и CD8 живыми одиночными клетками тимуса трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* (Б) по сравнению с животными дикого типа (А), а также подсчет клеток тимуса (Б). * — различия достоверны

Литература

- Davis RL, Liang C, Sue CM. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*. 2018; 147: 125–41. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00010-5.
- Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017 Jan; 241 (2): 236–50. DOI: 10.1002/path.4809.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27; 429 (6990): 417–23. DOI: 10.1038/nature02517.
- Kukat A, Trifunovic A. Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*. 2009; 44 (1–2): 101–5. DOI: 10.1016/j.exger.2008.05.006.
- McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep*. 2018 Jun; 6 (2): 52–61. DOI: 10.1007/s40142-018-0137-x.
- Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Curr Med Chem*. 2018; 25 (40): 5597–612. DOI: 10.2174/0929867324666170616101741.
- Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016 Aug; 27 (7–8): 381–95. DOI: 10.1007/s00335-016-9651-x.
- Kubekina MV, Silaeva Y Yu, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, et al. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (3): 33–39. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.72784.
- Tan YS, Lei YL. Generation and Culture of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2019; 1960: 85–91. DOI: 10.1007/978-1-4939-9167-9_7.
- Giorgi C, Bouhamida E, Danese A, Previati M, Pinton P, Patergnani S. Relevance of Autophagy and Mitophagy Dynamics and Markers in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2021 Feb 4; 9 (2): 149. DOI: 10.3390/biomedicines9020149.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^{-(delta CT)} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 Aug; 3 (3): 71–85.
- The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/dmd-DMD_M.2.1.004.pdf.
- Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/MDX-DMD_M.2.2.001-42.pdf.
- Калинина А. А., Хромых Л. М., Казанский Д. Б., Дейкин А. В., Силаева Ю. Ю. Адоптивный перенос сингенных спленоцитов подавляет иммунный ответ сублетально облученных мышей. *Acta Naturae*. 2021; 13 (1): 116–26.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (1): 378–83. DOI: 10.1073/pnas.0911187107.
- Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*. 2007; 27 (17): 6229–42. DOI: 10.1128/MCB.02246-06.
- Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol*. 2020; 219 (11): e202004029. DOI: 10.1083/jcb.202004029.
- Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell*. 2002; 13 (9): 3355–68. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0114.
- López-Lluch G. Essential role of mitochondrial dynamics in muscle physiology. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017; 219 (1): 20–21. DOI: 10.1111/apha.12750.
- Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*. 2015; 42 (3): 406–17. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.

References

- Davis RL, Liang C, Sue CM. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*. 2018; 147: 125–41. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00010-5.
- Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017 Jan; 241 (2): 236–50. DOI: 10.1002/path.4809.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27; 429 (6990): 417–23. DOI: 10.1038/nature02517.
- Kukat A, Trifunovic A. Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*. 2009; 44 (1–2): 101–5. DOI: 10.1016/j.exger.2008.05.006.
- McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep*. 2018 Jun; 6 (2): 52–61. DOI: 10.1007/s40142-018-0137-x.
- Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Curr Med Chem*. 2018; 25 (40): 5597–612. DOI: 10.2174/0929867324666170616101741.
- Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016 Aug; 27 (7–8): 381–95. DOI: 10.1007/s00335-016-9651-x.
- Kubekina MV, Silaeva Y Yu, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, et al. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (3): 33–39. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.72784.
- Tan YS, Lei YL. Generation and Culture of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2019; 1960: 85–91. DOI: 10.1007/978-1-4939-9167-9_7.
- Giorgi C, Bouhamida E, Danese A, Previati M, Pinton P, Patergnani S. Relevance of Autophagy and Mitophagy Dynamics and Markers in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2021 Feb 4; 9 (2): 149. DOI: 10.3390/biomedicines9020149.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^{-(delta CT)} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 Aug; 3 (3): 71–85.
- The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/dmd-DMD_M.2.1.004.pdf.
- Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/MDX-DMD_M.2.2.001-42.pdf.
- Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB, Dejkin AV, Silaeva Yu Yu. Adoptivnyj perenos singennyx splenocitov podavlyayet immunnij otvet subletal'no obluchennyx myshej. *Acta Naturae*. 2021; 13 (1): 116–26. Russian.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (1): 378–83. DOI: 10.1073/pnas.0911187107.
- Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*. 2007; 27 (17): 6229–42. DOI: 10.1128/MCB.02246-06.
- Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in

- health and disease. *J Cell Biol.* 2020; 219 (11): e202004029. DOI: 10.1083/jcb.202004029.
18. Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 2002; 13 (9): 3355–68. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0114.
 19. López-Lluch G. Essential role of mitochondrial dynamics in muscle physiology. *Acta Physiol (Oxf).* 2017; 219 (1): 20–21. DOI: 10.1111/apha.12750.
 20. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2015; 42 (3): 406–17. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.

СЛЕДЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИННОЯЗЫЧНОГО, СЛАВЯНСКОГО И ТЮРКОЯЗЫЧНОГО НАСЕЛЕНИЯ В СОВРЕМЕННОМ ГЕНОФОНДЕ И ИХ ОТРАЖЕНИЕ В ФАРМАКОГЕНЕТИКЕ

Е. В. Балановская^{1,2,3} ✉, И. О. Горин¹, Г. Ю. Пономарев², В. Ю. Пылёв^{1,3}, В. С. Петрушенко¹, Н. В. Маркина², А. Д. Мамаева², А. К. Ларин⁴, А. Т. Агджоян²

¹ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия

² Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

³ Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

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

Актуальность проблемы генетического вклада дославянского населения в генофонд русских популяций и генетического следа вторжения Золотой орды со временем лишь возрастает. Включение в арсенал полногеномных данных о широком круге популяций позволяет искать наиболее корректные решения этой проблемы. Целью работы был поиск следов взаимодействия генофондов финноязычных, славянских и тюркоязычных народов Центральной России и Поволжья и их отражения в фармакогенетическом ландшафте по данным о 248 геномах представителей 47 популяций 9 этносов с помощью моделирования и картографирования предковых компонент ADMIXTURE. Выявлены специфические компоненты для каждого из финноязычных народов, но лишь предковые компоненты мордвы распространены во всех популяциях региона независимо от их языковой принадлежности. Генофонды русских популяций включают 80% собственной компоненты, 19% вклада финноязычных народов, 1% центральноазиатского влияния. Генофонд татар является комбинацией всех выявленных предковых компонент, включая 81% вклада финноязычных народов и лишь 12% центральноазиатского вклада, что затрудняет оценку их влияния на русский генофонд. Карта генетических расстояний от русских Рязанской области по панели 42 фармакогенетических маркеров выявила ландшафт, резко отличный от селективно-нейтрального ландшафта предковых компонент. Наиболее близки по фармакогенетическому статусу к рязанским русским популяции Мордовии, Калужской, Смоленской и Костромской областей. Схожие по селективно-нейтральным геномам рязанские и нижегородские популяции резко различаются по фармакогенетическому статусу. Это подтверждает необходимость прицельно исследовать фармакогенетические особенности популяций России.

Ключевые слова: генофонд, геногеография, предковые компоненты, ADMIXTURE, полногеномные панели, фармакогенетика, европейская часть России

Финансирование: исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ №20-29-01017 Древняя ДНК (биоинформационный анализ), РНФ №21-14-00363 (анализ фармакогенетических маркеров), а также Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (картографический анализ) и Медико-генетического научного центра им. академика Н. П. Бочкова (интерпретация результатов).

Благодарности: авторы благодарят всех доноров образцов, которые принимали участие в данном исследовании, АНО «Биобанк Северной Евразии» за предоставление коллекций ДНК.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Владимировна Балановская, ул. Москорежье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; balanovska@mail.ru

Статья получена: 01.04.2022 **Статья принята к печати:** 16.04.2022 **Опубликована онлайн:** 26.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.019

FOOTPRINTS OF INTERACTION AMONG FINNIC-SPEAKING, SLAVIC, AND TURKIC-SPEAKING POPULATIONS IN MODERN GENE POOL AND THEIR REFLECTION IN PHARMACOGENETICS

Balanovska EV^{1,2,3} ✉, Gorin IO¹, Ponomarev GY², Pylev VY^{1,3}, Petrusenko VS¹, Markina NV², Mamaeva AD², Larin AK⁴, Agdzhoyan AT²

¹ Bochkov Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

³ Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Genetic contribution of pre-Slavic populations to gene pools of modern Russia is increasingly relevant, along with genetic footprints of the Golden Horde invasion. The novel genome-wide approaches enable advanced solutions in this field. The study aimed at searching for the footprints of genetic interaction among Finnic-speaking, Slavic and Turkic-speaking populations of Central Russia and Volga Region and their reflection in pharmacogenetic landscape. Modeling ancestral components by ADMIXTURE software and their mapping involved genome-wide genotyping data for 248 individual genomes representing 47 populations of 9 ethnic groups. Of specific ancestral components identified in each of the Finnic-speaking peoples, only Mordovian ancestral components are common for all populations within the studied geographic area, regardless of their linguistic affiliation. Gene pools of Russian populations include 80% of intrinsic component, 19% contribution from Finnic-speaking peoples, and 1% of Central Asian influence. The Tatar gene pool combines all identified ancestral components, including 81% contribution from Finnic-speaking peoples and only 12% of Central Asian influence, which prevents using it as a reference for the assessment of Golden Horde footprints in Russian gene pools. A map of genetic distances from Ryazan Russians based on a panel of 42 pharmacogenetic markers reveals a landscape strikingly independent from the selectively neutral ancestral genomic patterns. For instance, populations of Mordovia, Kaluga, Smolensk, and Kostroma regions are the closest to Ryazan Russians in pharmacogenetic status, whereas populations of Ryazan and Nizhny Novgorod regions have strikingly divergent pharmacogenetic status despite the similarity of the selectively neutral ancestral genomic patterns. These findings confirm the relevance of targeted pharmacogenetic characterization for gene pools of Russia.

Keywords: gene pool, gene geography, ancestral component, ADMIXTURE, genome-wide panel, pharmacogenetics, European part of Russia

Funding: the study was supported by RFBR grant 20-29-01017 Ancient DNA (bioinformatics analysis), RSF grant 21-14-00363 (analysis of pharmacogenetics markers), and State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation to Vavilov Institute of General Genetics (cartographic analysis) and Bochkov Research Centre of Medical Genetics (data interpretation).

Acknowledgements: the authors thank all sample donors who participated in this study and the Biobank of North Eurasia for the access to DNA collections.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena V. Balanovska, Moskvorechie, 1, 115522, Moscow, Russia; balanovska@mail.ru

Received: 01.04.2022 **Accepted:** 16.04.2022 **Published online:** 26.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.019

При анализе генетической истории русского народа чаще всего обсуждают два аспекта: мощь генетического вклада дославянского населения в генофонд русских популяций и генетический след вторжения Золотой орды. В современном генофонде отражено взаимодействие трех генетических пластов: дославянского (финноязычного), славянского и золотоордынского (тюркоязычного) населения. Это взаимодействие может находить отражение в разных проекциях генофонда: филогеографии Y-хромосомы, селективно-нейтральных предковых компонентах аутосомного генома или же селективно-значимом фармакогенетическом ландшафте — пространственной изменчивости ДНК-маркеров, определяющих чувствительность к тем или иным лекарственным препаратам. Степень взаимодействия своеобразна в разных частях исконного ареала русского этноса [1], поэтому резонно выбрать для анализа такой узловой регион, для которого можно предполагать наибольшую интенсивность взаимопроникновения трех генетических пластов [2]. Основным претендентом на эту роль выступает население Волго-Окского междуречья в целом и Рязанской области в частности.

Со второй половины I тысячелетия н. э. на эти земли, населенные финноязычными и отчасти балтскими племенами, начинают проникать славянские племена, причем векторы их миграций различны. Есть свидетельства о движении славянских племен с юго-западных территорий, затем в начале II тысячелетия сюда перемещаются и славяне с северо-запада Восточной Европы [1, 3–6]. Уже в начале XI в. здесь возникает Муромское княжество, включавшее в себя Рязанские земли [4, 7], а с середины XII в. оно разделяется на два — собственно Муромское и Рязанское со столицей в Старой Рязани. В 1237 г. Рязанское княжество стало первой жертвой монгольского нашествия под предводительством Батыея; набеги и разорения Рязанской земли продолжались более 350 лет. До XVI в. Рязанское княжество постепенно теряло свои территории и с 1521 г. перешло под управление наместников московских государей, но и после подчинения Москве продолжалось разорение Рязанской земли набегами татар вплоть до 1594 г. Если учесть и более раннее взаимодействие Рязанских земель с соседней Волжской Булгарией (известны походы рязанцев против них в 1172 и 1183 г.), то началом взаимодействия рязанцев с тюркским миром, находящимся на его границах, можно считать период еще до XII в. Кроме того, Рязанский край в некотором смысле был форпостом, который граничил с Диким полем. Резонно предположить, что наибольшее взаимопроникновение генофондов славянского и тюркоязычного населения можно проследить именно в генетической истории населения Рязанской земли. Взаимодействие славянских и финноязычных племен насчитывает еще более долгую историю. Поэтому закономерно рассмотреть отражение в генофонде современных русских популяций генетического следа взаимопроникновения финноязычных, славянских и тюркоязычных племен и народов на модели «узлового» ареала Волго-Окского региона и Рязанских земель.

Современные методы анализа ДНК из ископаемых останков позволяют получить информацию о древних генофондах [8–14]. Но количество древних геномов, пригодных для анализа, всегда ограничено и особенно для населения, практиковавшего, как славяне, кремацию умерших. Поэтому важным источником для реконструкции популяционной истории служат генофонды современных

популяций, возможности исследования которых возросли с появлением методов полногеномного анализа [15–19]. Наиболее перспективен для решения поставленной задачи метод моделирования предковых компонент (ADMIXTURE) по данным об аутосомных геномах [20].

Генетическое взаимодействие народов индоевропейской, уральской и алтайской языковых семей было рассмотрено в ряде исследований современного генофонда Северной Евразии методами полногеномного анализа [21–26]. Так, реконструкция генофонда балто-славянских популяций по широкогеномным панелям [21] выявила генетическую близость балтов (литовцев, латышей) к волжской группе финно-угорских народов и особенно к мордве. Восточные славяне (так же, как и западные) впитали в себя местный генетический дославянский восточноевропейский субстрат. В полногеномном исследовании популяций Восточноевропейской равнины [22] выявлено присутствие «восточноазиатской» предковой компоненты, составляющей 20% генофонда башкир и 5% генофондов чувашей и приволжских татар. У народов уральской языковой семьи, включая финноязычных карел, мордву, марийцев, удмуртов, по данным полногеномного исследования, обнаружена специфичная предковая компонента, указывающая на определенную степень их генетической общности [23]. В рамках полногеномного исследования популяций Северной Евразии выявлены три клины, тянущиеся с запада на восток [24]. При этом отмечено, что генофонды тюркоязычных и уралоязычных популяций Поволжья довольно схожи, но уралоязычные популяции генетически тяготеют и к уграм Зауралья. По итогам сравнения аутосомных геномов Новгородской области с широким кругом популяций европейской части России и Урала выдвинута гипотеза сохранения в генофонде Новгородчины наследия местного дославянского населения, генетически более близкого к восточным (волжским и пермским) финноязычным группам, чем к западным (прибалтийским) [25]. Возможности изучения фармакогенетического ландшафта не ограничены созданием картографических атласов субконтинентов и позволяют изучать и его локальные варианты. Так, показано, что фармакогенетический статус бесермян и удмуртов близок к коренному населению Поволжья, Приуралья и Южного Урала, но не более отдаленных регионов [26].

Цель данного исследования — с помощью моделирования предковых компонент выявить отражение в аутосомном генофонде современных русских популяций генетического следа взаимодействия финноязычных, славянских и тюркоязычных народов в узловом регионе Волго-Окского междуречья. Вторая, более прикладная, задача — создать карты фармакогенетических ДНК маркеров и рассмотреть особенности фармакогенетического ландшафта региона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методические и биоинформатические аспекты изучения аутосомного генофонда по полногеномной панели детально описаны ранее [27]. Генотипирование по полногеномной панели 4,5 млн SNP маркеров выполняли с помощью биочипа Infinium OmniExome BeadChip Kit (Illumina; США) на приборе iScan (Illumina; США). Первичный анализ и оценку качества проводили в программе GenomeStudio v2011.1, показатель CallRate составил не менее 0,99.

Если при популяционно-генетическом анализе по небольшой панели аутосомных ДНК-маркеров выборка

из популяции должна быть не менее 50 индивидов, то при анализе по полногеномным панелям из миллионов ДНК-маркеров достаточно выборка 5–10 индивидов. Поскольку при этом резко возрастают требования к качеству выборки, подчеркнем, что все геномы, представленные в работе, получены согласно международным требованиям [28]: генеалогии всех изученных индивидов на протяжении не менее трех поколений указывают на происхождение из данной популяции и идентификации себя с данным этносом.

«Узловой» Рязанский край представлен 20 геномами из 4 популяций (Михайловский, Спасский, Сапожковский, Сараевский районы), для сравнения привлечены русские популяции из Тверской, Костромской, Смоленской, Калужской, Орловской, Тамбовской и Нижегородской областей. Финноязычные популяции Волго-Уральского региона представлены этническими группами Мордовии (эрзя, мокша, шокша), марийцами и удмуртами, южные карелы привлечены как наиболее географически близкий представитель западной ветви финноязычных народов. Тюркоязычные популяции Волго-Уральского региона представлены казанскими татарами и чувашами, для сравнения привлечены астраханские и ставропольские ногайцы. Для идентификации монгольского генетического следа приведены данные о шести родовых группах монголоязычных калмыков.

Анализ предковых компонент проводили методом ADMIXTURE для 248 геномов из 47 популяций 9 этносов (таблица): 104 генома из русских популяций, 81 геном четырех финноязычных народов, 47 геномов трех тюркоязычных народов и 16 геномов монголоязычных калмыков. Метод ADMIXTURE дает количественную оценку вклада разных предковых компонент в каждый индивидуальный геном [20, 29]. Все предковые компоненты моделируются на основе одной и той же совокупности изученных геномов, причем моделирование каждого уровня k проводится независимо от всех остальных. Единственный параметр, который задает исследователь, — число предковых компонент k . При $k = 2$ для каждого генома моделируется вклад двух предковых компонент; при $k = 3$ для тех же геномов — вклад трех компонент; при $k = 20$ реконструируется вклад двадцати предковых компонент для той же совокупности геномов: при увеличении k программа выделяет все более детальные предковые компоненты. При усреднении вклада каждой компоненты в геномы мы оцениваем ее вклад в генофонд популяции.

Для того чтобы рассмотреть, как взаимодействие финноязычных, славянских и тюркоязычных народов отражено в зеркале фармакогенетического ландшафта Рязанских земель, была создана серия фармакогенетических карт. Для этого привлекли данные о 42 ключевых фармакогенетических маркерах (генов ADME; генов, кодирующих фармакодинамические мишени лекарственных средств; генов, кодирующих компоненты системы гемостаза), информация о которых извлечена из того же массива полногеномных данных, для которого проведен и анализ ADMIXTURE [26]. Матрица встречаемости 42 фармакогенетических ДНК-маркеров основана на данных по 16 объединенным популяциям (для увеличения объема выборки). На основе матрицы рассчитаны генетические расстояния M . Нея (d) от рязанской популяции до остальных и созданы 42 карты генетических расстояний. После их усреднения получена карта средних генетических расстояний от рязанской популяции, отражающая особенности ее фармакогенетического статуса в изучаемом регионе.

Все карты — как фармакогенетического ландшафта, так и предковых компонент — построены с помощью оригинального картографического пакета GeneGeo [30] методом среднезвешенной интерполяции с радиусом влияния 400 км и значением весовой функции 3. Детальное описание геногеографической технологии дано ранее [2, 31].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование предковых компонент для рассматриваемого круга 47 популяций проведено для 13 уровней k , полученных при последовательном переборе значений k от 2 до 14. Наиболее информативными для решения основной задачи оказались две модели: при $k = 3$ и $k = 7$ (таблица). Уровень $k = 3$ демонстрирует три предковых компоненты, которые можно условно назвать «западная», «уральская» и «восточная». На уровне $k = 7$ впервые разделяются предковые компоненты западных и восточных финноязычных народов, что позволяет дифференцировать их вклад. В таблице приведены оценки вклада каждой из выявленных предковых компонент в геномы каждой из изученных популяций. На рис. 1 представлен вклад каждой предковой компоненты в каждый геном для трех уровней $k = 3$, $k = 7$, $k = 8$. На уровне $k = 8$ сохранился вклад всех ранее выявленных компонент, новая восьмая компонента выявляет более сложную структуру русских популяций.

Для оценки устойчивости тенденций моделирование каждого уровня от $k = 2$ до $k = 14$ проведено 10 раз (130 моделей): при $k = 3$ результаты практически идентичны; при $k = 7$ в шести из десяти запусков выявлены стабильные предковые компоненты (именно они описаны в тексте статьи). В остальных четырех запусках одна из предковых компонент заменяется на иную, но каждый из этих запусков характеризуется более высоким значением ошибки моделирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Моделирование трех предковых компонент

Полученные результаты прежде всего показывают, что выявляемые предковые компоненты никак не укладываются в ложе трех лингвистических групп — славянской, финской и тюркской (рис. 1, таблица). При $k = 3$ мы видим три предковых компоненты, которые условно можно назвать «западная», «уральская» и «восточная».

«Западная» предковая компонента

Преобладает не только во всех русских популяциях (95%), но и в финноязычных популяциях карел (75%) и мордвы (78%) (рис. 2А, таблица). Более того, она составляет существенную часть генофондов тюркоязычных народов: у казанских татар более половины генофонда (52%) и около четверти генофонда ногайцев (25%) и чувашей (23%).

«Уральская» предковая компонента

Составляет практически весь генофонд удмуртов (99%) и марийцев (91%) (рис. 2Б, таблица). Но высоких значений она достигает также и у тюркоязычных народов, составляя две трети генофонда чувашей (67%) и треть генофонда татар (34%). Меньший, но ощутимый вклад «уральской» предковой компоненты мы видим у карел (24%) и мордвы

Таблица. Оценка вклада каждой из десяти предковых компонент ADMIXTURE при $k = 3$ и $k = 7$ в геномы каждой из изученных популяций

Этнос	Популяция	Число популяций	Число геномов	СРЕДНИЙ ВКЛАД ПРЕДКОВОЙ КОМПОНЕНТЫ (%)										Суммарный вклад финноязычных этносов (%)		
				$k = 3$			$k = 7$							$k = 7$		
				«Западная»	«Уральская»	«Восточная»	«Карельская»	«Славянская»	«Мордовская-1»	«Мордовская-2»	«Марийская»	«Удмуртская»	«Калмыцкая»	Без «карельской»	С «карельской»	
Карелы	Южные	1	9	75	24	2	94	0	6	0	0	0	0	0	6	100
Русские	Тверская область	2	16	95	5	0	6	70	19	3	1	1	1	0	24	30
	Костромская область	1	20	87	10	3	11	73	3	3	4	4	3	14	25	25
	Смоленская, Калужская области	6	20	97	2	0	2	82	12	2	1	1	1	0	16	18
	Орловская, Тамбовская области	3	19	97	3	1	1	87	7	2	1	1	1	11	12	12
	Рязанская, Михайловский р-н	1	5	98	0	2	2	86	5	5	0	1	1	11	13	13
	Рязанская, Спасский р-н	1	5	95	3	3	1	86	3	3	2	1	2	11	12	12
	Рязанская, Саложковский р-н	1	5	93	6	1	1	87	3	3	1	0	2	9	10	10
	Рязанская, Сараевский р-н	1	5	96	1	3	4	81	6	4	3	2	1	15	19	19
	Рязанская область суммарно	4	20	95	2	2	2	85	4	5	1	1	2	11	13	13
	Нижегородская область	4	9	90	8	3	3	81	4	4	3	3	3	14	17	17
Мордва	Мокша, эрзя, шошпа	3	41	78	19	3	5	3	53	37	1	1	0	92	97	97
Татары	Казанские	5	19	52	34	14	13	6	36	7	15	10	12	68	81	81
Чуваши	Чуваши	4	13	23	67	9	7	0	20	2	62	3	5	87	94	94
Марийцы	Луговые	1	15	4	92	5	2	0	1	1	96	0	0	98	100	100
Удмурты	Удмурты	7	16	0	99	1	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100
Ногайцы	Астраханские, ставропольские	2	15	25	13	62	2	0	33	1	1	2	61	37	39	39
Калмыки	Шесть родовых групп	6	16	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	СУММАРНО	49	248													

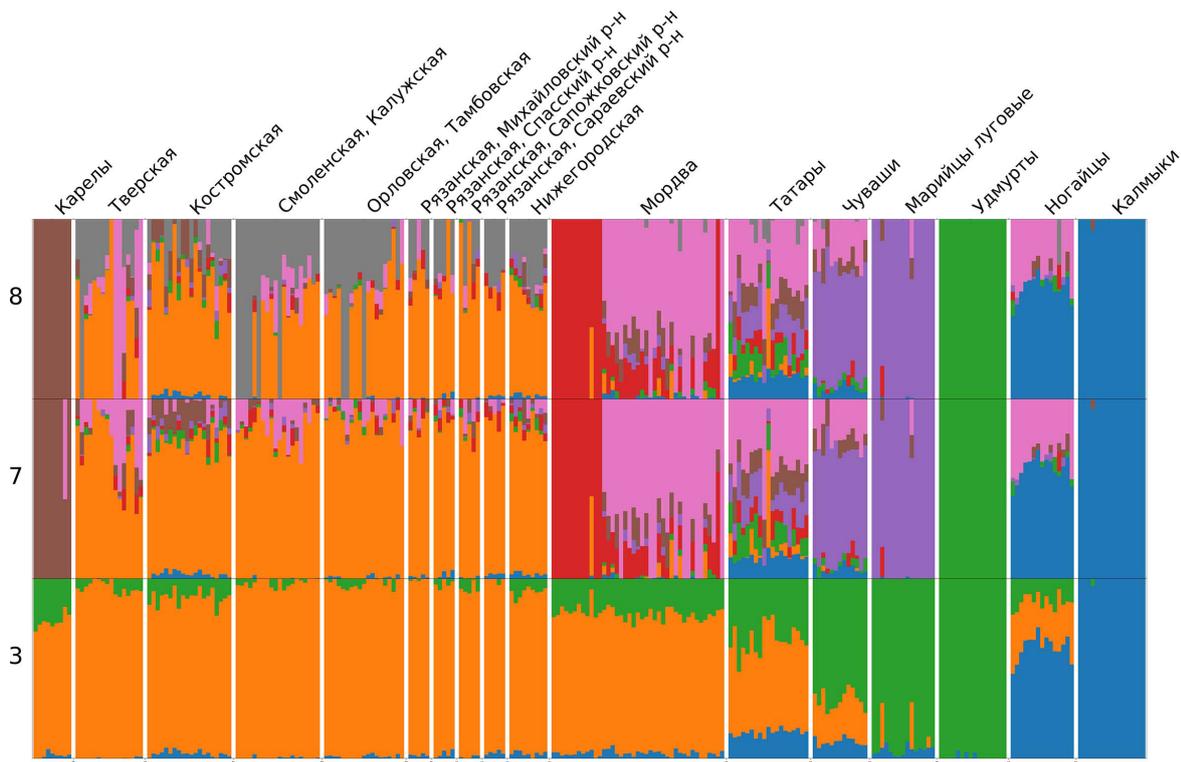


Рис. 1. Вклад предковых компонент ADMIXTURE в индивидуальные геномы изученных популяций при $k = 3$, $k = 7$, $k = 8$ предковых компонент. Каждая предковая компонента обозначена своим цветом; каждая вертикальная линия — индивидуальный геном с палитрой вкладов в него предковых компонент; совокупность индивидуальных геномов популяции отделена от другой популяции белой линией; названия и состав популяций приведены в таблице

(19%). Средний вклад в русские популяции мал (4%) с максимумами в Костромской и Нижегородской областях.

«Восточная» предковая компонента

Составляет весь генофонд всех шести родовых групп калмыков, поэтому ее можно использовать для оценки влияния Центральной Азии на европейский генофонд (рис. 2В, таблица). Значительной величины она достигает и у ногайцев (62%), что подтверждает ее оценку как «центральноазиатской». В Поволжье наибольшее центральноазиатское влияние обнаружено у казанских татар (14%) и чувашей (9%). В остальных популяциях роль «восточной» компоненты мала и не превышает 5% (у марийцев). Средний вклад в русские популяции составляет всего 1%; он слабо возрастает в восточных районах Нижегородской и Рязанской областей до 3% генофонда.

Казанские татары

Обратим внимание на «составную» структуру генофонда казанских татар, представленных пятью популяциями. Вклад «восточной» предковой компоненты во все популяции оказался одинаковым (14–15%), а небольшие межпопуляционные различия связаны с разным вкладом «западной» компоненты (48–60%) и «уральской» (26–38%). Иными словами, во всех популяциях казанских татар основной вклад составляет «западная» предковая компонента (в среднем более половины генофонда), на втором месте находится «уральская» (в среднем треть генофонда) и лишь на последнем месте — «восточная» (14%). При увеличении числа предковых компонент k появляются новые компоненты, но они характерны для других этносов. Для казанских татар устойчивая «собственная» предковая компонента не обнаружена:

«составная» структура генофонда сохраняется и на более высоких уровнях k , что крайне затрудняет выявление генетического влияния казанских татар на соседние русские популяции.

Моделирование семи предковых компонент

При $k = 7$ появляются новые четыре компоненты. Но при этом нет четкого ветвления «западной» и «уральской» компонент на дочерние, картина намного сложнее: новые компоненты органично вбирают в себя части «западной» и «уральской» компонент, выявленных при $k = 3$. Подчеркнем, что лишь для лаконичности описания мы даем каждой предковой компоненте условное название по тем популяциям, в геномах которых выявлен их наибольший вклад.

«Карельская» предковая компонента

Отражает вклад западных финноязычных популяций, составляет 94% генофонда карел и редка в остальных популяциях (таблица). Ее вклад максимален в генофонде казанских татар (13%) и костромских русских (11%).

«Славянская» предковая компонента

Доминирует во всех русских популяциях (в среднем 81%, варьируя от 70 до 87%) (рис. 3А, таблица). В других генофондах практически отсутствует. Исключение вновь составляют казанские татары (6%). Но подчеркнем, что повышение частоты «славянской» компоненты у татар нельзя объяснить генеалогией лишь отдельных индивидов, поскольку она выявлена в 80% индивидуальных геномов татар. Встречается эта компонента и в Мордовии (3%), но лишь в 17% геномов на северо-западе ареала мордвы.

«Мордовская-1» предковая компонента

Делит с «мордовской-2» второе место по обширности ареала (рис. 3Б, таблица). Достигая максимума (53%) среди геномов Мордовии, она широко распространена и в других популяциях. Ее наибольший вклад характерен для тюркоязычных популяций: 36% в генофонд казанских татар, 35% — астраханских ногайцев, 20% — чувашей. Важно, что значительный вклад «мордовской-1» компоненты обнаружен практически во всех индивидуальных геномах этих народов (таблица), что указывает на важность этого генетического пласта в генофонде тюркоязычных народов Поволжья.

В русских популяциях вклад «мордовской-1» предковой компоненты невелик (7%), но она обнаружена в 60% рассмотренных геномах русских. Максимальный вклад в Тверской (19%) и Калужской (16%) областях, причем она обнаружена практически у всех индивидов этих областей (80–90% геномов; рис. 4), а в остальных областях присутствует в 45–65% геномов. В целом, «мордовская-1» компонента составляет постоянную часть генофонда практически всех славяноязычных, тюркоязычных и финноязычных популяций региона.

«Мордовская-2» предковая компонента

Компонента представлена на рис. 3В и в таблице. Геномы Мордовии резко различаются (рис. 1): одна пятая часть их содержит 100% «мордовской-1», а другая пятая часть — 100% «мордовской-2» компоненты, которая отличается более выраженным своеобразием: именно она проявляется уже на уровне $k = 4$, в то время как «мордовскую-1» можно зафиксировать только с уровня $k = 7$. Влияние «мордовской-2» компоненты нигде не превышает 5%. Исключение вновь составляют казанские татары: у них вклад «мордовской-2» компоненты составляет 6%, ее содержат 90% индивидуальных геномов татар (у чувашей она обнаружена лишь в 40% геномов).

В русских популяциях «мордовская-2» предковая компонента довольно редка (в среднем 3%). Однако она не только встречается повсеместно во всех русских популяциях региона, но и присутствует в 60% индивидуальных геномов русских, наиболее часто в геномах на востоке русского ареала — в Костромской, Нижегородской и Рязанской областях (рис. 3В и 4).

«Марийская» предковая компонента

Впервые проявляется на уровне пяти предковых компонент ($k = 5$) и составляет не только весь генофонд луговых марийцев (96%), но и две трети генофонда чувашей (62%), причем во всех популяциях (57–65%) (таблица). Из других народов самый значительный вклад «марийской» компоненты мы вновь видим у казанских татар (15%), причем она обнаружена во всех индивидуальных геномах. В популяциях других народов вклад «марийской» компоненты нигде не превышает 4% (таблица).

«Удмуртская» предковая компонента

Компонента появляется уже при $k = 3$ (описана выше как «уральская»; таблица, рис. 2Б) и на всех более высоких уровнях составляет 100% генофонда удмуртов. В геномах всех других народов она крайне редка, не превышает 4% генофонда. Исключением вновь оказываются казанские

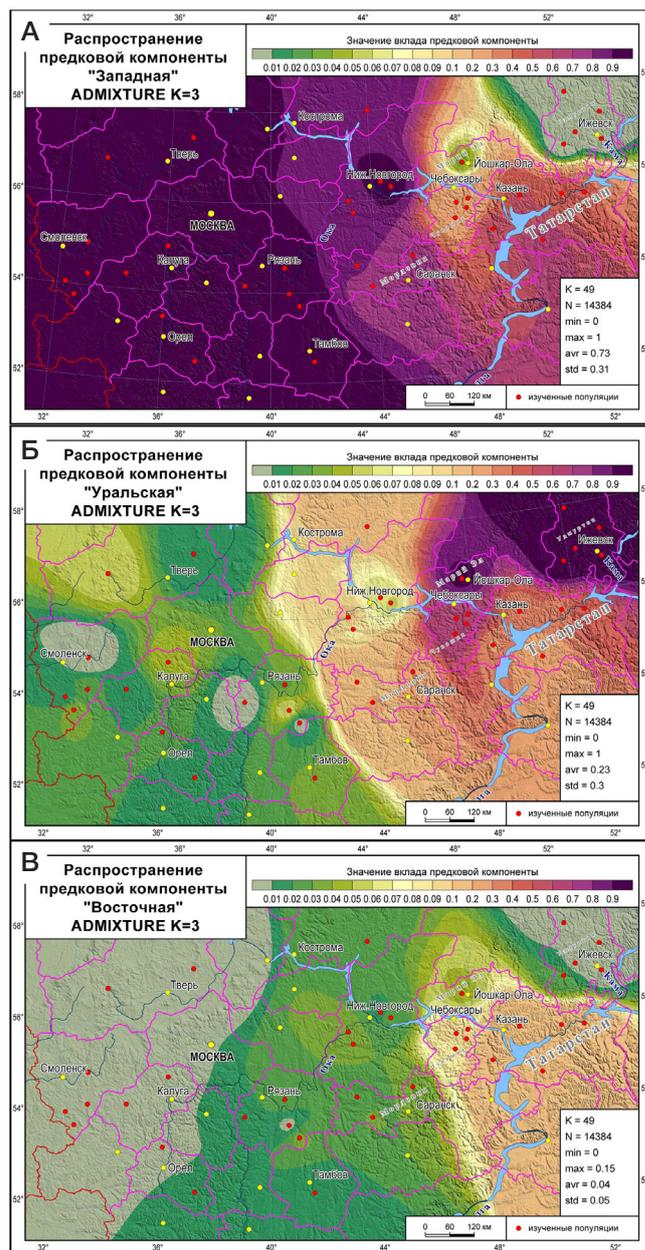


Рис. 2. Пространственная изменчивость трех предковых компонент ADMIXTURE при $k = 3$ предковых компонент. Распространение «западной» (А), «уральской» (Б) и «восточной» (В) предковых компонент. Высокие значения предковой компоненты обозначены коричнево-фиолетовыми тонами, низкие — зелеными, шкала переходов приведена в легенде под картой; изученные популяции обозначены красными кружками

татары, у которых частота «удмуртской» компоненты повышается до 10% и присутствует практически во всех индивидуальных геномах татар с максимальным вкладом 21%.

«Калмыцкая» предковая компонента

Эта компонента, фиксирующая «дыхание» Центральной Азии, проявляется уже при $k = 2$ (описана выше как «восточная»; рис. 2В) и ее вклад велик лишь в генофонды калмыков (100%) и ногайцев (61%). Из других народов мы вновь видим наибольший ее вклад лишь у казанских татар (12%), причем «калмыцкая» компонента встречена во всех индивидуальных геномах татар с вкладом от 7 до 17%. Во всех других популяциях вклад «калмыцкой» компоненты не превышает 5% (таблица).

Рязанский генофонд

Современный генофонд Рязанской области представлен в работе четырьмя популяциями (рис. 1–3, таблица) с целью выявить различия во взаимовлиянии дославянского, славянского и тюркоязычного населения в этом узловом регионе. Для этого мы исследовали один район (Михайловский) на самом западе Рязанской области и три района (Спасский, Сапожковский, Сараевский), расположенные на одной трансекте с севера на юг таким образом, что Сараевский является пограничным. Однако результаты свидетельствуют о сходном генетическом облике всех четырех популяций. Наибольшие различия проявились лишь при оценке суммарного вклада финноязычных популяций в их генофонд (таблица): в пограничном Сараевском районе их вклад составил 19%, тогда как в других трех районах — 10–13%. Поскольку центральноазиатское влияние во всех четырех популяциях одинаково мало (1–2%), некоторое своеобразие Сараевской популяции нельзя напрямую связать с особенностями генофонда Золотой орды, как и нельзя приписать влиянию какого-либо из дославянских племен. Единственная гипотеза, которая может быть выдвинута для объяснения своеобразия генофонда на юго-востоке Рязанской земли, — это рост влияния Дикого поля в этом пограничном регионе.

Фармакогенетический статус русских Рязанской области

Важным фактором перехода к персонифицированной медицине служит анализ фармакогенетически значимых маркеров, необходимых для разработки протоколов по подбору оптимальных препаратов и их доз в зависимости от генотипа пациента. Однако основные мировые исследования ориентированы на население Западной Европы и мало применимы к популяциям России, отличающимся огромным генетическим разнообразием [31].

Для оценки своеобразия фармакогенетического ландшафта региона создана карта генетических расстояний (d) от русских Рязанской области до обширной панели фармакогенетических маркеров (рис. 5). В отличие от карт предковых компонент (рис. 2 и 3), созданных по селективно-нейтральным маркерам, фармакогенетические ДНК маркеры выявили наибольшую близость русских Рязанской области к финноязычному соседу — популяциям Мордовии ($0,03 < d < 0,04$). Фармакогенетический статус русских популяций западнее и севернее Рязани (Калужской, Смоленской и Костромской областей) оказался на втором месте по сходству с рязанскими русскими ($0,05 < d < 0,07$). За ними по степени удаленности от рязанских русских следуют популяции орловские и тверские ($0,08 < d < 0,09$). На третьем месте по сходству с фармакогенетическим статусом русских Рязанского края ($0,09 < d < 0,10$) оказались и тамбовские русские, и восточные соседи — финноязычные марийцы и тюркоязычные чуваша. Ожидаемо резко отличаются от рязанского фармакогенетического портрета татар и удмуртов ($0,11 < d < 0,15$). Но самым неожиданным результатом оказался очень высокий уровень фармакогенетических различий между рязанскими и нижегородскими русскими ($0,11 < d < 0,12$) на фоне их значительного сходства по селективно-нейтральным ДНК маркерам (рис. 1–4).

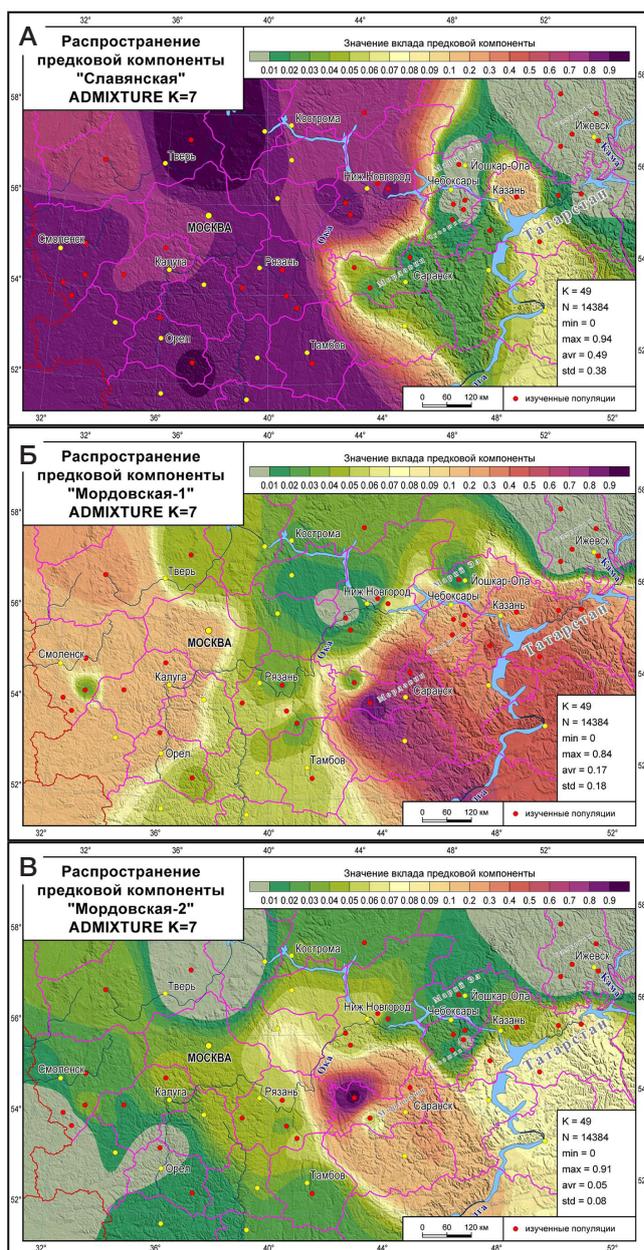


Рис. 3. Пространственная изменчивость трех предковых компонент ADMIXTURE при $k = 7$ предковых компонент. Распространение «славянской» (А), «мордовской-1» (Б) и «мордовской-2» (В) предковых компонент. Высокие значения предковой компоненты обозначены коричнево-фиолетовыми тонами, низкие — зелеными, шкала переходов приведена в легенде под картой; изученные популяции обозначены красными кружками

В целом, сравнение карт фармакогенетического ландшафта и предковых компонент показывает, что для выявления регионов со схожими протоколами по подбору лекарственных препаратов и их доз в зависимости от генотипа пациента нельзя полагаться только на сходство и различия селективно-нейтральных характеристик генофонда, а необходимо прицельно исследовать особенности фармакогенетического ландшафта.

Выводы

Проведено моделирование предковых компонент для аутосомного генофонда современных популяций в узловом регионе взаимодействия финноязычных, славянских и тюркоязычных народов. (1) Для финноязычных популяций Поволжья не выявлена общая предковая компонента,



Рис. 4. Доля индивидуальных геномов (%), в которых обнаружены предковые компоненты «Мордовская-1» и «Мордовская-2» (русские популяции)

но обнаружены собственные предковые компоненты, характерные для каждого из изученных народов — удмуртов, марийцев, мордвы. При этом след обеих предковых компонент генофонда Мордовии прослеживается практически во всех популяциях региона вне зависимости от их языковой принадлежности. Это позволяет выдвинуть гипотезу, что в генетический портрет дославянского населения региона входили две основные «краски», сохраненные в современном генофонде Мордовии. (2) Влияние генофондов финноязычных популяций на тюркоязычные народы Поволжья очень велико: вклад предковых компонент, связанных с финноязычными народами, составил 81% генофонда казанских татар и 94% генофонда чувашей. (3) Генофонд казанских татар является наиболее «составным» генофондом, в наибольшей мере органично включившим в себя все предковые компоненты всех генофондов региона. Хотя центральноазиатское влияние в наибольшей степени прослеживается именно у казанских татар, вклад его мал (12%) — в семь раз меньше разнообразного вклада финноязычных народов (81%). Поэтому крайне

затруднительно оценить «татарское» влияние на другие генофонды. (4) Генофонды изученных русских популяций представляют собой единый массив, который в основном (на 80%) можно описать характерной для них предковой компонентой. Однако при этом их генофонд включает в себя все остальные предковые компоненты, обнаруженные в генетическом ландшафте региона. Популяции Рязанской области целиком воспроизводят общие особенности славянского генетического массива, лишь в пограничной юго-восточной популяции проявляется увеличение общего вклада финноязычных популяций. (5) Анализ генофондов региона по панели фармакогенетически значимых маркеров позволил дополнить картину генетического разнообразия, основанную на селективно-нейтральных маркерах, и выявил своеобразие фармакогенетического ландшафта. Знание его параметров необходимо для будущего внедрения персонализированного подхода к лечению и разработки протоколов по подбору лекарственных препаратов и их доз, которые бы учитывали генетическое разнообразие населения России.

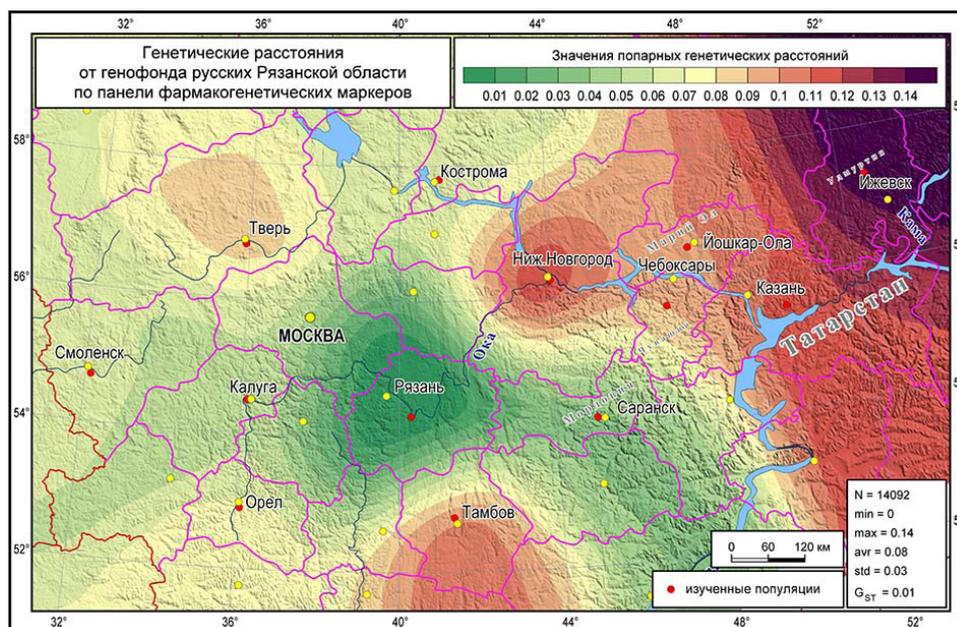


Рис. 5. Фармакогенетический ландшафт региона (генетические расстояния от русских Рязанской области по фармакогенетическим маркерам). Минимальные генетические расстояния (близость к генофонду русских Рязанской области) обозначены зелеными тонами; максимальные генетические расстояния (несходство с генофондом русских Рязанской области) обозначены красно-фиолетовыми тонами

Литература

- Седов В. В. Освоение славянами Восточноевропейской равнины. В книге: Восточные славяне. Антропология и этническая история. М.: Научный мир, 1999; с. 153–160.
- Балановская Е. В., Балановский О. П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007.
- Леонтьев А. Е., Рябинин Е. А. Этапы и формы ассимиляции летописной мери (постановка вопроса). Советская археология. 1980; (2): 67–79.
- Бейлекчи В. В. Древности летописной муромы (погребальный обряд и поселения). М.: Муром, 2005; 278 с.
- Алексеева Т. И. Этногенез восточных славян по данным антропологии. М.: Наука, 1973; 329 с.
- Седов В. В. Древнерусская народность: Историко-археологическое исследование. М.: Языки русской культуры, 1999; 316 с.
- Горюнова Е. И. Этническая история Волго-Окского междуречья. М.: Изд-во АН СССР, 1961; 264 с.
- Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli D. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel Evol.* 2012 Jul 6; 44 (1): 21. DOI: 10.1186/1297-9686-44-21.
- Lazaridis I, Patterson N, Mitnik A, Renaud G, Mallick S, Kirsanow K et al. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature.* 2014; 513: 409–413. DOI: 10.1038/nature13673.
- Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallik S, Llamas B et al. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature.* 2015 Jun 11; 522 (7555): 207–11. DOI: 10.1038/nature14317.
- Allentoft ME, Sikora M, Sjögren KG, Rasmussen S, Rasmussen M, Stenderup J et al. Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature.* 2015 Jun 11; 522 (7555): 167–72. DOI: 10.1038/nature14507.
- Jones ER, Zarina G, Moiseyev V, et al. The Neolithic Transition in the Baltic Was Not Driven by Admixture with Early European Farmers. *Curr Biol.* 2017 Feb 20; 27 (4): 576–82. DOI: 10.1016/j.cub.2016.12.060.
- Mitnik A, Wang CC, Pfrengle S, Daubaras M, Zarina G, Hallgren F et al. The genetic prehistory of the Baltic Sea region. *Nat Commun.* 2018 Jan 30; 9 (1): 442. DOI: 10.1038/s41467-018-02825-9.
- Lamnidis TC, Majander K, Jeong C, Salmela E, Wessman A, Moiseyev V et al. Ancient Fennoscandian genomes reveal origin and spread of Siberian ancestry in Europe. *Nat Commun.* 2018 Nov 27; 9 (5018). DOI: 10.1038/s41467-018-07483-5.
- Li JZ, Absher DM, Tang H, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science.* 2008; 319 (5866): 1100–4. DOI: 10.1126/science.1153717.
- Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko A, Auton A, et al. Genes mirror geography within Europe. *Nature.* 2008 Aug 31; 456: 98–101. DOI: 10.1038/nature07331.
- Pagani L, Lawson D, Jagoda E, Morseburg A, Eriksson A, Mitt M, et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature.* 2016 Oct 13; 538 (7624): 238–42. DOI: 10.1038/nature19792.
- Mallick S, Li H, Lipson M, Mathieson I, Gymrek M, Racimo F, et al. The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature.* 2016 Oct 13; 538 (7624): 201–6. DOI: 10.1038/nature18964.
- Malaspinas AS, Westaway M, Muller C, Sousa V, Lao O, Alves I et al. A genomic history of Aboriginal Australia. *Nature.* 2016 Oct 13; 538 (7624): 207–14. DOI: 10.1038/nature18299.
- Alexander DH, Lange K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics.* 2011; 12 (1): 246. DOI: 10.1186/1471-2105-12-246.
- Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoyan A, Dibirova K, Uktverite I et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS ONE.* 2015 Sep 2; 10 (9). PubMed PMID: 26332464. DOI: 10.1371/journal.pone.0135820.
- Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova E, Arun Kumar GP, Akhmetova V. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genetics.* 2017 Dec 28; 18 (1): 5–20. PubMed PMID: 29297395. DOI: 10.1186/s12863-017-0578-3.
- Tambets K, Yunusbayev B, Hudjashov G, Ilumäe A-M, Rootsi S, Honkola T. Genes reveal traces of common recent demographic history for most of the Uralic-speaking populations. *BMC Genome Biology.* 2018 Sep 21; 19 (1): 1–20. DOI: 10.1186/s13059-018-1522-1.
- Jeong C, Balanovsky O, Lukianova E, Kahbatkyzy N, Flegontov P, Zaporozhchenko V, et al. The genetic history of admixture across inner Eurasia. *Nature ecology & evolution.* 2019 Jun; 3 (6): 966–76. PubMed PMID: 31036896. DOI: 10.1038/s41559-019-0878-2.
- Балановская Е. В., Черневский Д. К., Балановский О. П. Своеобразие Новгородского генофонда в контексте народонаселения европейской части России. Вестник Новгородского государственного университета. Сер.: Медицинские науки. 2021; 124 (3): 51–57. DOI: 10.34680/2076-8052.2021.
- Балановская Е. В., Петрушенко В. С., Кошель С. М., Почешхова Э. А., Черневский Д. К., Мирзаев К. Б. и др. Картографический атлас распространения 45 фармакогенетических маркеров в народонаселении России и сопредельных стран. Вестник РГМУ. 2020; (6): 39–52. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.080.
- Балановский О. П., Горин И. О., Записецкая Ю. С., Голубева А. А., Кострюкова Е. С., Балановская Е. В. Взаимодействие генофондов русского и финноязычного населения Тверской области: анализ 4 млн SNP-маркеров. Вестник РГМУ. 2020; (6): 15–22. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.072.
- Балановская Е. В., Жабагин М. К., Агджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. Генетика. 2016; 52 (12): 1371–87. DOI: 10.7868/S001667581612002X.
- Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 2009 Sep; 19 (9): 1655–64. DOI: 10.1101/gr.094052.109.
- Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геногеографии. В книге: Современная географическая картография. М.: Дата+, 2012; с. 158–166.
- Балановский О. П. Генофонд Европы. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2015.

References

- Sedov VV. Osvoenie slavyanami Vostochnoevropejskoj ravniny. V knige: Vostochnye slavyane. Antropologiya i ehtnicheskaya istoriya. M.: Nauchnyj mir, 1999; s. 153–160. Russian.
- Balanovskaya EV, Balanovskij OP. Russkij genofond na Russkoj ravnine. M.: Luch, 2007. Russian.
- Leontev AE, Ryabinin EA. Ehtapy i formy assilyacii letopisnoj meri (postanovka voprosa). *Sovetskaya arxeologiya.* 1980; (2): 67–79. Russian.
- Bejlekchi VV. Drevnosti letopisnoj muromy (pogrebal'nyj obryad i poseleniya). M.: Муром, 2005; 278 s. Russian.
- Alekseeva TI. Ehtnogenез vostochnyx slavyan po dannym antropologii. M.: Nauka, 1973; 329 s. Russian.
- Sedov VV. Drevnerusskaya narodnost': Istoriko-arxeologicheskoe issledovanie. M.: Yazyki russkoj kul'tury, 1999; 316 s. Russian.
- Goryunova EI. Ehtnicheskaya istoriya Volgo-Okskogo mezhdurech'ya. M.: Izd-vo AN SSSR, 1961; 264 c. Russian.
- Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli D. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel Evol.* 2012 Jul 6; 44 (1): 21. DOI: 10.1186/1297-9686-44-21.
- Lazaridis I, Patterson N, Mitnik A, Renaud G, Mallick S, Kirsanow K et al. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature.* 2014; 513: 409–413. DOI: 10.1038/nature13673.

- 10.1038/nature13673.
10. Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallik S, Llamas B et al. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature*. 2015 Jun 11; 522 (7555): 207–11. DOI: 10.1038/nature14317.
 11. Allentoft ME, Sikora M, Sjögren KG, Rasmussen S, Rasmussen M, Stenderup J et al. Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature*. 2015 Jun 11; 522 (7555): 167–72. DOI: 10.1038/nature14507.
 12. Jones ER, Zarina G, Moiseyev V, et al. The Neolithic Transition in the Baltic Was Not Driven by Admixture with Early European Farmers. *Curr Biol*. 2017 Feb 20; 27 (4): 576–82. DOI: 10.1016/j.cub.2016.12.060.
 13. Mitnik A, Wang CC, Pfrengle S, Daubaras M, Zarina G, Hallgren F et al. The genetic prehistory of the Baltic Sea region. *Nat Commun*. 2018 Jan 30; 9 (1): 442. DOI: 10.1038/s41467-018-02825-9.
 14. Lamnidis TC, Majander K, Jeong C, Salmela E, Wessman A, Moiseyev V et al. Ancient Fennoscandian genomes reveal origin and spread of Siberian ancestry in Europe. *Nat Commun*. 2018 Nov 27; 9 (5018). DOI: 10.1038/s41467-018-07483-5.
 15. Li JZ, Absher DM, Tang H, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*. 2008; 319 (5866): 1100–4. DOI: 10.1126/science.1153717.
 16. Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko A, Auton A, et al. Genes mirror geography within Europe. *Nature*. 2008 Aug 31; 456: 98–101. DOI: 10.1038/nature07331.
 17. Pagani L, Lawson D, Jagoda E, Morseburg A, Eriksson A, Mitt M, et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature*. 2016 Oct 13; 538 (7624): 238–42. DOI: 10.1038/nature19792.
 18. Mallick S, Li H, Lipson M, Mathieson I, Gymrek M, Racimo F, et al. The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature*. 2016 Oct 13; 538 (7624): 201–6. DOI: 10.1038/nature18964.
 19. Malaspinas AS, Westaway M, Muller C, Sousa V, Lao O, Alves I et al. A genomic history of Aboriginal Australia. *Nature*. 2016 Oct 13; 538 (7624): 207–14. DOI: 10.1038/nature18299.
 20. Alexander DH, Lange K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12 (1): 246. DOI: 10.1186/1471-2105-12-246.
 21. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoyan A, Dibirova K, Uktverite I et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS ONE*. 2015 Sep 2; 10 (9). PubMed PMID: 26332464. DOI: 10.1371/journal.pone.0135820.
 22. Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova E, Arun Kumar GP, Akhmetova V. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genetics*. 2017 Dec 28; 18 (1): 5–20. PubMed PMID: 29297395. DOI: 10.1186/s12863-017-0578-3.
 23. Tambets K, Yunusbayev B, Hudjashov G, Ilumäe A-M, Rootsi S, Honkola T. Genes reveal traces of common recent demographic history for most of the Uralic-speaking populations. *BMC Genome Biology*. 2018 Sep 21; 19 (1): 1–20. DOI: 10.1186/s13059-018-1522-1.
 24. Jeong C, Balanovsky O, Lukianova E, Kahbatkyz N, Flegontov P, Zaporozhchenko V, et al. The genetic history of admixture across inner Eurasia. *Nature ecology & evolution*. 2019 Jun; 3 (6): 966–76. PubMed PMID: 31036896. DOI: 10.1038/s41559-019-0878-2.
 25. Balanovska EV, Cherevsky DK, Balanovsky OP. Svoeobrazie Novgorodskogo genofonda v kontekste narodonaseleniya evropejskoj chasti Rossii. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser.: Medicinskie nauki*. 2021; 124 (3): 51–57. DOI: 10.34680/2076-8052.2021. Russian.
 26. Balanovska EV, Petrushenko VS, Koshel SM, Pocheshhova EA, Cherevsky DK, Mirzaev KB, et al. Cartographic atlas of frequency variation for 45 pharmacogenetic markers in populations of Russia and its neighbor states. *Vestnik RGMU*. 2020; (6): 38–50. DOI: 10.24075/brsmu.2020.080.
 27. Balanovsky OP, Gorin IO, Zapisetskaya YS, Golubeva AA, Kostryukova ES, Balanovska EV. Interactions between gene pools of russian and finnish-speaking populations from Tver region: analysis of 4 million SNP markers. *Vestnik RGMU*. 2020; (6): 15–22. DOI: 10.24075/brsmu.2020.072.
 28. Balanovska EV, Zhabagin MK, Agdjoyan AT, Chuhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA, et al. Populyacionnye biobanki: principy organizatsii i perspektivy primeneniya v genogeografii i personalizirovannoj medicine. *Genetika*. 2016; 52 (12): 1371–87. DOI: 10.7868/S001667581612002X. Russian.
 29. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009 Sep; 19 (9): 1655–64. DOI: 10.1101/gr.094052.109.
 30. Koshel SM. Geoinformacionnye tekhnologii v genogeografii. V knige: *Sovremennaya geograficheskaya kartografiya*. M.: Data+, 2012; s. 158–166. Russian.
 31. Balanovsky OP. Genofond Evropy. M.: *Tovarishhestvo nauchnykh izdanij KMK*, 2015. Russian.

АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

Д. Г. Купцова¹✉, С. В. Петричук¹, Н. Н. Мурашкин^{1,2,3}, О. В. Курбатова¹, Т. В. Радыгина¹, А. А. Хотко², Р. А. Иванов¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия

² Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

Изменения в путях передачи внутриклеточных сигналов, влияющих на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе, могут объяснить сложный патогенез заболевания. Одним из путей передачи внутриклеточных сигналов является NF- κB , участвующий в регуляции большого количества провоспалительных генов и влияющий на продукцию провоспалительных цитокинов, непосредственно участвующих в развитии псориаза. Целью исследования было оценить число клеток с транслокацией NF- κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом в зависимости от тяжести заболевания и проводимой терапии. Обследовано 130 детей с вульгарным псориазом. В группу сравнения вошли 30 здоровых детей. Исследование проводили методом проточной цитометрии с визуализацией Amnis ImageStreamX. Показано, что число клеток с транслокацией NF- κB достоверно различалось в популяциях лимфоцитов как у детей с псориазом, так и в группе сравнения. У детей с псориазом выявлено повышение числа клеток с транслокацией NF- κB в популяциях Т-хелперов, T_{act}^+ , T_{reg}^+ и Th17 по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,05$). Число клеток с транслокацией NF- κB у детей с псориазом соотносится с тяжестью состояния по PASI ($R_{\text{mul}} = 0,32$), BSA ($R_{\text{mul}} = 0,31$) и длительностью заболевания ($p < 0,05$). Определение NF- κB может быть рассмотрено как дополнительный критерий оценки тяжести состояния у детей с псориазом. Показаны различия в степени снижения числа клеток с транслокацией NF- κB через сутки после введения биологической терапии (адалимумаб, этанерцепт, устекинумаб). Исследование активации NF- κB в популяциях клеток открывает перспективы понимания патогенетических механизмов воспаления и разработки новых методов лечения псориаза.

Ключевые слова: дети, вульгарный псориаз, PASI, BSA, лимфоциты, NF- κB , биологические препараты

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания Минздрава России, № темы АААА-А19-119013090093-2.

Благодарности: авторы выражают благодарность за активное сотрудничество всем участвовавшим пациентам и выражают признательность научным сотрудникам лаборатории иммунологии и вирусологии, а также врачам-дерматологам и медицинским сестрам отделения дерматологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей» г. Москва, Россия, принимавших участие в этом исследовании.

Вклад авторов: Д. Г. Купцова, С. В. Петричук — концепция и дизайн исследования, набор экспериментальных данных и анализ результатов, статистическая обработка данных, написание и редактирование рукописи; О. В. Курбатова, Т. В. Радыгина — набор экспериментальных данных, редактирование рукописи; Н. Н. Мурашкин, А. А. Хотко, Р. А. Иванов — анализ результатов, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» (протокол № 2 от 14 февраля 2020 г.), проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации, зарегистрировано в ClinicalTrials.gov ID: NCT04989296. Родители всех детей и подростков, участвовавших в исследовании, подписали добровольное информированное согласие на медицинское вмешательство в стационаре, обработку персональных данных и использование данных в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Дарья Геннадьевна Купцова
Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, г. Москва, 119296, Россия; dg.kuptsova@gmail.com

Статья получена: 11.02.2022 **Статья принята к печати:** 03.03.2022 **Опубликована онлайн:** 20.03.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.012

ACTIVITY OF NUCLEAR FACTOR κB IN LYMPHOCYTE POPULATIONS OF CHILDREN WITH PSORIASIS

Kuptsova DG¹✉, Petrichuk SV¹, Murashkin NN^{1,2,3}, Kurbatova OV¹, Radygina TV¹, Khotko AA², Ivanov RA¹

¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

² Central State Medical Academy of the Administrative Department of the President of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Alterations in intracellular signaling pathways affecting immune cell activation, proliferation and differentiation of keratinocytes in psoriasis could explain the complex pathogenesis of the disease. NF- κB is one of the intracellular signaling pathways, which is involved in regulation of numerous pro-inflammatory genes, and affects the synthesis of pro-inflammatory cytokines directly involved in the development of psoriasis. The study was aimed to assess the number of cells with NF- κB translocation in lymphocyte populations of children with psoriasis depending in the disease severity and therapy. A total of 130 children with psoriasis vulgaris were examined. The comparison group included 30 healthy children. The study was conducted using the imaging flow cytometry Amnis ImageStreamX system. It was found that there were significant differences in the number of cells with NF- κB translocation in the lymphocyte populations of both children with psoriasis and comparison group. Children with psoriasis had a higher number of cells with NF- κB translocation in the populations of T helper cells, T_{act}^+ , T_{reg}^+ , and Th17 compared to healthy children ($p < 0.05$). The number of cells with NF- κB translocation in children with psoriasis correlated with the disease severity PASI ($R_{\text{mul}} = 0.32$) and BSA ($R_{\text{mul}} = 0.31$) scores, as well as with the disease duration ($p < 0.05$). NF- κB determination could be considered an additional criterion for the disease severity assessment in children with psoriasis. The differences in the degree of reduction of the number of cells with NF- κB translocation 24 h after administration of biologics (adalimumab, etanercept, ustekinumab) have been shown. Studying NF- κB in cell populations offers the prospect of understanding pathogenetic mechanisms of inflammation and developing new therapeutic methods for psoriasis.

Keywords: children, psoriasis vulgaris, PASI, BSA, lymphocyte, NF- κB , biologics

Finding: the study was part of the state assignment for the Ministry of Health of the Russian Federation, № АААА-А19-119013090093-2.

Acknowledgements: the authors wish to thank all the patients for active cooperation and express their thanks to the researchers of the Laboratory of Immunology and Virology, as well as to dermatologists and nurses at the Dermatology Department, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia, who contributed to the study.

Author contribution: Kuptsova DG, Petrichuk SV — study concept and design, experimental data acquisition and analysis, statistical analysis, manuscript writing and editing; Kurbatova OV, Radygina TV — experimental data acquisition, manuscript editing; Murashkin NN, Khotko AA, Ivanov RA — data analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Children's Health (protocol № 2 dated February 14, 2020), conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, and registered with ClinicalTrials.gov ID: NCT04989296. Parents of all children and adolescents enrolled submitted the informed consent to medical intervention in hospital settings, personal data processing and the use of data for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Darya G. Kuptsova
Lomonosovsky prospect, 2, str. 1, Moscow, 119296; dg.kuptsova@gmail.com

Received: 11.02.2022 **Accepted:** 03.03.2022 **Published online:** 20.03.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.012

Псориаз является иммуноопосредованным воспалительным многофакторным заболеванием кожи со сложным патогенезом [1–3], обусловленным взаимодействием иммунной системы, локусов восприимчивости к псориазу, аутоантигенов псориаза и множества факторов окружающей среды [4]. Псориаз имеет различные клинические кожные проявления, по которым выделяют несколько форм заболевания. Самую распространенную форму — псориаз обыкновенный или вульгарный — выявляют в 90% случаев [5, 6]. Для псориаза характерны гиперпролиферация кератиноцитов, расширение кровеносных сосудов и воспалительная инфильтрация лейкоцитов в дерме, образование на коже бляшек [7].

Считается, что центральную роль в развитии воспаления кожи при псориазе играет синтез активированными Т-лимфоцитами провоспалительных цитокинов, запускающих патогенетический каскад [8]. Заболевание начинается с активации Т-лимфоцитов неизвестным антигеном или продуктом гена. После активации Т-клеток секретируется ряд провоспалительных цитокинов и хемокинов [9]. Действие цитокинов обуславливает пролиферацию кератиноцитов, гиперплазию эпидермиса, миграцию нейтрофилов, усиление реакции по пути Т-хелперов 1-го типа (Th1) [10]. Показано увеличение Т-хелперов 17-го типа (Th17) в крови и коже пациентов с псориазом во время прогрессирования кожного патологического процесса [11–13]. Также выявлено, что увеличение числа регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg}) в крови у пациентов с псориазом не приводит к подавлению воспалительной реакции из-за их функциональной несостоятельности [14, 15].

Сложный патогенез псориаза может быть объяснен изменением путей передачи внутриклеточных сигналов. Нарушение регуляции в путях передачи влияет на активацию иммунных клеток, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов при псориазе [16, 17]. Одним из путей передачи внутриклеточных сигналов является ядерный фактор κB (NF- κB), который впервые был открыт R. Sen и D. Baltimore в зрелых В-лимфоцитах [18]. NF- κB обладает свойством связываться с геном-промотором, кодирующим легкую цепь иммуноглобулинов карра. Ядерный фактор κB представляет собой семейство структурно связанных транскрипционных факторов, включая RelA (p65), NF- $\kappa B1$ (p50/p105), NF- $\kappa B2$ (p52/p100), c-Rel и RelB. Члены семейства NF- κB функционируют как различные гетеро- и гомодимеры (p50-p65; RelB-p100), за исключением RelB. NF- κB в основной активной форме представляет собой комплекс субъединицы p65 и субъединицы p50 или p52, которые связаны с белком-ингибитором I- κB [19]. Современный метод проточной цитометрии с визуализацией Amnis ImageStreamX позволяет оценить процент клеток с транслокацией NF- κB (% активированных клеток, в которых NF- κB локализуется в ядре) в различных популяциях [20, 21].

В физиологических условиях комплекс NF- κB /I- κB является саморегулирующейся системой [22]. Активация NF- κB наступает под влиянием широкого спектра стимулов [23]. Стимулирующий агент активизирует сигнальный путь NF- κB , что приводит к высвобождению NF- κB от ингибирующего комплекса и транслокации его из цитоплазмы в ядро клетки. NF- κB участвует в регуляции большого количества провоспалительных генов и влияет на продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IL1 β , IL6, IL8, TNF α , непосредственно участвующих в развитии псориаза [24–26].

Многочисленные исследования подтвердили нарушение регуляции путей передачи сигнала NF- κB при псориазе в экспериментальных моделях *in vitro*, моделях на животных, а также при изучении образцов биопсии кожи у больных псориазом [10, 25, 26]. Помимо этого, действие анти-TNF и гормональной терапии глюкокортикостероидами снижает уровень активного NF- κB и связанных с ним элементов пути передачи сигнала [27, 30]. Влияние других таргетных биологических препаратов на изменение числа клеток с транслокацией NF- κB в настоящее время находится на стадии изучения, однако хроническое ингибирование пути NF- κB может приводить к снижению эффективности терапии иммунозависимых заболеваний [28]. Таким образом, определение числа клеток с транслокацией NF- κB может быть перспективным инструментом в оценке тяжести состояния и эффективности проводимого лечения у пациентов с иммуноопосредованными заболеваниями. Целью данного исследования была оценка количества клеток с транслокацией NF- κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом в зависимости от тяжести заболевания и проводимой терапии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клинические характеристики пациентов

В исследование включено 130 детей и подростков с вульгарным псориазом, из которых 42 пациента были обследованы в динамике. В группу сравнения вошли 30 здоровых детей. Возраст обследованных детей составил 1–18 лет: псориаз — Me 12,5 [8,3; 15,5], группа сравнения — Me 12,4 [7,4; 16,1]. В группе детей с псориазом было 62 девочки и 68 мальчиков, в группе сравнения — 18 девочек и 12 мальчиков, все дети европейского происхождения. Критерии включения: установленный диагноз «вульгарный псориаз». Критерии исключения: другие формы псориаза, возраст старше 18 лет и невозможность получения образца крови.

Всем пациентам была проведена оценка тяжести псориаза по индексам PASI (Psoriasis Area and Severity Index) и BSA (Body Surface Area, %). Дети с псориазом получали разную патогенетическую терапию, согласно клиническим рекомендациям и степени тяжести псориаза. Детям назначали наружные кортикостероиды и эмоленты с кератолитическим действием ($n = 41$), системную терапию метотрексатом ($n = 28$), генно-инженерные биологические препараты (ГИБП; $n = 61$). Влияние ГИБП оценивали у 42 пациентов с псориазом до и через сутки после введения препаратов: адалимумаба ($n = 24$), этанерцепта ($n = 8$), устекинумаба ($n = 10$).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) использовали 5 мл цельной крови, взятой утром натощак в пробирки с ЭДТА и обрабатывали в тот же день. Цельную кровь разбавляли теплой средой RPMI-1640 без глутамата («ПанЭко»; Россия) в соотношении 1 : 3 и осторожно наслаивали на 2 мл среды Histopaque-1,077 г/см³ (Sigma-Aldrich; США), далее центрифугировали 20 мин при 2000 об./мин при комнатной температуре. Лейкоцитарное кольцо собирали в 15-миллиметровые пробирки Falcon (BD; США) и проводили отмывку средой

RPMI в течение 8 мин при тех же условиях. Затем аккуратно сливали надосадочную жидкость и разбавляли клетки средой RPMI-1640 до необходимого объема.

Имунофенотипирование лимфоцитов и оценка транслокации NF-κB из цитоплазмы в ядро

Для выделения клеточных популяций методом пошагового гейтирования использовали моноклональные антитела (MAT), меченные флуорохромами (Beckman Coulter; CSHA): CD19-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD (16/56)-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-ECD, CD4-PB, CD25 PE-Cy7. Оценку количества клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с визуализацией «Amnis ImageStream Mk II» (Luminex; CSHA), с применением набора «Amnis NF-κB Translocation Kit» (Luminex; CSHA), включающего конъюгированные антитела Anti-Hu NF-κB (p50) Alexa Fluor 488 для обнаружения NF-κB и ядерный краситель 7-AAD. В пробирки со 100 мкл PBMC добавляли по 10 мкл MAT и инкубировали 20 мин в темном месте, далее проводили анализ транслокации NF-κB согласно инструкции производителя. Исследовали следующие популяции клеток: CD3⁺ (T-лимфоциты); CD3⁺CD4⁺ (T-хелперы); CD3⁺CD8⁺ (цитотоксические T-лимфоциты); CD3⁺CD19⁺ (B-лимфоциты); CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (NK-клетки); CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (NKT-клетки); CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (незрелые T-лимфоциты); CD4⁺CD25⁺CD127^{high} (активированные T-хелперы, или T_{act}); CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (T_{reg}); CD4⁺CD161⁺CD3⁺ (Th17).

Запись и анализ данных на проточном цитофлуориметре ImageStream Mk II

Визуализацию и запись клеток выполняли на проточном цитофлуориметре ImageStream Mk II с использованием программного обеспечения INSPIRE™ (Luminex; CSHA) при 40-кратном увеличении и низкой скорости потока. Запись изображений для каждого образца включала не менее 20 000 событий в лимфоидном регионе для основных

популяций лимфоцитов и не менее 40 000 событий для популяций T_{reg}, T_{act} и Th17.

Собранные изображения анализировали с использованием программного обеспечения IDEAS® ImageStreamX (Luminex; CSHA) по алгоритму, представленному на рис. 1. Анализ данных начинали со спектральной компенсации в цифровом виде попиксельно для каждого изображения клеток. После компенсации проводили анализ одиночных клеток в хорошем фокусе и выделение одиночных событий (рис. 1Б, В). В исследуемой популяции лимфоцитов определяли процент двойных-позитивных клеток по интенсивности свечения NF-κB+/7-AAD+ (рис. 1Г, Д). На следующем этапе проводили оценку показателя подобия (Similarity), отражающего степень совместной локализации NF-κB и 7-AAD в исследуемой популяции клеток, независимо от морфологии (рис. 1Е). Показатель Similarity рассчитывали из коэффициента корреляции Пирсона, как описано ранее [20, 21].

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета программы Statistica 10.0 (StatSoft; CSHA). Описательная статистика количественных показателей представлена следующим образом: медиана (нижний и верхний квартили) — Me (Q_{0,25}; Q_{0,75}). Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для построения уравнений регрессии использовали метод множественной пошаговой регрессии с исключениями. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка популяций лимфоцитов с транслокацией NF-κB у детей с псориазом и в группе сравнения

Получено достоверное увеличение процента клеток с транслокацией NF-κB в популяциях T-хелперов ($p = 0,001$),

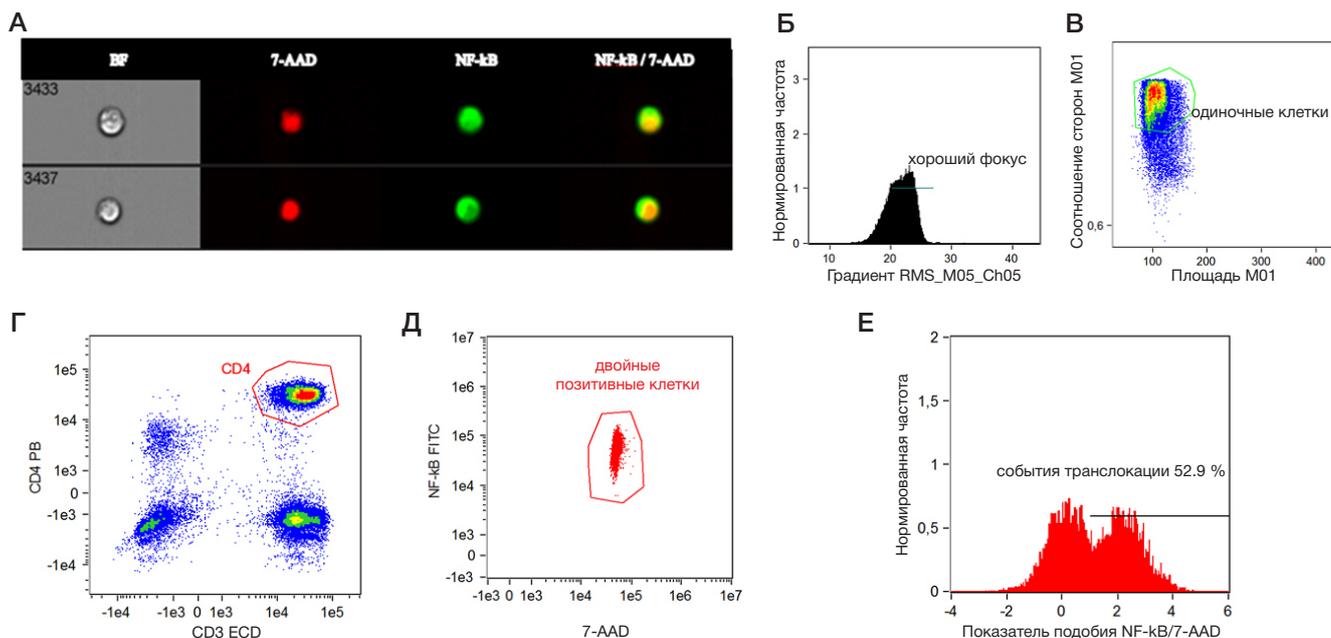


Рис. 1. Последовательность этапов анализа при оценке числа клеток с транслокацией NF-κB. **А.** Галерея записанных изображений клеток. **Б.** Выделение клеток в хорошем фокусе по параметру Gradient RMS. **В.** Выделение одиночных событий. **Г.** Выделение исследуемой популяции лимфоцитов, в частности CD3⁺CD4⁺ (CD3_ECD — канал 4; CD4_PB — канал 3). **Д.** Выделение двойных-позитивных клеток: NF-κB+/7-AAD+ (NF-κB_FITC — канал 2; 7-AAD — канал 5). **Е.** Выделение процента клеток с транслокацией NF-κB по параметру Similarity>1

Таблица 1. Число клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и в группе сравнения

Популяция	Пациенты с псориазом (n = 130)	Здоровые дети (n = 30)	p
В-лимфоциты	48,3 [38;64]	58,4 [40;72]	0,322
Т-лимфоциты	19,9 [17;26]	18,0 [16;21]	0,113
Т-хелперы	20,1 [17;26]	18,4 [14;20]	0,001
Цитотоксические Т-лимфоциты	18,0 [15;24]	17,2 [15;23]	0,402
Незрелые Т-лимфоциты	24,4 [18;36]	23,7 [19;33]	0,473
НК-клетки	28,0 [19;39]	29,9 [18;42]	0,829
НКТ-клетки	22,3 [16;34]	20,1 [17;25]	0,315
Активированные Т-хелперы	18,7 [15;24]	15,2 [14;18]	0,012
Регуляторные Т-лимфоциты	23,0 [19;32]	20,3 [16;26]	0,032
Т-хелперы 17 типа	20,7 [17;27]	19,6 [17;23]	0,034

Примечание: p — достоверность различий между группами, критерий Манна–Уитни.

T_{act} ($p = 0,012$), T_{reg} ($p = 0,032$) и $Th17$ ($p = 0,034$) у детей с псориазом по сравнению со здоровыми детьми (табл. 1). У детей с псориазом в популяциях Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, незрелых Т-лимфоцитов и НКТ-клеток наблюдалась тенденция к увеличению процента клеток с транслокацией NF-κB, тогда как в популяциях В-лимфоцитов и НК-клеток — к снижению. Наибольшее число клеток с транслокацией NF-κB было выявлено в популяции В-лимфоцитов как в группе детей с псориазом, так и в группе сравнения (табл. 1).

Проведенный анализ выявил различия в содержании клеток с транслокацией NF-κB в исследуемых популяциях у обследованных детей. Число клеток с транслокацией

NF-κB в популяции В-лимфоцитов было достоверно выше ($p = 0,000$), чем в НК-клетках, Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах, а в популяции НК-клеток достоверно выше ($p = 0,000$), чем в популяции Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов как у детей с псориазом, так и в группе сравнения, причем в 2,5 раза выше, чем в других популяциях клеток (табл. 1; рис. 2А). В группе здоровых детей число клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов одинаково ($p = 0,101$). В отличие от здоровых детей, у пациентов с псориазом выявлено увеличение процента клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Т-хелперов по сравнению с цитотоксическими Т-лимфоцитами ($p = 0,000$; рис. 2А).

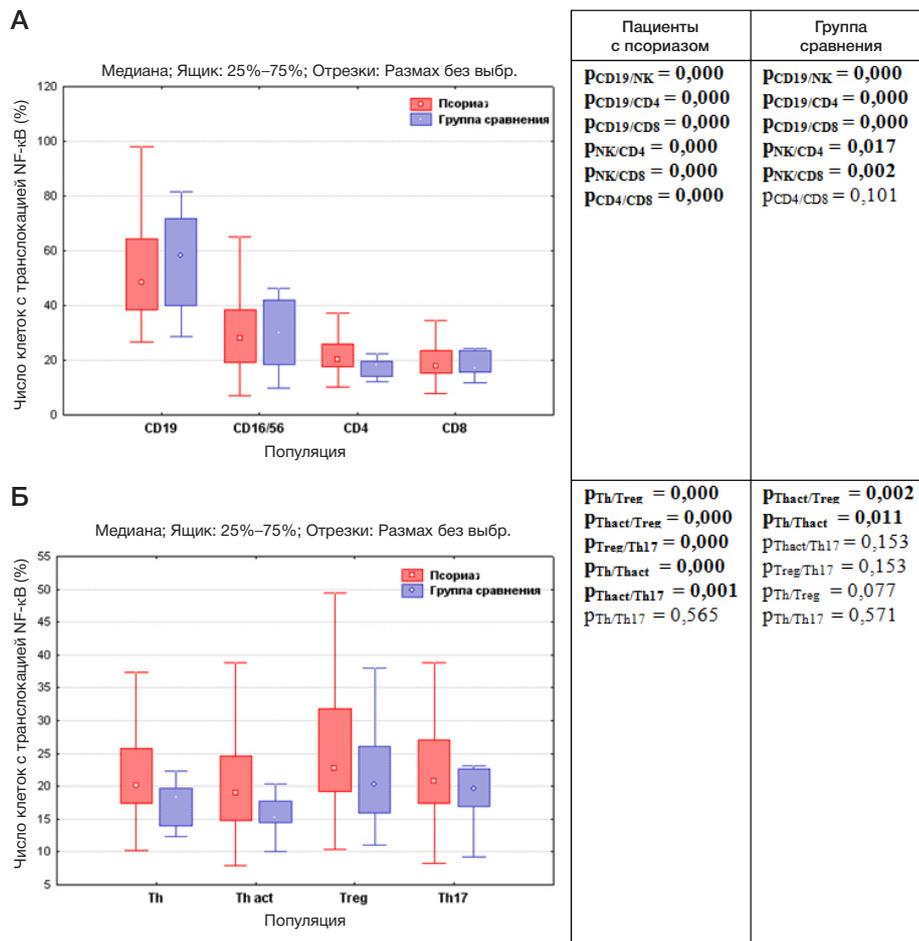


Рис. 2. Число основных (А) и малых (Б) популяций лимфоцитов, и НК-клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом и в группе сравнения. p — достоверность различий между популяциями, по критерию Уилкоксона для зависимых переменных

Таблица 2. Зависимость числа клеток с транслокацией NF-кВ в популяциях лимфоцитов от возраста детей и длительности заболевания псориазом

Популяция	Псориаз (n = 130)				Группа сравнения (n = 30) Возраст	
	Возраст		Длительность заболевания		r	p
	r	p	r	p		
В-лимфоциты	0,09	0,299	-0,02	0,796	0,25	0,182
Т-лимфоциты	0,21	0,016	0,21	0,22	0,28	0,142
Т-хелперы	0,22	0,011	0,21	0,022	0,25	0,194
Цитотоксические Т-лимфоциты	0,19	0,031	0,19	0,003	0,32	0,09
Незрелые Т-лимфоциты	0,2	0,028	0,21	0,021	0,24	0,214
NK-клетки	0,24	0,006	0,27	0,002	0,11	0,577
NKT-клетки	0,16	0,071	0,15	0,083	0,41	0,052
Активированные Т-хелперы	0,21	0,023	0,16	0,109	0,16	0,433
Регуляторные Т-лимфоциты	0,2	0,031	0,15	0,116	0,18	0,383
Т-хелперы 17-го типа	0,23	0,015	0,21	0,021	0,46	0,015

Примечание: r — коэффициент корреляции Пирсона, p — вероятность отличия регрессионных коэффициентов от 0.

В группе здоровых детей выявлено, что число клеток с транслокацией NF-кВ в популяциях Т-лимфоцитов, включая T_{reg} , Th17 и T_{act} в среднем составило 15–20%. Наибольший процент клеток с транслокацией NF-кВ отмечен в популяции T_{reg} (20% клеток, а наименьший — в популяции T_{act} (15% клеток; $p = 0,011$), разница между ними была достоверна ($p = 0,002$; рис. 2Б).

У детей с псориазом число клеток с транслокацией NF-кВ в популяциях T_{reg} , Th17 и T_{act} достоверно выше, чем в группе сравнения (табл. 1). Так же как и у здоровых детей, наибольший процент клеток с транслокацией NF-кВ отмечен в популяции T_{reg} (23% клеток) и был достоверно выше, чем в популяциях Т-хелперов, Th17 и T_{act} ($p = 0,000$;

рис. 2Б). Число T_{act} с транслокацией NF-кВ, так же как в группе здоровых детей, достоверно ниже, чем в популяции Т-хелперов ($p = 0,000$; рис. 2Б). В отличие от здоровых детей, число Th17 с транслокацией NF-кВ было достоверно выше, чем в популяции T_{act} ($p = 0,001$).

Зависимость числа клеток с транслокацией NF-кВ от возраста пациентов и длительности заболевания псориазом

Анализ зависимости количества клеток с транслокацией NF-кВ от возраста у здоровых детей не выявил корреляции во всех популяциях клеток, кроме Т-хелперов 17-го типа,

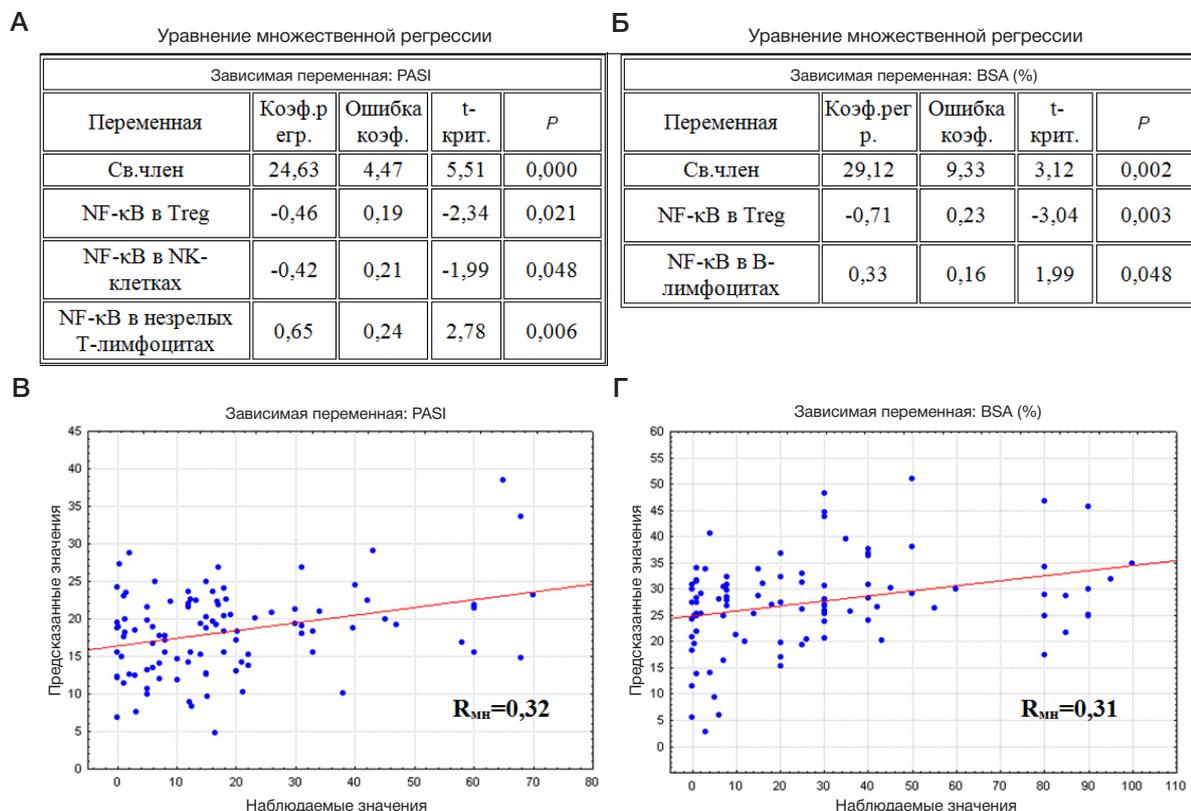


Рис. 3. Уравнение множественной регрессии индексов PASI (А) и BSA (Б) от числа клеток с транслокацией NF-кВ в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом и зависимость наблюдаемых от предсказанных значений, полученных по уравнению регрессии для PASI (В) и BSA (Г). Для построения уравнений регрессии использовали метод множественной пошаговой регрессии с исключениями. R_{mn} — множественный коэффициент корреляции R; p — достоверность отличия коэффициентов регрессии от 0

Таблица 3. Число клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом до и через сутки после введения ГИБП

Популяция	Число клеток с транслокацией NF-κB								
	Адалимумаб (n = 24)			Этанерцепт (n = 8)			Устекинумаб (n = 10)		
	до	после	p	до	после	p	до	после	p
В-лимфоциты	46,0 [39; 65]	38,2 [33; 45]	0,002	36,7 [33; 42]	28,0 [27; 31]	0,004	51,7 [35; 71]	44,8 [32; 51]	0,217
Т-лимфоциты	20,2 [17; 25]	19,5 [15; 21]	0,12	17,0 [16; 20]	17,6 [15; 19]	0,721	24,9 [18; 36]	18,2 [16; 25]	0,105
Т-хелперы	20,2 [18; 24]	18,3 [16; 21]	0,025	19,0 [18; 21]	17,5 [16; 19]	0,049	24,8 [19; 32]	19,6 [16; 25]	0,191
Цитотоксические Т-лимфоциты	19,2 [16; 24]	17,2 [15; 18]	0,021	16,30 [16; 18]	16,6 [15; 18]	0,99	23,9 [19; 35]	16,6 [14; 25]	0,052
Незрелые Т-лимфоциты	22,5 [16; 31]	21,2 [20; 38]	0,814	21,2 [19; 24]	19,2 [17; 23]	0,161	36,2 [30; 48]	21,4 [14; 30]	0,009
НК-клетки	27,7 [18; 32]	26,2 [19; 29]	0,574	30,6 [29; 36]	30,7 [27; 33]	0,721	37,9 [35; 42]	25,3 [17; 29]	0,018
НКТ-клетки	21,6 [15; 27]	19,7 [15; 24]	0,418	20,9 [18; 23]	18,4 [17; 21]	0,131	30,0 [26; 44]	24,7 [13; 31]	0,052
Активированные Т-хелперы	19,1 [16; 21]	17,1 [14; 20]	0,165	19,7 [16; 24]	14,3 [14; 16]	0,007	24,4 [17; 34]	16,4 [13; 24]	0,042
Регуляторные Т-лимфоциты	19,1 [16; 21]	20,5 [19; 23]	0,005	23,2 [19; 28]	19,4 [19; 21]	0,105	34,9 [22; 48]	21,5 [15; 29]	0,018
Т-хелперы 17-го типа	22,4 [18; 23]	18,5 [16; 21]	0,032	18,6 [18; 20]	17,2 [15; 18]	0,021	27,3 [27; 39]	19,1 [14; 25]	0,011

Примечание: p — достоверность различий между числом клеток с транслокацией NF-κB до и через сутки после введения ГИБП, критерий Манна-Уитни.

содержание которых увеличивалось с возрастом (табл. 2). У детей с псориазом при увеличении возраста пациентов увеличивается содержание клеток с транслокацией NF-κB во всех популяциях, за исключением В-лимфоцитов и НКТ-клеток. При увеличении длительности заболевания достоверно увеличивается число клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитах, незрелых Т-лимфоцитах, НК-клетках и Th17 (табл. 2). У детей с псориазом выявлена корреляционная зависимость длительности заболевания и возраста пациентов ($p = 0,000$): чем старше ребенок, тем дольше он болеет.

Зависимость содержания клеток с транслокацией NF-κB от тяжести псориаза у детей

У обследованных детей с псориазом проводили оценку индексов PASI и BSA. Тяжесть поражения кожного покрова псориазом у детей по PASI изменялась от 0 до 70% (Me 13,3 [5; 22]), а по BSA — от 0 до 100% (Me 20 [4; 40]).

Множественный корреляционный анализ зависимости тяжести псориаза от содержания клеток с транслокацией NF-κB показал увеличение индекса PASI при снижении количества T_{reg} и НК-клеток с транслокацией NF-κB и увеличении содержания незрелых Т-лимфоцитов с транслокацией ($R_{mn} = 0,32$; рис. 3А). Увеличение BSA наблюдается при снижении числа клеток с транслокацией NF-κB в популяции T_{reg} и увеличении в популяции В-лимфоцитов ($R_{mn} = 0,31$; рис. 3Б).

Оценка количества клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом при разных видах терапии

Сравнение содержания клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом при разных видах терапии не выявило достоверных различий между группами детей, проходивших разные виды терапии. Однако отклонения показателей от здоровых детей были наибольшими в группе детей на биологической терапии. Число клеток с транслокацией NF-κB в популяции Т-хелперов у детей, получавших наружную терапию, повысилось на 6%, в группе детей на метотрексате — на 10%, а в группе детей на биологической терапии — на 11,5% от уровня показателя здоровых детей. Число

клеток с транслокацией NF-κB в популяции В-лимфоцитов у пациентов на наружной терапии снизилось на 17%, на метотрексате — на 4%, а у детей на биологической терапии — на 29% относительно здоровых детей.

Для оценки влияния ГИБП на число клеток с транслокацией NF-κB обследовано 42 ребенка с псориазом до введения и через сутки после введения препаратов адалимумаб, этанерцепт, устекинумаб. Через сутки после введения адалимумаба получено достоверное снижение числа клеток с транслокацией NF-κB в популяциях В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, T_{reg} и Th17 (табл. 3).

При введении этанерцепта выявлено достоверное снижение числа клеток с транслокацией NF-κB в популяциях В-лимфоцитов, Т-хелперов, T_{act} и Th17. Показано достоверное снижение числа клеток с транслокацией NF-κB после введения устекинумаба в популяциях НК-клеток, незрелых Т-лимфоцитов, T_{act} , T_{reg} и Th17 (табл. 3).

Интересно отметить, что биологические препараты адалимумаб и этанерцепт через сутки после введения достоверно снижают число В-лимфоцитов с транслокацией NF-κB на 20,4 и 31% соответственно, тогда как введение устекинумаба незначительно снижает их число (табл. 3). Аналогичное снижение получено в популяции Т-хелперов при введении адалимумаба (на 10,4%) и этанерцепта (на 8,6%). Значимое изменение числа цитотоксических Т-лимфоцитов с транслокацией NF-κB наблюдалось после введения адалимумаба (табл. 3).

Число T_{act} с транслокацией NF-κB достоверно снижалось через сутки на введение этанерцепта (на 37,8%) и устекинумаба (на 48,7%) (табл. 3). Только введение устекинумаба влияло на снижение числа T_{reg} с транслокацией NF-κB на 62%, тогда как введение адалимумаба показало достоверное увеличение их числа на 6%. При введении всех биологических препаратов выявлено достоверное снижение числа Th17 с транслокацией NF-κB, при этом наибольшее снижение было отмечено при введении устекинумаба (на 42,9%), тогда как на введение адалимумаба и этанерцепта — на 21,1 и 8% соответственно (табл. 3).

Помимо этого, только введение устекинумаба снижало число клеток с транслокацией NF-κB в популяциях НК-клеток на 49,8% и незрелых Т-лимфоцитов на 69%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При псориазе наблюдаются изменения сигнальных путей, включая сигнальный путь NF-κB, JAK-STAT-сигнальный путь, сигнальные преобразователи янус-киназы и сигнальные пути Akt и Wnt [16, 17]. С помощью современной технологии ImageStreamX была проведена оценка числа клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом. Полученные нами данные о числе клеток с транслокацией NF-κB согласуются с данными других авторов: наибольшее число клеток с транслокацией NF-κB было выявлено в популяции В-лимфоцитов [18].

Наши исследования показали, что у детей с псориазом повышается число клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Т-хелперов, T_{reg} , T_{act} и Th17 по сравнению с показателями здоровых детей. Это может объяснить эффект активации сигнального пути NF-κB в данных клетках, ответственных за выработку провоспалительных цитокинов, непосредственно участвующих в патогенезе псориаза [24–26].

Выявлена прямая корреляционная зависимость числа клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом от возраста и длительности заболевания, у здоровых детей содержание клеток не изменялось с возрастом. Возможно, полученные нами данные зависимости числа клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом от возраста обусловлены прямой зависимостью длительности заболевания псориазом от возраста обследованных детей.

С увеличением тяжести псориаза у детей по PASI и BSA снижается количество T_{reg} с транслокацией NF-κB, что согласуется с сообщением других авторов о снижении функциональной активности T_{reg} при псориазе [27]. Данный факт подтверждает важность оценки функциональной активности T_{reg} , а не только их числа [14, 15]. Как один из факторов, регулирующих функциональную активность клеток, определение NF-κB можно рассматривать в

качестве дополнительного критерия оценки тяжести состояния у пациентов с псориазом.

Полученные нами результаты согласуются с данными о снижении активации NF-κB под действием анти-TNF терапии (адалимумаб) у взрослых пациентов с псориазом [28–30]. Наибольшее снижение числа клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом в популяциях НК-клеток, незрелых Т-лимфоцитов, T_{act} , T_{reg} и Th17 выявлено при использовании устекинумаба. Применение блокаторов TNFα и IL12/23 снижает число клеток с транслокацией NF-κB в разной степени в зависимости от популяции клеток и применяемой терапии. С учетом полученных данных и малоинвазивности способа оценки числа клеток с транслокацией NF-κB в цельной крови у детей с псориазом считаем данное направление исследования перспективным для диагностики тяжести заболевания и прогноза эффективности применяемой терапии.

ВЫВОДЫ

Выявлены достоверные различия между популяциями лимфоцитов по числу клеток с транслокацией NF-κB как у детей с псориазом, так и в группе сравнения. Показано повышение числа клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом в популяциях Т-хелперов, T_{act} , T_{reg} и Th17 по сравнению со здоровыми детьми. Число клеток с транслокацией NF-κB у детей с псориазом соотносится с тяжестью состояния и длительностью заболевания. Определение NF-κB можно рассматривать как дополнительный критерий оценки тяжести состояния у детей с псориазом. Через сутки после введения ГИБП число клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов снижается в разной степени и зависит от мишени антипсориазической терапии. Исследование активации NF-κB в популяциях клеток открывает перспективы понимания патогенетических механизмов воспаления и разработки новых методов лечения псориаза.

Литература

- Gisondi P, Bellinato F, Girolomoni G, Albanesi C. Pathogenesis of Chronic Plaque Psoriasis and Its Intersection With Cardio-Metabolic Comorbidities. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 117. DOI: 10.3389/fphar.2020.00117.
- Hugh JM, Weinberg JM. Update on the pathophysiology of psoriasis. *Cutis*. 2018; 102 (5S): 6–12.
- Смирнова С. В., Смольникова М. В. Иммунопатогенез псориаза и псориазического артрита. *Медицинская иммунология*. 2014; 16 (2): 127–38. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2014-2-127-138>.
- Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 140 (3): 645–53. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.07.004.
- Relvas M, Torres T. Pediatric Psoriasis. *Am J Clin Dermatol*. 2017; 18 (6): 797–811. DOI: 10.1007/s40257-017-0294-9.
- Tangtatco JAA, Lara-Corrales I. Update in the management of pediatric psoriasis. *Curr Opin Pediatr*. 2017; 29 (4): 434–42. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000517.
- Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016; 50 (3): 377–89. DOI: 10.1007/s12016-016-8535-x.
- Georgescu SR, Tampa M, Caruntu C, Sarbu MI, Mitran CI, Mitran MI, et al. Advances in Understanding the Immunological Pathways in Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (3): 739. DOI: 10.3390/ijms20030739.
- Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (1): 179. DOI: 10.3390/ijms19010179.
- Frischknecht L, Vecellio M, Selmi C. The role of epigenetics and immunological imbalance in the etiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019; 11: 1759720X19886505. DOI: 10.1177/1759720X19886505.
- Diani M, Altomare G, Reali E. T Helper Cell Subsets in Clinical Manifestations of Psoriasis. *J Immunol Res*. 2016; 2016: 7692024. DOI: 10.1155/2016/7692024.
- Solberg SM, Aarebrot AK, Sarkar I, Petrovic A, Sandvik LF, Bergum B, et al. Mass cytometry analysis of blood immune cells from psoriasis patients on biological therapy. *Eur J Immunol*. 2020. DOI: 10.1002/eji.202048857.
- Купцова Д. Г., Радыгина Т. В., Мурашкин Н. Н., Петричук С. В. Показатели клеточного иммунитета и клетки-супрессоры миелоидного происхождения у детей с псориазом. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2020; (3): 55–65. DOI: 10.14427/jipai.2020.3.55.
- Uttarkar S, Brembilla NC, Boehncke WH. Regulatory cells in the skin: Pathophysiologic role and potential targets for anti-inflammatory therapies. *J Allergy Clin Immunol*. 2019; 143 (4): 1302–10. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.12.1011.
- Zhang L, Li Y, Yang X, Wei J, Zhou S, Zhao Z, et al. Characterization of Th17 and FoxP3(+) Treg Cells in Paediatric Psoriasis Patients.

- Scand J Immunol. 2016; 83 (3): 174–80. DOI: 10.1111/sji.12404.
16. Lizzul PF, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Masud S, Dombrovskiy V, et al. Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. *J Invest Dermatol.* 2005; 124 (6): 1275–83. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23735.x.
 17. Woo YR, Cho DH, Park HJ. Molecular Mechanisms and Management of a Cutaneous Inflammatory Disorder: Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (12): 2684. DOI: 10.3390/ijms18122684.
 18. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1 (6): a001651. DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.
 19. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* 2013; 34 (6): 282–9. DOI: 10.1016/j.it.2013.01.004.
 20. George TC, Fanning SL, Fitzgerald-Bocarsly P, Medeiros RB, Highfill S, Shimizu Y, et al. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multispectral cellular images obtained in flow. *J Immunol Methods.* 2006; 311 (1–2): 117–29. DOI: 10.1016/j.jim.2006.01.018.
 21. Barteneva NS, Vorobjev IA. Imaging Flow Cytometry Methods and protocols. *Methods Mol Biol.* 2017; 178–88.
 22. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 621–63. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621.
 23. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem.* 2004; 279 (25): 26243–50. DOI: 10.1074/jbc.M403286200.
 24. Bhatt D, Ghosh S. Regulation of the NF- κ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front Immunol.* 2014; 5: 71. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00071.
 25. Moorchung N, Kulaar JS, Chatterjee M, Vasudevan B, Tripathi T, Dutta V. Role of NF- κ B in the pathogenesis of psoriasis elucidated by its staining in skin biopsy specimens. *Int J Dermatol.* 2014; 53 (5): 570–4. DOI: 10.1111/ijd.12050.
 26. Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2013; 69 (2): 89–94. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.11.002.
 27. Nussbaum L, Chen YL, Ogg GS. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *Br J Dermatol.* 2021; 184 (1): 14–24. DOI: 10.1111/bjd.19380.
 28. Luan L, Han S, Wang H, Liu X. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF- α treatment in psoriasis. *Int Immunopharmacol.* 2015; 29 (2): 278–84. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.11.005.
 29. Johansen C, Riis JL, Gedebjerg A, Kragballe K, Iversen L. Tumor necrosis factor α -mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor κ B. *J Biol Chem.* 2011; 286 (29): 25487–94. DOI: 10.1074/jbc.M111.240671.
 30. Andres-Ejarque R, Ale HB, Grys K, et al. Enhanced NF- κ B signaling in type-2 dendritic cells at baseline predicts non-response to adalimumab in psoriasis. *Nat Commun.* 2021; 1: 4741. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25066-9>.

References

1. Gisondi P, Bellinato F, Girolomoni G, Albanesi C. Pathogenesis of Chronic Plaque Psoriasis and Its Intersection With Cardio-Metabolic Comorbidities. *Front Pharmacol.* 2020; 11: 117. DOI: 10.3389/fphar.2020.00117.
2. Hugh JM, Weinberg JM. Update on the pathophysiology of psoriasis. *Cutis.* 2018; 102 (5S): 6–12.
3. Smirnova SV, Smolinikova MV. Immune Pathogenesis of Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Medical Immunology (Russia).* 2014; 16 (2): 127–138. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2014-2-127-138>.
4. Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 140 (3): 645–53. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.07.004.
5. Relvas M, Torres T. Pediatric Psoriasis. *Am J Clin Dermatol.* 2017; 18 (6): 797–811. DOI: 10.1007/s40257-017-0294-9.
6. Tangtato JAA, Lara-Corrales I. Update in the management of pediatric psoriasis. *Curr Opin Pediatr.* 2017; 29 (4): 434–42. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000517.
7. Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016; 50 (3): 377–89. DOI: 10.1007/s12016-016-8535-x.
8. Georgescu SR, Tampa M, Caruntu C, Sarbu MI, Mitran CI, Mitran MI, et al. Advances in Understanding the Immunological Pathways in Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (3): 739. DOI: 10.3390/ijms20030739.
9. Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (1): 179. DOI: 10.3390/ijms19010179.
10. Frischknecht L, Vecellio M, Selmi C. The role of epigenetics and immunological imbalance in the etiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2019; 11: 1759720X19886505. DOI: 10.1177/1759720X19886505.
11. Diani M, Altomare G, Reali E. T Helper Cell Subsets in Clinical Manifestations of Psoriasis. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 7692024. DOI: 10.1155/2016/7692024.
12. Solberg SM, Aarebrot AK, Sarkar I, Petrovic A, Sandvik LF, Bergum B, et al. Mass cytometry analysis of blood immune cells from psoriasis patients on biological therapy. *Eur J Immunol.* 2020. DOI: 10.1002/eji.202048857.
13. Kuptsova D, Radygina T, Murashkin N, Petrichuk SV. Indicators of cellular immunity and suppressor cells of myeloid origin in children with psoriasis. *J Immunopathology, allergology, infectology.* 2020; 3: 55–65. doi: 10.14427/jipai.2020.3.55.
14. Uttarak S, Brembilla NC, Boehncke WH. Regulatory cells in the skin: Pathophysiologic role and potential targets for anti-inflammatory therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2019; 143 (4): 1302–10. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.12.1011.
15. Zhang L, Li Y, Yang X, Wei J, Zhou S, Zhao Z, et al. Characterization of Th17 and FoxP3(+) Treg Cells in Paediatric Psoriasis Patients. *Scand J Immunol.* 2016; 83 (3): 174–80. DOI: 10.1111/sji.12404.
16. Lizzul PF, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Masud S, Dombrovskiy V, et al. Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. *J Invest Dermatol.* 2005; 124 (6): 1275–83. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23735.x.
17. Woo YR, Cho DH, Park HJ. Molecular Mechanisms and Management of a Cutaneous Inflammatory Disorder: Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (12): 2684. DOI: 10.3390/ijms18122684.
18. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1 (6): a001651. DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.
19. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* 2013; 34 (6): 282–9. DOI: 10.1016/j.it.2013.01.004.
20. George TC, Fanning SL, Fitzgerald-Bocarsly P, Medeiros RB, Highfill S, Shimizu Y, et al. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multispectral cellular images obtained in flow. *J Immunol Methods.* 2006; 311 (1–2): 117–29. DOI: 10.1016/j.jim.2006.01.018.
21. Barteneva NS, Vorobjev IA. Imaging Flow Cytometry Methods and protocols. *Methods Mol Biol.* 2017; 178–88.
22. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 621–63. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621.
23. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem.* 2004; 279 (25): 26243–50. DOI: 10.1074/jbc.M403286200.
24. Bhatt D, Ghosh S. Regulation of the NF- κ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front Immunol.* 2014; 5: 71. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00071.

25. Moorchung N, Kulaar JS, Chatterjee M, Vasudevan B, Tripathi T, Dutta V. Role of NF- κ B in the pathogenesis of psoriasis elucidated by its staining in skin biopsy specimens. *Int J Dermatol*. 2014; 53 (5): 570–4. DOI: 10.1111/jjd.12050.
26. Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2013; 69 (2): 89–94. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.11.002.
27. Nussbaum L, Chen YL, Ogg GS. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *Br J Dermatol*. 2021; 184 (1): 14–24. DOI: 10.1111/bjd.19380.
28. Luan L, Han S, Wang H, Liu X. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF- α treatment in psoriasis. *Int Immunopharmacol*. 2015; 29 (2): 278–84. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.11.005.
29. Johansen C, Riis JL, Gedebjerg A, Kragballe K, Iversen L. Tumor necrosis factor α -mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor κ B. *J Biol Chem*. 2011; 286 (29): 25487–94. DOI: 10.1074/jbc.M111.240671.
30. Andres-Ejarque R, Ale HB, Grys K, et al. Enhanced NF- κ B signaling in type-2 dendritic cells at baseline predicts non-response to adalimumab in psoriasis. *Nat Commun*. 2021; 1: 4741. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25066-9>.

ВЛИЯНИЕ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНЫ ОТ COVID-19 НА ПРОФИЛЬ АУТОАНТИТЕЛ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

А. А. Довгань ✉, Ю. С. Драпкина, Н. В. Долгушина, И. В. Менжинская, Л. В. Кречетова, Г. Т. Сухих

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

Один из механизмов негативного влияния вакцин на репродуктивное здоровье женщин носит аутоиммунный характер. Целью работы было оценить влияние иммунизации отечественной комбинированной векторной вакциной для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, на уровень аутоантител и гормонов, отражающих овариальный резерв, и связь между ними у женщин репродуктивного возраста. В проспективное исследование было включено 120 женщин в возрасте 18–49 лет, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак. Овариальный резерв определяли перед вакцинацией и через 90 дней после введения первого компонента. С помощью ИФА изучали профиль антифосфолипидных антител, антител к ядерным антигенам, антигенам щитовидной железы, антиовариальных, антитрофобластических антител, к зоне пеллюцида, ФСГ, прогестерону. После вакцинации не обнаружено повышения уровня аутоантител, за исключением анти-ФЭ IgM и анти-дсДНК IgG-антител, которое носило транзитный характер. Доля позитивных женщин до вакцинации составляла 70,8%, после вакцинации — 75%. Не выявлено корреляционной связи между уровнем аутоантител и гормонов, отражающих овариальный резерв. Согласно результатам, вакцинация Гам-КОВИД-Вак не оказывает негативного влияния на овариальный резерв, не вызывает развития аутоиммунных реакций и ассоциированного с ними снижения репродуктивного потенциала у женщин.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), репродукция, профиль аутоантител

Финансирование: работа выполнена при поддержке благотворительного фонда «Вклад в будущее» в рамках программы-акции «Остановим корона-вирус вместе».

Вклад авторов: А. А. Довгань, Ю. С. Драпкина — ведение пациенток, принимающих участие в исследовании, написание статьи; Н. В. Долгушина — сбор и анализ литературных данных, редактирование рукописи, статистический анализ данных; И. В. Менжинская, Л. В. Кречетова — выполнение лабораторной части исследования, редактирование рукописи; Г. Т. Сухих — редактирование и утверждение рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 12 от 26 ноября 2020 г.); все пациентки подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Анатольевна Довгань
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117198, Россия; lina.dovgan@gmail.com

Статья получена: 30.03.2022 **Статья принята к печати:** 14.04.2022 **Опубликована онлайн:** 21.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.016

EFFECTS OF COVID-19 VECTOR VACCINE ON AUTOANTIBODY PROFILE IN REPRODUCTIVE AGE WOMEN

Dovgan AA ✉, Drapkina YuS, Dolgushina NV, Menzhinskaya IV, Krechetova LV, Sukhikh GT

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

Autoimmune mechanisms have been implicated in the negative effects of vaccines on female reproductive health. This study evaluates the endogenous levels of self-reactive antibodies and ovarian reserve-associated hormones before and after immunization with the domestically developed Gam-COVID-Vac combined vector vaccine to check for possible reproductive sequelae. The prospective study enrolled 120 women aged 18–49, subject to vaccination with Gam-COVID-Vac. Ovarian reserve was assessed prior to vaccination and 90 days after the first component injection. Profiles of specific antibodies to self-antigens, including phospholipids, nuclear antigens, FSH, progesterone, and also thyroid, ovarian, trophoblast, and zona pellucida antigens, were assessed at the same time points by enzyme immunoassay. Overall, the vaccination had no effect on the levels of ovarian reserve-associated hormones and autoantibodies, apart from a transient increase in positivity for anti-phosphatidylethanolamine IgM and anti-dsDNA IgG. Seroprevalence of elevated serum autoantibodies constituted 70.8% before and 75% after vaccination. According to the results, immunization with Gam-COVID-Vac does not affect ovarian reserve or autoimmune status, thus being safe for the female reproductive potential.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Gam-COVID-Vac (Sputnik V) vaccine, reproduction, autoantibody profile

Funding: the study was supported by the “Investment to the Future” Sberbank Charitable Foundation within the framework of “Stop the Coronavirus Together” initiative.

Author contributions: Dovgan AA, Drapkina YuS — patient management, manuscript writing; Dolgushina NV — literature research, manuscript editing, statistical analysis; Menzhinskaya IV, Krechetova LV — laboratory research, manuscript editing; Sukhikh GT — conclusive editing and approval of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Protocol No. 12 of November 26, 2020). All participants provided informed consent for the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina A. Dovgan
Oparina, 4, Moscow, 117198, Russia; lina.dovgan@gmail.com

Received: 30.03.2022 **Accepted:** 14.04.2022 **Published online:** 21.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.016

Действие большинства вакцин от COVID-19 основано на выработке иммунного ответа против вирусного гликопротеина S (Spike) SARS-CoV-2 [1]. В настоящее время зарегистрировано несколько видов вакцин от COVID-19: цельные инактивированные вакцины, комбинированные векторные вакцины, содержащие рекомбинантные аденовирусные частицы и ген S-белка SARS-CoV-2, мРНК-вакцины и рекомбинантные белковые вакцины. Первой в мире зарегистрированной вакциной

от COVID-19, одобренной Минздравом России, стала комбинированная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), включающая аденовирусный вектор со встроенным фрагментом генетического материала SARS-CoV-2, содержащим информацию о структуре S-белка шипа вируса [2]. С появлением вакцин от COVID-19 и их повсеместным масштабным применением возрос интерес к изучению влияния этих вакцин на репродуктивное здоровье человека [3–7].

В ранее проведенных исследованиях воздействия вакцин от других инфекционных заболеваний на животных и человека были получены данные о потенциальном негативном влиянии адьювантных вакцин на репродуктивную функцию путем запуска аутоиммунных процессов [8]. Точный механизм действия многих адьювантов до конца не изучен. Предполагается, что адьюванты повышают врожденные иммунные ответы путем имитирования эволюционно консервативных молекул, например липополисахаридов (ЛПС), и связывания с Толл-подобными рецепторами (англ. toll-like receptor, TLR), повышают активность дендритных клеток, лимфоцитов, макрофагов и активируют внутриклеточную систему инфламасом, продукцию провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул, важных для представления антигена [9].

При нормальном иммунном ответе могут развиваться аутоиммунные реакции с участием различных механизмов: вовлечением криптоэпитопов с последующей активацией аутореактивных Th1-клеток; распространением эпитопов, основанным на повреждении и высвобождении аутоантигенов во время воспаления, в результате распространения иммунного ответа и вовлечения эпитопов аутоантигенов; молекулярной мимикрией, основанной на сходстве между чужеродными и собственными антигенными эпитопами, что приводит к активации перекрестно-реактивных Т-клеток и неспецифической активации аутореактивных Th1-клеток через Т-клеточный рецептор (англ. TCR) — зависимые и независимые механизмы [9]. В 2011 г. был впервые введен термин «аутоиммунный / воспалительный синдром, индуцированный адьювантами» (англ. autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants, ASIA) [10]. По данным метаанализа, с 2016 по 2019 г. в мире было зарегистрировано 500 случаев синдрома ASIA, который наиболее часто наблюдали при применении вакцин от гепатита В, гриппа и ВПЧ [11].

В другом метаанализе оценка зависимости развития системной красной волчанки (СКВ) и ревматоидного артрита от вакцинации показала, что вакцинация значительно увеличивает риск возникновения СКВ [12], при которой у женщин часто можно наблюдать развитие аутоиммунного оофорита, и, как следствие, преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ). Показано, что бесплодие может быть вторичным состоянием на фоне развития ревматических заболеваний. Кроме того, у трети женщин с СКВ развивается антифосфолипидный синдром (АФС), проявляющийся рецидивирующей потерей плода, тромбозом, тромбозом, тромбозом и персистенцией антифосфолипидных антител (АФА). Было доказано, что молекулярная мимикрия, основанная на гомологии экзогенных агентов и аутоантигенов, является одним из механизмов, ответственных за развитие АФС. Например, IgM-антитела, вырабатываемые после введения столбнячного анатоксина, взаимодействуют как с токсинном, так и с кардиолипином через β 2-гликопротеин-1 (β 2-ГП-1) [13].

Следует отметить, что вакцина Гам-КОВИД-Вак является комбинированной векторной вакциной и не содержит адьюванты. В рамках данного исследования были опубликованы предварительные данные по влиянию вакцины Гам-КОВИД-Вак на уровень АФА классов М и G к кардиолипину (анти-КЛ), β 2-ГП-1 (анти- β 2-ГП-1), аннексину V (анти-АнV), фосфатидилсерину (анти-ФС). По результатам, полученным при обследовании 51 вакцинированной женщины, вакцинация Гам-КОВИД-Вак

(Спутник V) не вызывала повышения уровня изученных АФА [6]. При этом не было выявлено корреляционной связи между уровнем АФА, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и антимюллерова гормона (АМГ), что косвенно свидетельствовало об отсутствии негативного влияния вакцинации, опосредованного запуском продукции данных аутоантител, на репродуктивную функцию женщин.

Однако для более полного изучения безопасности вакцинации от COVID-19 для репродуктивного здоровья женщин возникла необходимость проведения исследования широкого спектра аутоантител, участвующих в развитии ряда системных аутоиммунных заболеваний, до и после вакцинации на более репрезентативной выборке пациенток репродуктивного возраста.

Целью настоящего исследования было оценить влияние иммунизации отечественной комбинированной векторной вакциной против коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, на уровень аутоантител и гормонов, отражающих овариальный резерв, и связь между ними у женщин репродуктивного возраста.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проспективное исследование проводили на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» (Москва, Россия). Пациенток ($n = 120$) отбирали в период с декабря 2020 г. по декабрь 2021 г.; всем им была проведена иммунизация комбинированной векторной вакциной Гам-КОВИД-Вак для профилактики новой коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Критерии включения в исследование: возраст 18–49 лет; сохраненная менструальная функция; отрицательный результат исследования на РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР, отрицательные результаты тестов на антитела классов М и G к SARS-CoV-2 (перед вакцинацией); отсутствие в анамнезе заболевания COVID-19; отсутствие контакта с заболевшими COVID-19 в течение не менее 14 дней до начала исследования. Критерии невключения: противопоказания к вакцинации согласно инструкции к препарату; беременность и период лактации; острые воспалительные и инфекционные заболевания; ревматические болезни; онкологические заболевания любой локализации; гормональная терапия, влияющая на менструальный цикл; иммуномодулирующая терапия или вакцинация в течение последних трех месяцев до включения в исследование. В исследование не были включены женщины с выраженным снижением овариального резерва (ФСГ > 12 мМЕ/мл и количество антральных фолликулов (КАФ) менее шести в обоих яичниках), а также пациентки с морбидным ожирением (индекс массы тела (ИМТ) $\geq 40,0$ кг/м²). Критерии исключения: COVID-19 в период вакцинации; серьезные побочные эффекты иммунизации, требующие отмены введения второго компонента вакцины; отказ пациентки от дальнейшей вакцинации.

Обследование пациенток проводили дважды: перед вакцинацией и через 90–100 дней после введения первого компонента вакцины. У пациенток с повышением уровня аутоантител выше референсных значений (РЗ) было проведено дополнительное исследование их уровня через шесть месяцев после введения первого компонента вакцины. Уровень ФСГ и АМГ определяли в сыворотке крови с помощью электрохемилюминесцентного метода на второй–пятый день менструального цикла.

До и после вакцинации с помощью иммуноферментного анализа анализировали уровни аутоиммунных антител:

антифосфолипидных (классов М, G) критериальных (анти-КЛ и анти- β 2-ГП-I) и некритериальных антител (анти-АнV, анти-ФС) — с помощью специальных наборов (ORGENTEC Diagnostika GmbH; Германия), фосфатидилэтаноламин (анти-ФЭ) и комплекса фосфатидилсерин/ протромбин (анти-ФС/ПТ) — с использованием наборов (AESKU Diagnostics; Германия); к ядерным антигенам класса G (антиядерных антител (АНА), антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК), рибонуклеопротеину RNP-70 (анти-RNP-70), к цитоплазматическим антигенам SS-A(Ro) (анти-SS-A) и SS-B(La) (анти-SS-B)) — с помощью наборов (ORGENTEC Diagnostika; GmbH); антител к антигенам щитовидной железы класса G (к тиреоглобулину (анти-ТГ) и тиреопероксидазе (анти-ТПО)) — с использованием наборов (ORGENTEC Diagnostika GmbH; Германия) к рецептору ТТГ (анти-рТТГ) — с помощью набора (Medipan GmbH; Германия); органоспецифичных антител класса G к трофобласту (анти-ТБ) и зоне пеллюцида (анти-ZP) — с помощью набора (QAYEE-BIO for Life Science; Китай), овариальным антигенам (анти-ОВ) — с помощью набора (DRG, Германия); антител классов М и G к гормонам ФСГ (анти-ФСГ) и прогестерону (анти-ПГ) с использованием реагентов (ХЕМА; Россия).

Пациенток вакцинировали согласно методическим рекомендациям Минздрава России [14]. Подготовку вакцины к использованию осуществляли в строгом соответствии с официальной инструкцией к препарату.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью таблиц «Microsoft Excel» и пакета статистической программы «Statistica V10» (ПБСО; США). Для оценки качественных данных вычисляли доли (%). Для сравнения связанных бинарных данных в одной группе пациентов до и после вакцинации использовали критерий Мак-Немара. Для анализа количественных данных в группах сравнения определяли вид распределения данных (тест Колмогорова–Смирнова; графический анализ данных). Так как распределение данных не соответствовало нормальному, применяли методы непараметрической статистики: определяли медианы с интерквартильным размахом (Me (Q25–Q75)), критерий знаков (Sign тест) для сравнения связанных непараметрических данных в связанных совокупностях. Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Таблица 1. Уровень антифосфолипидных антител в сыворотке крови у женщин до и после вакцинации

Параметр	Референсные значения	До вакцинации	Через 90 дней после вакцинации	Значение p
анти-КЛ IgM, Ед/мл	< 7 Ед/мл	2,2 (1,4–3,5)	2,3 (1,7–3,1)	0,575
Анти-КЛ IgG, Ед/мл	< 10 Ед/мл	2,9 (2,0–4,1)	2,4 (1,8–3,3)	< 0,001
анти- β 2-ГП-1 IgM, Ед/мл	< 5 Ед/мл	2,6 (1,7–3,5)	2,3 (1,7–3,2)	0,022
анти- β 2-ГП-1 IgG, Ед/мл	< 5 Ед/мл	1,8 (1,3–2,9)	1,7 (1,3–2,3)	0,003
анти-АнV IgM, Ед/мл	< 5 Ед/мл	2,9 (2,2–4,1)	3,4 (2,6–4,4)	< 0,001
анти-АнV IgG, Ед/мл	< 5 Ед/мл	2,3 (1,7–3,0)	4,0 (2,2–4,8)	< 0,001
анти-ФС IgM, Ед/мл	< 10 Ед/мл	2,5 (1,8–3,4)	2,5 (1,9–3,2)	0,63
анти-ФС IgG, Ед/мл	< 10 Ед/мл	2,6 (2,0–3,4)	3,5 (2,8–4,6)	< 0,001
анти-ФЭ IgM, Ед/мл	< 12 Ед/мл	5,2 (2,6–10,4)	6,1 (3,4–13,4)	< 0,001
анти-ФЭ IgG, Ед/мл	< 12 Ед/мл	1,0 (1,0–1,3)	1,5 (1,2–2,1)	< 0,001
анти-ФС/ПТ IgM, Ед/мл	< 12 Ед/мл	1,9 (1,3–2,8)	1,9 (1,3–3,2)	0,949
анти-ФС/ПТ IgG, Ед/мл	< 12 Ед/мл	2,3 (1,7–3,3)	2,8 (1,9–3,7)	0,002

Примечание: Me (X–Y), Sign тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 33 года. Средний ИМТ — 22,4 кг/м². Все участники исследования соответствовали критериям включения, распространенность гинекологических заболеваний не превышала 10%, из соматических заболеваний наиболее часто встречались аллергические заболевания (у 30% пациенток). Овариальный резерв оценивали на основании определения уровней ФСГ, АМГ и КАФ до и после вакцинации. Значимых изменений гормональных параметров и КАФ у наблюдаемых пациенток не отмечено. Средние значения с интерквартильным размахом всех исследуемых гормонов были в пределах РЗ, а число пациенток с повышением уровня ФСГ выше РЗ и снижением уровня АМГ ниже РЗ не различалось до и после вакцинации.

Исследование сывороточного уровня антифосфолипидных антител выявило снижение среднего уровня критериальных антител и повышение среднего уровня некритериальных антител класса G (табл. 1).

У 30 (25%) женщин уровень АФА был изначально выше РЗ. После вакцинации повышенный уровень АФА был отмечен у 28 (23,3%) женщин (табл. 2). Наиболее часто наблюдалось повышение анти-ФЭ IgM (у 20 (16,7%) женщин). У 7 (5,8%) женщин повышенный уровень АФА был впервые диагностирован после вакцинации, у 9 (7,5%) женщин изначально повышенный уровень АФА достиг нормального уровня после вакцинации. У 2 (1,7%) женщин с аутоиммунным тиреоидитом и аллергическими заболеваниями в анамнезе после вакцинации была найдена персистенция АФА. Следует отметить, что у обеих пациенток параметры овариального резерва соответствовали нормальным значениям, и не снижались после вакцинации.

Для оценки связи динамики АФА и гормонов были заданы дельты (Δ) данных параметров. Положительное значение Δ всегда свидетельствовало о негативном тренде, например, Δ АМГ = АМГ1–АМГ2, Δ ФСГ = ФСГ2–ФСГ1 (рис. 1). Слабая отрицательная корреляционная связь была отмечена лишь между повышением уровня АМГ на фоне повышения уровня анти-ФС/ПТ IgM-антител, что не имеет клинического значения.

У 7 пациенток с повышением уровня АФА выше РЗ во второй точке исследования при повторном определении,

Таблица 2. Частота выявления АФА с уровнем выше референсных значений у женщин до и после вакцинации

Параметр	До вакцинации	Через 90 дней после вакцинации	Значение <i>p</i>
анти-КЛ IgM, Ед/мл	4 (3,3%)	4 (3,3%)	0,683
анти-КЛ IgG, Ед/мл	4 (3,3%)	1 (0,8%)	0,248
анти-β2-ГП-1 IgM, Ед/мл	0	1 (0,8%)	–
анти-β2-ГП-1 IgG, Ед/мл	4 (3,3%)	2 (1,7%)	0,479
анти-АнV IgM, Ед/мл	3 (2,5)	5 (4,2%)	0,723
анти-АнV IgG, Ед/мл	3 (2,5)	3 (2,5)	0,617
анти-ФС IgM, Ед/мл	1 (0,8%)	1 (0,8%)	1
анти-ФС IgG, Ед/мл	0	1 (0,8%)	–
анти-ФЭ IgM, Ед/мл	15 (12,5%)	20 (16,7%)	0,043
анти-ФЭ IgG, Ед/мл	0	2 (1,7%)	–
анти-ФС/ПТИgM, Ед/мл	1 (0,8%)	0	–
анти-ФС/ПТИgG, Ед/мл	0	1 (0,8%)	–
Наличие хотя бы одного АФА выше РЗ	30 (25%)	28 (23,3%)	0,802

Примечание: *p* — критерий Мак-Немара, РЗ — референсные значения.

проведенном через шесть месяцев после введения первого компонента вакцины, уровень всех АФА был в пределах РЗ.

Таким образом, средние значения и интерквартильные интервалы АФА находились в пределах РЗ. После вакцинации не выявлено значимого увеличения частоты обнаружения АФА с уровнем выше РЗ, за исключением анти-ФЭ IgM-антител. У пациенток, у которых отмечен рост уровня АФА во второй точке исследования выше РЗ, при повторном исследовании через три месяца он был в пределах РЗ. Не выявлена корреляционная связь между динамикой уровня гормонов, отражающих овариальный резерв яичников, и динамикой уровня АФА.

Кроме АФА исследовали уровень аутоантител другой специфичности (органоспецифичных, антинуклеарных, антител к гормонам) до и после вакцинации (табл. 3). После вакцинации отмечено как снижение, так и повышение уровня аутоантител разной специфичности: значимо снизились средние уровни анти-ФСГ IgM, анти-рТТГ IgG, АНА IgG, анти-SS-A IgG, анти-RNP-70 IgG, в то же время повысились средние уровни анти-ТБ IgG, анти-ОВ IgG, анти-ПГ IgG, анти-SS-B IgG и анти-дсДНК IgG.

Данные тренды непоказательны, так как у большинства женщин уровень аутоантител находился в пределах РЗ, несмотря на их колебания в сторону как повышения, так и снижения. Более показательна оценка числа пациенток с уровнем аутоантител выше РЗ (табл. 4). Доля женщин

с позитивностью хотя бы на один вид аутоантител до вакцинации составила 70,8%, после вакцинации — 75%. Доля женщин с повышенным уровнем не менее двух видов аутоантител до вакцинации была 38,3%, после вакцинации — 45,8%. Следует также отметить, что после вакцинации снизилось число женщин с повышенным уровнем анти-ПГ и анти-ФСГ IgM-антител и увеличилось число женщин с повышенным уровнем IgG-антител этой специфичности. Единственным видом аутоантител, которые обнаруживали значимо чаще у женщин после вакцинации по сравнению с периодом до вакцинации, были анти-дсДНК IgG-антитела, при этом их уровень у большей части женщин незначительно превышал РЗ.

Не было выявлено значимой корреляционной связи между изменением до и после вакцинации уровней гормонов и аутоантител к экстрагируемым ядерным антигенам, антигенам щитовидной железы, трофобласта, яичников и гормонов (рис. 2).

Таким образом, персистенция аутоантител в сыворотке крови у женщин является достаточно частым явлением. После вакцинации у женщин было отмечено значимое повышение сывороточного уровня только анти-дсДНК IgG-антител. У пациенток, у которых отмечался подъем уровня аутоантител во второй точке исследования выше РЗ, через шесть месяцев после введения первого компонента вакцины

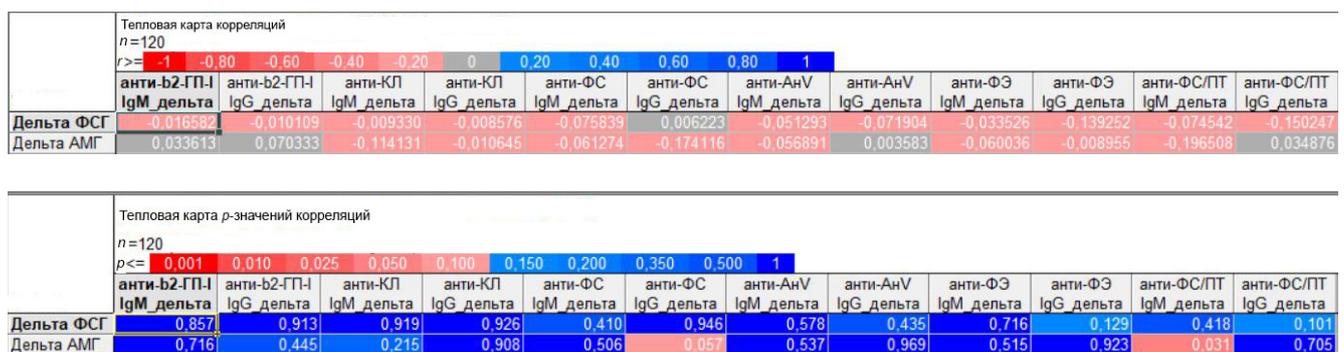


Рис. 1. Корреляционные связи между изменением уровня гормонов и антифосфолипидных антител в крови у женщин до и после вакцинации (ΔФСГ и ΔАМГ с ΔАФА)

Таблица 3. Уровень сывороточных аутоантител у женщин до и после вакцинации

Параметр	Референсные значения	До вакцинации	Через 90 дней после вакцинации	Значение <i>p</i>
анти-ZP IgG	< 250 нг/мл	156,0 (126,5–183,5)	157,0 (133,7–218,2)	0,114
анти-ТБ IgG	< 150 нг/мл	101,7 (84,0–117,0)	127,2 (106,0–137,2)	< 0,001
анти-ОВ IgG	< 10 Ед/мл	4,0 (3,3–5,1)	4,8 (4,0–5,7)	< 0,001
анти-ПГ IgM	< 0,4 ед. ОП	0,28 (0,22–0,40)	0,29 (0,23–0,35)	0,302
анти-ПГ IgG	< 0,4 ед. ОП	0,28 (0,21–0,37)	0,33 (0,25–0,44)	0,002
анти-ФСГ IgM, ед. ОП	< 0,4 ед. ОП	0,29 (0,22–0,38)	0,25 (0,19–0,30)	< 0,001
анти-ФСГ IgG, ед. ОП	< 0,4 ед. ОП	0,27 (0,20–0,34)	0,29 (0,23–0,35)	0,575
анти-ТПО IgG, МЕ/мл	< 50 МЕ/мл	12,2 (8,7–18,7)	12,4 (9,5–18,9)	1
анти-ТТГ IgG, МЕ/л	≤ 1 МЕ/л	0,5 (0,3–0,6)	0,3 (0,2–0,5)	< 0,001
анти-ТГ IgG, МЕ/мл	< 100 МЕ/мл	19,4 (15,0–28,5)	20,7 (14,8–31,5)	0,227
АНА IgG, ИП	< 1 ИП	0,5 (0,4–0,7)	0,45 (0,4–0,65)	< 0,001
анти-SS-A IgG, МЕ/мл	< 15 МЕ/мл	3,3 (2,6–5,3)	3,0 (2,6–4,3)	0,032
анти-SS-B IgG, МЕ/мл	< 15 МЕ/мл	3,2 (2,1–4,8)	3,3 (2,3–5,1)	0,038
анти-дсДНК IgG, МЕ/мл	< 20 МЕ/мл	11,8 (9,3–14,7)	15,3 (12,8–18,1)	< 0,001
анти-RNP-70 IgG, Ед/мл	< 25 Ед/мл	4,1 (2,8–5,6)	2,3 (1,7–3,1)	< 0,001

Примечание: Me (X–Y), Sign тест.

уровень антител был в пределах PЗ. Не было выявлено значимой корреляционной связи между изменением уровней гормонов, отражающих овариальный резерв, и аутоантител.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным экспериментов *in vivo* и единичных клинических исследований, вакцинация потенциально может стать причиной нарушения репродуктивной функции вследствие развития синдрома ASIA и некоторых аутоиммунных заболеваний, в том числе АФС и СКВ [12, 13, 15]. Известно, что АФА могут разрушать защитный слой аннексина V над отрицательно заряженной

поверхностью синцитиотрофобласта и эндотелия, что способствует активации коагуляции и развитию состояния гиперкоагуляции. АФА могут инициировать апоптоз в клетках трофобласта, нарушать пролиферацию клеток, экспрессию молекул адгезии и секрецию хорионического гонадотропина, а также вызывать развитие провоспалительной реакции [16].

Несмотря на то что персистенция аутоантител у женщин — достаточно частое явление, запуск образования ряда аутоиммунных антител может привести у генетически предрасположенных людей к развитию аутоиммунных заболеваний. В связи с этим в настоящем исследовании был проведен анализ широкого спектра аутоантител, как органоспецифичных, так и органонеспецифичных,

Таблица 4. Частота выявления сывороточных аутоантител с уровнем выше референсных значений у женщин до и после вакцинации

Параметр	Референсные значения	До вакцинации	Через 90 дней после вакцинации	Значение <i>p</i>
анти-ZP IgG, нг/мл	< 250 нг/мл	17 (14,2%)	19 (15,8%)	0,844
анти-ТБ IgG, нг/мл	< 150 нг/мл	7 (5,8%)	13 (10,8%)	0,211
анти-ОВ IgG, Ед/мл	< 10 Ед/мл	1 (0,8%)	2 (1,6%)	1
анти-ПГ IgM, ед.ОП	< 0,4 ед. ОП	32 (26,7%)	19 (15,8%)	0,012
анти-ПГ IgG ед.ОП	< 0,4 ед. ОП	21 (17,5%)	41 (34,2%)	< 0,001
анти-ФСГ IgM, ед. ОП	< 0,4 ед. ОП	23 (19,2%)	11 (9,2%)	0,006
анти-ФСГ IgG, ед. ОП	< 0,4 ед. ОП	14 (11,7%)	21 (17,5%)	0,19
анти-ТПО IgG, МЕ/мл	< 50 МЕ/мл	12 (10%)	13 (10,8%)	1
анти-ТТГ IgG, МЕ/л	≤ 1 МЕ/л	2 (1,6%)	1 (0,8%)	1
анти-ТГ IgG, МЕ/мл	< 100 МЕ/мл	6 (5%)	7 (5,8%)	1
АНА IgG, ИП	< 1 ИП	11 (9,2%)	12 (10%)	1
анти-SS-A IgG, МЕ/мл	< 15 МЕ/мл	4 (3,3%)	7 (5,8%)	0,248
анти-SS-B IgG, МЕ/мл	< 15 МЕ/мл	1 (0,8%)	1 (0,8%)	–
анти-дсДНК IgG, МЕ/мл	< 20 МЕ/мл	4 (3,3%)	18 (15%)	0,003
анти-RNP-70 IgG, Ед/мл	< 25 Ед/мл	4 (3,3%)	0	–
Наличие хотя бы одного вида аутоАТ выше PЗ		85 (70,8%)	90 (75%)	0,423
Наличие аутоАТ выше PЗ >1		46 (38,3%)	55 (45,8%)	0,176

Примечание: *p* — критерий Мак-Немара, PЗ — референсные значения, ядерные антигены.

Тепловая карта корреляций												
n=120												
r>=												
антиZR_дельта а	антиТБ_дельта а	антиОВ_дельта а	антиИГ_дельта	антиИГ_дельта	антиФСГ_дельта	антиФСГ_дельта	АНА_дельта	антиSSA_дельта а	антиSSB_дельта	антиДНК_дельта а	антиRNP 70_дельта	
Дельта ФСГ	0.107914	0.087125	0.039728	-0.054829	0.072393	-0.005252	0.131140	0.052505	0.010651	0.061201	0.083905	0.009604
Дельта АМГ	0.061889	-0.046261	0.009472	-0.111102	-0.077633	-0.040844	0.002070	-0.070587	0.058499	-0.143730	0.006783	0.024370

Тепловая карта р-значений корреляций												
n=120												
p<=												
антиZR_дельта а	антиТБ_дельта а	антиОВ_дельта а	антиИГ_дельта	антиИГ_дельта	антиФСГ_дельта	антиФСГ_дельта	АНА_дельта	антиSSA_дельта а	антиSSB_дельта	антиДНК_дельта а	антиRNP 70_дельта	
Дельта ФСГ	0.241	0.344	0.667	0.552	0.432	0.955	0.153	0.569	0.908	0.507	0.362	0.917
Дельта АМГ	0.502	0.616	0.918	0.227	0.399	0.658	0.982	0.444	0.526	0.117	0.941	0.792

Рис. 2. Корреляционные связи между изменениями уровня гормонов (ΔФСГ и ΔАМГ) и аутоантител (Δ аутоантител) у женщин до и после вакцинации

у женщин после вакцинации от COVID-19. Исследование критериальных и некритериальных АФА было выполнено для диагностики и оценки риска развития АФС, который может приводить не только к бесплодию, но и к тромбозам, тромбоцитопении и привычному выкидышу [17].

В обследование вакцинированных женщин было включено определение АНА, скрининг которых используют для диагностики аутоиммунных заболеваний соединительной ткани (СКВ, синдрома Шегрена, синдрома Шарпа, полимиозита/дерматомиозита и прогрессирующей системной склеродермии) [18]. АНА выполняют функцию биомаркера отдельных заболеваний соединительной ткани. Кроме определения АНА, вакцинированных женщин обследовали на антитела к двуспиральной ДНК (дсДНК) и антитела к экстрагируемым ядерным антигенам (SS-A/Ro, SS-B/La, RNP-70). Ревматоидные аутоиммунные заболевания часто связаны с присутствием аутоантител к экстрагируемым ядерным и цитоплазматическим антигенам. Аутоантитела к SS-B обычно обнаруживают вместе с антителами к антигену SS-A при синдроме Шегрена [19]. У женщин было также проведено исследование сыворотки и плазмы крови на аутоантитела класса G к RNP-70. Определение данного вида антител используют в диагностике смешанных заболеваний соединительной ткани (MCTD, или синдром Шарпа) и связанных с ними аутоиммунных заболеваний [20].

У вакцинированных женщин определяли органо-специфичные антиовариальные и антитрофобластические аутоантитела, а также антитела к зоне пеллюцида, которые вследствие развития иммунологических нарушений могут привести к снижению фертильности и бесплодию или преждевременной недостаточности яичников. Было показано, что аутоантитела к антигенам ооцитов ассоциируются с плохим овариальным ответом при стимуляции яичников в программах ВРТ [21].

Было проведено определение антител к антигенам щитовидной железы, а именно к ТГ (тиреоглобулину), ТПО (тиреопероксидазе) и к рецептору ТТГ, которые имеют важное значение в диагностике аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Изучение профиля данных аутоантител используют при дифференциальной диагностике аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, например, тиреоидита Хашимото и болезни Грейвса [22].

С помощью разработанных новых модификаций иммуноферментного анализа у вакцинированных женщин определяли антитела к наиболее важным для осуществления репродуктивной функции женщин гормонам, а именно к ФСГ и прогестерону, которые могут нарушать функцию экзогенных и эндогенных гормонов, влиять на фолликулогенез, подготовку эндометрия к беременности и течение беременности на ранних сроках.

В исследовании отмечены значимое снижение критериальных антифосфолипидных антител классов M и

G (анти-КЛ и анти-β2-ГП-1) и повышение среднего уровня некритериальных антител (анти-Ан V, анти-ФС, анти-ФЭ и анти-ФС/ПТ). Данные изменения не показательны, так как у большинства пациенток уровень АФА находился в пределах РЗ, несмотря на их колебания как в сторону повышения, так и в сторону снижения.

Более показательной была оценка частоты выявления АФА у женщин до и после вакцинации от COVID-19. При этом у вакцинированных женщин было найдено значимое повышение частоты выявления анти-ФЭ IgM-антител, которое носило транзиторный характер.

Необходимо отметить, что анти-ФЭ-антитела наиболее часто появляются при инфекционных процессах, как вирусной, так и бактериальной природы, и длительно сохраняют персистенцию в организме [23–24]. ФЭ является главным липидным компонентом микробных мембран и широко представлен в мембранах клеток организма. Любой инфекционно-воспалительный процесс, развивающийся в том числе при иммунизации или активации хронических очагов инфекции в организме, сопровождающийся продукцией провоспалительных медиаторов и повреждением клеток и тканей, может способствовать экспонированию ФЭ в клеточных мембранах, образованию и связыванию аутоантител, их транзиторной или длительной персистенции. Инфекционные агенты способны запускать аутоиммунные реакции, а персистенция анти-ФЭ-антител может свидетельствовать о наличии очагов инфекции в организме и их возможной активации под влиянием вакцинации.

После вакцинации у женщин не было отмечено значимого изменения уровня других аутоантител, за исключением анти-дсДНК IgG-антител, которое носило транзиторный характер. К повышению уровня анти-дсДНК-антител может приводить воздействие различных факторов (как внешнего, так и внутреннего происхождения), при котором происходит высвобождение ДНК и ее фрагментов. Так, ядерные антигены могут высвобождаться из клеток, подвергающихся апоптозу или некрозу. К продукции анти-дсДНК могут приводить бактериальные капсульные полисахариды [25]. Имеются данные об образовании антител к ДНК после введения липополисахарида бактериальной стенки. Эти эффекты могут быть причиной синтеза анти-ДНК-антител во время инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями [26].

В одном из обзоров о влиянии разных типов вакцин на образование аутоантител было показано, что индукция аутоиммунных антител происходит у здоровых людей в ответ на вакцинацию от гепатита В, гриппа, гепатита А (в том числе транзиторное повышение антинуклеарных антител), однако ни у одного пациента в течение периода наблюдения не было зафиксировано развитие аутоиммунного заболевания. Авторы предполагают, что транзиторное повышение некоторых аутоантител

может быть связано с неспецифической активацией Т- и В-лимфоцитов в ответ на вакцинацию [27].

Важно отметить, что у женщин не обнаружена корреляционная связь между динамикой уровня гормонов, отражающих овариальный резерв яичников, и динамикой уровня АФА и аутоантител другой специфичности, что свидетельствует об отсутствии изменений репродуктивной функции после вакцинации, обусловленных воздействием аутоиммунного фактора.

Проведение вакцинации становится еще более обоснованным с учетом последних данных о негативном влиянии заболевания COVID-19 на состояние репродуктивной системы у женщин. Так, у пациенток, перенесших COVID-19, наблюдали значительное снижение уровня АМГ [28]. Наиболее вероятно, нарушения в женской репродуктивной системе после инфицирования COVID-19 происходят в результате поражения SARS-CoV-2 ткани яичников, ооцитов и клеток эндометрия, что приводит к нарушению овуляторной функции, получению инфицированных или анеуплоидных

ооцитов со сниженным потенциалом к фертилизации, а также к нарушению имплантации эмбрионов [29].

Выводы

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что вакцинация комбинированной векторной вакциной Гам-КОВИД-Вак для профилактики новой коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, не оказывает негативного влияния на уровень гормонов, отражающих овариальный резерв, и уровень аутоантител у женщин репродуктивного возраста, не вызывает развития аутоиммунных реакций и ассоциированного с ними снижения репродуктивного потенциала у женщин. Перспективным направлением является исследование механизмов специфического иммунного ответа на вакцинацию, особенности иммунного статуса вакцинированных с оценкой параметров клеточного звена иммунитета.

Литература

- Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv Virus res.* 2016; 96: 245–86.
- Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* 2021; 397 (10275): 671–81.
- Orvieto R, Noach-Hirsh M, Segev-Zahav A, Haas J, Nahum R, Aizer A. Does mRNA SARS-CoV-2 vaccine influence patients' performance during IVF-ET cycle? *Reprod Biol Endocrinol.* 2021; 19 (1): 69.
- Bentov Y, Beharier O, Moav-Zafir A, Kabessa M, Godin M., Greenfield CS, et al. Ovarian follicular function is not altered by SARS-CoV-2 infection or BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. *Hum Reprod.* 2021; 36 (9): 2506–13.
- Drapkina YS, Dolgushina NV, Shatylo TV, Nikolaeva MA, Menzhinskaya IV, Ivanets TY, et al. Gam-COVID-Vac (Sputnik V) vaccine has no adverse effect on spermatogenesis in men. *Akusherstvo i Ginekol.* 2021; 7: 88–94.
- Dolgushina NV, Drapkina YS, Krechetova LV, Ivanets TY, Menzhinskaya IV, Gus GAI, et al. Gam-COVID-Vac (Sputnik V) vaccine has no adverse effect on ovarian reserve in reproductive-age women. *Akusherstvo i Ginekol.* 2021; 7: 81–6.
- Gonzalez DC, Nassau DE, Khodamoradi K, Ibrahim E, Blachman-Braun R, Ory J, et al. Sperm Parameters Before and After COVID-19 mRNA Vaccination. *JAMA.* 2021; 326 (3): 273–4.
- World Health Organization (WHO). Module 2: types of vaccine and adverse reactions. *WHO Vaccine Saf Basics.* 2013: 38–60.
- Pellegrino P, Clementi E, Radice S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmun Rev.* 2015; 14 (10): 880–8.
- Guimarães LE, Baker B, Perricone C, Shoenfeld Y. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res.* 2015; 100 (January): 190–209.
- Watad A, Bragazzi NL, McGonagle D, Adawi M, Bridgewood C, Damiani G, et al. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) demonstrates distinct autoimmune and autoinflammatory disease associations according to the adjuvant subtype: Insights from an analysis of 500 cases. *Clin Immunol.* 2019; 203 (March): 1–8.
- Wang B, Shao X, Wang D, Xu D, Zhang J. Vaccinations and risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2017; 16 (7): 756–65.
- Cruz-Tapias P, Blank M, Anaya JM, Shoenfeld Y. Infections and vaccines in the etiology of antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2012; 24 (4): 389–93.
- Письмо Министерства здравоохранения РФ от 30 октября 2021 г. N 30-4/И/2-17927 О направлении актуализированных временных методических рекомендаций «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19». Доступно по ссылке: https://base.garant.ru/403013668/#block_.
- Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. "ASIA" — autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun.* 2011; 36 (1): 4–8.
- Kraevaya EE, Dolgushina NV, Menzhinskaya IV, Shpilyuk MA, Beznoshchenko OS, Krechetova LV. Outcomes of assisted reproductive technologies in patients with persistence of antiphospholipid antibodies. *Akush Ginekol (Sofia).* 2020; 4: 97–103.
- Shoenfeld Y, Carp HJA, Molina V, Blank M, Cervera R, Balasch J, et al. Autoantibodies and Prediction of Reproductive Failure. *Am J Reprod Immunol.* 2006; 56 (5–6): 337–44.
- Александрова Е. Н., Новиков А. А., Насонов Е. Л. Современные подходы к лабораторной диагностике ревматических заболеваний: роль молекулярных и клеточных биомаркеров. *Научно-практическая ревматология.* 2016; 3: 324–38.
- Pisetsky DS. Antinuclear Antibodies in Rheumatic Disease: A Proposal for a Function-Based Classification. *Scand J Immunol.* 2012; 76 (3): 223–8.
- Alves MR, Isenberg DA. "Mixed connective tissue disease": a condition in search of an identity. *Clin Exp Med.* 2020; 20 (2): 159–66.
- Pires ES, Parikh FR, Mande PV, Uttamchandani SA, Savkar S, Khole VV. Can anti-ovarian antibody testing be useful in an IVF-ET clinic? *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28 (1): 55–64.
- Trimboli P, Rossi F, Condorelli E, Laurenti O, Ventura C, Nigri G, et al. Does Normal Thyroid Gland by Ultrasonography match with Normal Serum Thyroid Hormones and Negative Thyroid Antibodies? *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009; 118 (09): 630–2.
- Bessis B, Bertin D, Million M, Meddeb L, Drancourt M, Lagier J-C, et al. Thromboses in tuberculosis are linked to antiphosphatidylethanolamine antibodies levels: A cross-sectional study. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2019; 15: 100092.
- Goodridge A, Zhang T, Miyata T, Lu S, Riley LW. Antiphospholipid IgM antibody response in acute and chronic Mycobacterium tuberculosis mouse infection model. *Clin Respir J.* 2014; 8 (2): 137–44.
- Grayzel A, Solomon A, Aranow C, Diamond B. Antibodies elicited by pneumococcal antigens bear an anti-DNA--associated

- idiotype. *J Clin Invest.* 1991; 87 (3): 842–6.
26. Fournié GJ, Lambert PH, Miescher PA. Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolisaccharides. *J Exp Med.* 1974; 140 (5): 1189–206.
27. Toplak N, Avčin T. *Autoantibodies Induced by Vaccine.* In: *Vaccines and Autoimmunity.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2015; p. 93–102.
28. Ding T, Wang T, Zhang J, Cui P, Chen Z, Zhou S, et al. Analysis of Ovarian Injury Associated With COVID-19 Disease in Reproductive-Aged Women in Wuhan, China: An Observational Study. *Front Med.* 2021; 8.
29. Dolgushin GO, Romanov AY. Effects of SARS-CoV-2 on human reproduction. *Akush Ginekol (Sofia).* 2020; 11: 6–12.
- ## References
- Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv Virus res.* 2016; 96: 245–86.
 - Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* 2021; 397 (10275): 671–81.
 - Orvieto R, Noach-Hirsh M, Segev-Zahav A, Haas J, Nahum R, Aizer A. Does mRNA SARS-CoV-2 vaccine influence patients' performance during IVF-ET cycle? *Reprod Biol Endocrinol.* 2021; 19 (1): 69.
 - Bentov Y, Beharier O, Moav-Zafirir A, Kabessa M, Godin M., Greenfield CS, et al. Ovarian follicular function is not altered by SARS-CoV-2 infection or BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. *Hum Reprod.* 2021; 36 (9): 2506–13.
 - Drapkina YS, Dolgushina NV, Shatylo TV, Nikolaeva MA, Menzhinskaya IV, Ivanets TY, et al. Gam-COVID-Vac (Sputnik V) vaccine has no adverse effect on spermatogenesis in men. *Akusherstvo i Ginekol.* 2021; 7: 88–94.
 - Dolgushina NV, Drapkina YS, Krechetova LV, Ivanets TY, Menzhinskaya IV, Gus GA, et al. Gam-COVID-Vac (Sputnik V) vaccine has no adverse effect on ovarian reserve in reproductive-age women. *Akusherstvo i Ginekol.* 2021; 7: 81–6.
 - Gonzalez DC, Nassau DE, Khodamoradi K, Ibrahim E, Blachman-Braun R, Ory J, et al. Sperm Parameters Before and After COVID-19 mRNA Vaccination. *JAMA.* 2021; 326 (3): 273–4.
 - World Health Organization (WHO). Module 2: types of vaccine and adverse reactions. *WHO Vaccine Saf Basics.* 2013: 38–60.
 - Pellegrino P, Clementi E, Radice S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmun Rev.* 2015; 14 (10): 880–8.
 - Guimarães LE, Baker B, Perricone C, Shoenfeld Y. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res.* 2015; 100 (January): 190–209.
 - Watad A, Bragazzi NL, McGonagle D, Adawi M, Bridgewood C, Damiani G, et al. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) demonstrates distinct autoimmune and autoinflammatory disease associations according to the adjuvant subtype: Insights from an analysis of 500 cases. *Clin Immunol.* 2019; 203 (March): 1–8.
 - Wang B, Shao X, Wang D, Xu D, Zhang J. Vaccinations and risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2017; 16 (7): 756–65.
 - Cruz-Tapias P, Blank M, Anaya JM, Shoenfeld Y. Infections and vaccines in the etiology of antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2012; 24 (4): 389–93.
 - Pis'mo Ministerstva zdravooxraneniya RF ot 30 oktyabrya 2021 g. N 30-4/1/2-17927 O napravlenii aktualizirovannykh vremennykh metodicheskix rekomendacij «Poryadok provedeniya vaktsinacii vzroslogo naseleniya protiv COVID-19». Available from: https://base.garant.ru/403013668/#block_. Russian.
 - Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. "ASIA" — autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun.* 2011; 36 (1): 4–8.
 - Kraevaya EE, Dolgushina NV, Menzhinskaya IV, Shpilyuk MA, Beznoshchenko OS, Krechetova LV. Outcomes of assisted reproductive technologies in patients with persistence of antiphospholipid antibodies. *Akush Ginekol (Sofia).* 2020; 4: 97–103.
 - Shoenfeld Y, Carp HJA, Molina V, Blank M, Cervera R, Balasch J, et al. Autoantibodies and Prediction of Reproductive Failure. *Am J Reprod Immunol.* 2006; 56 (5–6): 337–44.
 - Aleksandrova EN, Novikov AA, Nasonov EL. Sovremennyye podkhody k laboratornoj diagnostike revmaticheskix zabolevaniy: rol' molekulyarnykh i kletochnykh biomarkerov. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2016; 3: 324–38. Russian.
 - Pisetsky DS. Antinuclear Antibodies in Rheumatic Disease: A Proposal for a Function-Based Classification. *Scand J Immunol.* 2012; 76 (3): 223–8.
 - Alves MR, Isenberg DA. "Mixed connective tissue disease": a condition in search of an identity. *Clin Exp Med.* 2020; 20 (2): 159–66.
 - Pires ES, Parikh FR, Mande PV, Uttamchandani SA, Savkar S, Khole VV. Can anti-ovarian antibody testing be useful in an IVF-ET clinic? *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28 (1): 55–64.
 - Trimboli P, Rossi F, Condorelli E, Laurenti O, Ventura C, Nigri G, et al. Does Normal Thyroid Gland by Ultrasonography match with Normal Serum Thyroid Hormones and Negative Thyroid Antibodies? *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009; 118 (09): 630–2.
 - Bessis S, Bertin D, Million M, Meddeb L, Drancourt M, Lagier J-C, et al. Thromboses in tuberculosis are linked to antiphosphatidylethanolamine antibodies levels: A cross-sectional study. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2019; 15: 100092.
 - Goodridge A, Zhang T, Miyata T, Lu S, Riley LW. Antiphospholipid IgM antibody response in acute and chronic Mycobacterium tuberculosis mouse infection model. *Clin Respir J.* 2014; 8 (2): 137–44.
 - Grayzel A, Solomon A, Aranow C, Diamond B. Antibodies elicited by pneumococcal antigens bear an anti-DNA-associated idiotype. *J Clin Invest.* 1991; 87 (3): 842–6.
 - Fournié GJ, Lambert PH, Miescher PA. Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolisaccharides. *J Exp Med.* 1974; 140 (5): 1189–206.
 - Toplak N, Avčin T. *Autoantibodies Induced by Vaccine.* In: *Vaccines and Autoimmunity.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2015; p. 93–102.
 - Ding T, Wang T, Zhang J, Cui P, Chen Z, Zhou S, et al. Analysis of Ovarian Injury Associated With COVID-19 Disease in Reproductive-Aged Women in Wuhan, China: An Observational Study. *Front Med.* 2021; 8.
 - Dolgushin GO, Romanov AY. Effects of SARS-CoV-2 on human reproduction. *Akush Ginekol (Sofia).* 2020; 11: 6–12.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТОЦИЛИЗУМАБА У СТАЦИОНАРНЫХ ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19

О. А. Бургасова^{1,2}✉, С. В. Долинный³, В. Б. Тетова¹, Д. А. Огаркова², М. А. Одрноралов¹, В. В. Бакалин¹, С. В. Сметанина³, Н. А. Антипят³, М. В. Таранова⁴

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

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

³ Инфекционная клиническая больница № 1, Москва, Россия

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

Осложненное течение COVID-19 ассоциировано с феноменом нерегулируемого воспаления, синдромом избыточного выброса цитокинов, в том числе повышением уровня интерлейкина-6 (IL6). Для лечения пациентов с COVID-19 стали активно применять супрессивные средства с векторным блокированием цитокинов — моноклональные антитела к IL6 и его рецепторам. Терапевтическая эффективность различных биологических средств при COVID-19 пока недостаточно изучена. Целью исследования было оценить влияние антагониста рецептора IL6 тоцилизумаба на клиническое течение COVID-19 в сравнении с поддерживающей кортикостероидной терапией. В ретроспективном когортном исследовании наблюдали две группы пациентов ($n = 72$) со среднетяжелым течением COVID-19 и риском прогрессирования заболевания. Пациентам основной группы к стандартной терапии однократно вводили тоцилизумаб в дозе 400 мг. Проведен сравнительный анализ основных параметров клинико-лабораторного профиля и исходов заболевания в контрольных временных точках при использовании различных лечебных стратегий. Результаты применения тоцилизумаба у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 не продемонстрировали преимуществ его использования для снижения потребности в дополнительной кислородной поддержке и риска прогрессирования заболевания до тяжелой формы, а также числа летальных исходов по сравнению с поддерживающей терапией. Число летальных случаев составило 10 (19,2%) и 1 (5%) в группах с применением тоцилизумаба и поддерживающей терапии соответственно. Использование препаратов моноклональных антител у пациентов с COVID-19, возможно, требует избирательного подхода с учетом не только степени тяжести заболевания, коморбидности, но и сроков начала введения биологических супрессивных средств.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), ингибитор IL6, тоцилизумаб, дексаметазон

Вклад авторов: О. А. Бургасова — инициатор исследования, дизайн, руководство клинической частью, подготовка рукописи; С. В. Долинный — анализ литературных источников, клинические наблюдения, обработка результатов; В. Б. Тетова — анализ литературных источников, редактирование статьи; Д. А. Огаркова — статистический анализ; М. А. Одрноралов, В. В. Бакалин — клинические наблюдения, обработка клинических и лабораторных данных; С. В. Сметанина — концепция исследования; Н. А. Антипят — руководство клинической частью исследования; М. В. Таранова — анализ литературных источников, обработка результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы (протокол № 1 от 11 января 2021 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Александровна Бургасова
ул. Волоколамское шоссе, д. 47, стр. 8, корп. 5, г. Москва, 125310, Россия; olgaburgasova@mail.ru

Статья получена: 10.03.2022 **Статья принята к печати:** 03.04.2022 **Опубликована онлайн:** 15.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.015

EXPERIENCE OF TOCILIZUMAB IN HOSPITAL PATIENTS WITH MODERATE COVID-19

Burgasova OA^{1,2}✉, Dolinniy SV³, Tetova VB¹, Ogarkova DA², Odnorolov MA¹, Bacalin VV¹, Smetanina SV³, Antipyat NA³, Taranova MV⁴

¹ Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia

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

³ Clinical Hospital for Infectious Diseases №1, Moscow, Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Severe form of COVID 19 has been linked to the phenomenon of dysregulated inflammation with excessive cytokine release and elevated interleukin 6 (IL6) levels. Suppressing agents enabling specific inhibition of cytokines, notably monoclonal antibodies to IL6 and its receptors, have been applied as a rescue therapy in COVID 19 despite the underexplored clinical scope for these biologic medications. This study aimed to evaluate the clinical utility of IL6 receptor antagonist tocilizumab in moderate symptomatic COVID 19 prone to aggravation. The retrospective cohort study enrolled two groups of hospitalized patients (a total of $n = 72$) diagnosed with moderate COVID-19. The main group received a single 400 mg dose of tocilizumab (TCZ) on top of standard therapy. The comparative analysis included statistical evaluation for a number of clinical and laboratory parameters at reference time points and disease outcomes with regard to treatment strategy. Overall, TCZ administration provided no advantages in terms of oxygen supplementation status, disease progression, or survival. Lethal cases constituted 19.2% (10 pts) and 5% (1 pt) in TCZ and comparison groups, respectively. The results indicate that administration of monoclonal antibody drugs in hospital patients with COVID-19 must follow differential schemes with regard to the disease severity and comorbidities, as well as proper commencement schedules.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, acute respiratory distress syndrome (ARDS), interleukin 6 (IL6) inhibitors, tocilizumab, dexamethasone

Author contribution: OA Burgasova — initiative and design, supervision of the clinical part of the study, writing of the manuscript; SV Dolinniy — literature review, clinical observations, data processing; VB Tetova — literature review, editing of the manuscript; DA Ogarkova — statistical analysis; MA Odnorolov, VV Bacalin — clinical observations, processing of clinical and laboratory data; SV Smetanina — concept; NA Antipyat — supervision of the clinical part of the study, MV Taranova — literature review, data processing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee at the Clinical Hospital for Infectious Diseases №1 (Protocol 1 of January 11, 2021); all participants provided informed consent for the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Burgasova
Volokolamskoe sh., 47, str. 8, korp. 5, Moscow, 125310, Russia; olgaburgasova@mail.ru

Received: 10.03.2022 **Accepted:** 03.04.2022 **Published online:** 15.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.015

Вспышка новой коронавирусной инфекции остается серьезной проблемой глобального здравоохранения, с которой связано более 4 млн смертей по состоянию на октябрь 2021 г. [1]

Несмотря на глобальную вакцинацию во многих странах, потребность в госпитализации по поводу COVID-19 будет по-прежнему иметь место из-за склонности вируса SARS-CoV-2 к мутации.

Иммунный ответ, как известно, играет крайне важную роль в контроле инфекционных заболеваний, а его нарушение представляет основную причину развития тяжелого респираторного дистресс-синдрома при вирусных заболеваниях, в том числе и при острых респираторных вирусных заболеваниях. Избыточная выработка провоспалительных цитокинов, именуемая как «цитокиновый шторм», представляет собой серьезное иммунологическое событие, которое индуцирует развитие тяжелого клинического синдрома, являющегося осложнением инфекционных и воспалительных заболеваний. «Цитокиновый шторм» и тяжелый острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), вызванные коронавирусом (SARS-CoV-2), непосредственно связаны с прогрессированием заболевания и плохим прогнозом [2–10].

Серьезным и не до конца решенным в глобальном формате клиническим вопросом является наличие безопасных и эффективных терапевтических средств для лечения госпитализированных пациентов с COVID-19. Продолжается совершенствование терапевтических схем, наряду с изучением лечебной эффективности различных лекарственных средств, включая моноклональные антитела.

Многие когортные и клинические исследования показали, что своевременное введение иммуномодулирующих препаратов пациентам с COVID-19 может существенно улучшить клинический статус, сократить время пребывания в стационаре и показатель выживаемости [11].

Ряд исследований терапевтической эффективности нейтрализующих моноклональных антител у пациентов с COVID-19 продемонстрировал снижение вирусной нагрузки SARS-CoV-2 и предотвращение прогрессирования заболевания [12–15].

Систематические обзоры тоже свидетельствуют о том, что рациональное применение тоцилизумаба у тяжелых и критически больных пациентов с COVID-19 позволяет предотвратить развитие необратимого поражения легких [16].

В результате метаанализа по оценке эффективности антагониста рецептора IL6 тоцилизумаба у госпитализированных пациентов с COVID-19, включавшего восемь рандомизированных клинических исследований ($n = 5340$) и 28 когортных наблюдательных исследований ($n = 15\,484$), получены совокупные данные высокого уровня достоверности, свидетельствующие о роли тоцилизумаба в снижении потребности искусственной вентиляции легких у госпитализированных пациентов с тяжелой формой COVID-19. Доказательства со средним уровнем достоверности продемонстрировали связь терапии тоцилизумабом со снижением числа случаев неблагоприятного исхода и риска развития вторичных инфекций у пациентов с COVID-19 [17].

В то же время авторы обобщенного систематического обзора, посвященного обоснованию использования блокатора рецепторов IL6 для лечения COVID-19, пришли к выводу о недостаточности данных об его эффективности. Результаты обзора основаны на данных трех неслепых доклинических исследований и 28 клинических

исследований, включающих 5776 пациентов с COVID-19 и вирусной пневмонией и/или сепсисом, принимавших тоцилизумаб (до 20 июня 2020 г.) [18].

Кроме упомянутого систематического обзора опубликованы результаты клинических исследований RCT-TCZ-COVID, CORIMUNO, STOP-COVID [19–21]. Они тождественны в том, что наиболее часто исследуемый представитель этой группы — тоцилизумаб не имеет достоверной эффективности при легком и среднетяжелом течении COVID-19. Полученные результаты исследований не позволяют также однозначно судить об эффективности препаратов данной фармакологической группы при тяжелом течении заболевания. Для подтверждения многообещающих результатов лечения тоцилизумабом у пациентов с COVID-19 необходимо иметь больше рандомизированных исследований со значительным числом пациентов при изучении в различные сроки заболевания.

Целью исследования было изучить влияние моноклонального антитела тоцилизумаба на клиническое течение COVID-19 в сочетании с комплексной терапией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Данное ретроспективное когортное исследование проводили в городской клинической инфекционной больнице в период с 11.01.2021 по 31.12.2021. Исходные демографические, клинические и эпидемиологические данные были собраны из печатных и электронных медицинских карт. Диагноз COVID-19 окончательно подтверждали положительным результатом теста полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР) с выявлением SARS-CoV-2 в носоглоточном мазке.

Под нашим наблюдением находились 72 стационарных пациента со среднетяжелой формой COVID-19, согласно критериям, ВОЗ 2021 г. Все включенные в наблюдение пациенты имели те или иные факторы риска прогрессирования заболевания до тяжелой формы и были госпитализированы в среднем на $8 \pm 3,5$ день после появления симптомов. Пациенты были разделены на две группы: в основной принимали тоцилизумаб ($n = 52$); в группе сравнения — поддерживающая/плюс кортикостероидная (КС) терапия ($n = 20$).

Критерии включения: среднетяжелое течение COVID-19 с развившейся пневмонией и различной сопутствующей патологией, факторами риска прогрессирования заболевания (возраст ≥ 60 лет, сахарный диабет, хронические легочные и сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия и наличие рентгенологических признаков пневмонии); госпитализация на $8 \pm 3,5$ день после появления симптомов.

Критерии исключения: отсутствие характерных симптомов COVID-19; без пневмонии; прием других биологических лекарственных препаратов.

Клинический статус при поступлении оценивали на основании результатов: клинического анализа крови с лейкоцитарной формулой и СОЭ; биохимического анализа крови, включая уровень С-реактивного белка (СРБ); рентгенологического исследования органов грудной клетки и наличия признаков пневмонии; пульсоксиметрии с определением показателя сатурации (SpO_2). Были также собраны результаты ПЦР-теста с обнаружением SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки, необходимые для подтверждения диагноза COVID-19. В сравнительном анализе оценивали параметры первичной точки (исходные

Таблица 1. Спектр и встречаемость основных симптомов в группах

Симптом	Тоцилизумаб		Поддерживающая терапия/дексаметазон	
	(n = 52)		(n = 20)	
Слабость	n = 52	100%	n = 20	100%
Головная боль	n = 3	5.8%	n = 0	0%
Миалгия	n = 2	3.8%	n = 3	15%
Озноб	n = 46	88.5%	n = 14	70%
Сыпь	n = 2	3.8%	n = 1	5%
Гиперемия слизистой ротоглотки	n = 3	5.8%	n = 1	5%
Боль в горле	n = 5	9.6%	n = 1	5%
Заложенность носа	n = 0	0%	n = 0	0%
Кашель сухой	n = 33	63.5%	n = 12	60%
Кашель влажный	n = 4	7.7%	n = 0	0%
Боль в животе	n = 3	5.8%	n = 1	5%
Тошнота/рвота	n = 9	17.3%	n = 0	0%
Диарея	n = 11	21.2%	n = 2	10%
Нарушение сознания	n = 1	1.9%	n = 2	10%
Головокружение	n = 7	13.5%	n = 1	5%
Менингеальные знаки	n = 0	0%	n = 0	0%
Дизосмия	n = 4	7.7%	n = 1	5%
Дисгевзия	n = 1	1.9%	n = 0	0%

данные) и вторичной точки (данные клинико-лабораторного профиля после введения сравниваемых препаратов) в отмеченные временные интервалы в двух группах, а также число летальных случаев.

Пациенты основной группы (n = 52), проходившие курс лечения тоцилизумабом, были госпитализированы в разные сроки: на 1–5-й день болезни было госпитализировано 17,3% (n = 9); на 6–10-й день болезни было госпитализировано основное число пациентов — 61,5% (n = 32); 8 (15,4%) пациентов на 11–15-й день болезни; 3 (5,8%) пациента были госпитализированы после 15-го дня болезни. Возрастная структура пациентов группы, принимавшей тоцилизумаб: возраст 30–50 лет — 7 (13,5%) пациентов; 51–70 лет — 24 (46,2%) пациента; старше 71 года — 21 (40,3%). Из них 19 (36,5%) мужчин и 33 (63,5%) женщины.

Пациентам основной группы тоцилизумаб вводили однократно внутривенно капельно в дозе 400 мг на 10 ± 3,7 день болезни согласно нормативным методическим рекомендациям. В динамике проводили наблюдение и анализ клинических и лабораторно-инструментальных показателей пациентов.

В группе сравнения (n = 20) пациенты, принимавшие дексаметазон, тоже были госпитализированы в разные сроки от начала заболевания: на 1–5-й день болезни — 4 (20%) пациента; на 6–10-й день болезни — 13 (65%) пациентов; на 11–15-й день болезни — 2 (10%) пациента; 1 пациент был госпитализирован после 15-го дня болезни. Возраст пациентов группы сравнения: 51–70 лет — 9 (45%) пациентов; старше 71 года — 11 (55%) пациентов. Из них 10 (50%) мужчин и 10 (50%) женщин. Согласно методическим рекомендациям МЗ РФ всем пациентам группы сравнения был назначен дексаметазон (в/в) на 8 ± 3,7-й день болезни в дозе 4 мг 2 раза/сут. Спектр и встречаемость клинических симптомов в сравниваемых группах представлены в табл. 1. Первичные данные, динамика основных показателей и исходы в сравниваемых группах пациентов, принимающих тоцилизумаб и находящихся на поддерживающей терапии (плюс дексаметазон), представлены в табл. 2. Пациенты в

основной группе были сопоставимы по возрасту (68 лет (59–80,5)) с пациентами в группе поддерживающей терапии (72,5 года (64,5–82); p < 0,308). Пациенты основной группы были госпитализированы в тождественные сроки от начала заболевания (8 (6–10) дней от появления симптомов) с пациентами группы поддерживающей терапии (8 (6,5–8,5) дней; p < 0,505). Средние значения исходных лабораторных показателей в обеих группах были сопоставимы.

Пациенты в основной группе проходили курс лечения биологическим препаратом в среднем на 10-й (8–12) день болезни. В то время как пациентам сравниваемой группы проводили терапию дексаметазоном в среднем с 8-го (5,5–10) дня болезни. Эквивалентное число пациентов находилось на стероидной терапии в основной группе и в группе поддерживающей терапии (100%). Ни один из наблюдаемых пациентов в обеих группах не принимал другие иммуносупрессивные препараты, такие как леволимиб, барицитиниб.

Статистический анализ показателей проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics ver. 26 (IBM; США). Распределение большинства количественных параметров отличалось от нормального (p > 0,05; критерий Шапиро–Уилка), поэтому при описании использовали непараметрические характеристики (Me [IQR]). Для анализа количественных показателей использовали критерий Манна–Уитни для сравнения значений между независимыми группами (с приемом тоцилизумаба и без тоцилизумаба). Для анализа связанных выборок использовали ранговый критерий Уилкоксона, при анализе качественных показателей — критерий χ^2 Пирсона или точный тест Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ основных клинико-лабораторных параметров в динамике показал значительное (10-кратное) снижение сывороточного уровня СРБ через 24 ч после введения тоцилизумаба (p < 0,001) до 7 мг/л (3,5–41,5 мг/л). Лечение тоцилизумабом ассоциировалось с достоверным (p < 0,001)

Таблица 2. Исходные данные, динамика основных показателей и исходы в сравниваемых группах пациентов, принимающих тоцилизумаб и находящихся на поддерживающей терапии (+дексаметазон)

Показатель	Тоцилизумаб (n = 52)	Поддерживающая терапия/дексаметазон (n = 20)	p
Демографические данные			
Возраст	68 [59–80,5]	72,5 [64,5–82]	0,308 (критерий Манна–Уитни)
Пол	Муж.: 19 (36,5%) Жен.: 33 (63,5%)	Жен.: 10 (50%) Муж.: 10 (50%)	
День болезни при поступлении	8 [6–10]	8 [6,5–8,5]	0,505 (критерий Манна–Уитни)
День болезни на момент введения	10 [8–12]	8 [5,5–10]	0,022* (критерий Манна–Уитни)
Сопутствующие заболевания			
Артериальная гипертензия	39 75%	16 80%	0,764 (критерий χ^2)
Сердечно-сосудистые	25 48%	14 70%	0,118 (критерий χ^2)
Сахарный диабет	12 23%	6 30%	0,762 (критерий χ^2)
Заболевание легких	11 21%	3 15%	0,744 (точный критерий Фишера)
Ожирение	(известно 46) 28 61%	(известно 16) 4 25%	0,020* (критерий χ^2)
Клинические проявления			
Температура изначально	36,8 [36,6–37,4]	36,8 [36,6–37,35]	0,845 (критерий Манна–Уитни)
Температура, 4 дня после введения	36,6 [36,45–36,8]	36,65 [36,5–36,8]	0,978 (критерий Манна–Уитни)
Сатурация изначально	95,5[93–96,5]	95,5 [94,5–97]	0,318 (критерий Манна–Уитни)
Сатурация, 4 дня после введения	96[94–97]	96[95–98]	0,247 (критерий Манна–Уитни)
Результаты лабораторных тестов			
Лейкоциты, абс изначально	7 [5,2–9]	7,05 [6,20–10,05]	0,427 (критерий Манна–Уитни)
Лейкоциты, абс, 4 дня после введения	5,7 [4,2–11]	8,35 [5,8–10,5]	0,075 (критерий Манна–Уитни)
Лимфоциты, абс изначально	1,23 [0,84–1,57]	1,24 [0,85–1,64]	0,832 (критерий Манна–Уитни)
Лимфоциты, абс, 4 дня после введения	1,09 [0,70–1,75]	1,62 [1,14–1,84]	0,107 (критерий Манна–Уитни)
СРБ изначально	72 [28,5–130,5]	74 [39,5–105,5]	0,977 (критерий Манна–Уитни)
СРБ, 24 ч после введения	7 [3,5–41,5]	6 [5–12,5]	0,945 (критерий Манна–Уитни)
Ферритин изначально	499,5 [251–1033]	319 [295–399]	0,872 (критерий Манна–Уитни)
Ферритин, 24 ч после введения	708 [375–904]	1252 [783–1500]	0,127 (критерий Манна–Уитни)
Интерлейкин изначально	37 [19–182]	12 [7–439]	0,479 (критерий Манна–Уитни)
Интерлейкин 24 ч после введения	319 [167–807,5]	16 [8–37]	0,017* (критерий Манна–Уитни)
Прокальцитонин изначально	0,14 [0,08–0,22]	0,23 [0,10–6,10]	0,497 (критерий Манна–Уитни)
Прокальцитонин 24 ч после введения	0,145 [0,06–0,16]	0,14 [0,08–0,18]	0,859 (критерий Манна–Уитни)
Д-димер изначально	359 [189–937]	391,5 [163–1193]	0,903 (критерий Манна–Уитни)
Д-димер 24 ч после введения	385 [297–1130]	332 [252–1009]	0,618 (критерий Манна–Уитни)
ЛДГ изначально	312 [275–422]	385 [265–443]	0,737 (критерий Манна–Уитни)
ЛДГ 24 ч после введения	341 [280–522]	245 [197–324]	0,005* (критерий Манна–Уитни)
Тромбоциты изначально	156 [135,5–193,5]	172 [143–185]	0,499 (критерий Манна–Уитни)
Тромбоциты 24 ч после введения	231 [175–300]	274,5 [222–357]	0,099 (критерий Манна–Уитни)
Летальность	10 (19,2%)	1 (5%)	0,275 (точный критерий Фишера)

увеличением числа тромбоцитов в периферической крови через 24 ч от момента введения препарата. Однако в данной группе пациентов не было отмечено положительной динамики по показателю ЛДГ, уровень которого достоверно ($p < 0,005$) увеличился и составил 341 ЕД/л (280–522 ЕД/л), а также показателю сатурации. Динамика опорных показателей у пациентов, принимавших тоцилизумаб, представлена в табл. 3.

Анализ основных клинико-лабораторных показателей в сравниваемой группе пациентов, принимавших только дексаметазон за тот же контрольный период,

показал тождественную положительную динамику по следующим показателям: СРБ — 11-кратное снижение относительно исходного уровня ($p < 0,001$); увеличение числа тромбоцитов в периферической крови ($p < 0,002$) до 274,5 (222–357) без влияния на показатель сатурации. Динамика опорных показателей у пациентов, принимавших дексаметазон, представлена в табл. 4.

Исходы во время госпитализации в инфекционном стационаре в основной группе: умерло 10 больных (19,2%): 1 (1,9%) пациент в возрасте до 60 лет; в возрастной группе старше 60 лет умерло 9 (17,3%) человек.

Таблица 3. Оценка динамики опорных показателей у пациентов, принимавших тоцилизумаб

Показатель	Исходно	Контрольный после введения	<i>p</i>
Температура	36,8 [36,6–37,4]	36,6 [36,45–36,8]	< 0,001* (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Сатурация	95,5 [93–96,5]	96 [94–97]	0,161 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Лейкоциты	7 [5,2–9]	5,7 [4,2–11]	0,945 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Лимфоциты	1,23 [0,84–1,57]	1,09 [0,70–1,75]	0,637 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
СРБ	72 [28,5–130,5]	7 [3,5–41,5]	< 0,001* (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Ферритин	499,5 [251–1033]	708 [375–904]	0,859 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Интерлейкин	37 [19–182]	319 [167–807,5]	0,144 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Прокальцитонин	0,14 [0,08–0,22]	0,145 [0,06–0,16]	0,498 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Д-димер	359 [189–937]	385 [297–1130]	0,878 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
ЛДГ	312 [275–422]	341 [280–522]	0,020* (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Тромбоциты	156 [135,5–193,5]	231 [175–300]	< 0,001* (критерий Уилкоксона для связанных выборок)

Исходы во время госпитализации в инфекционном стационаре в группе поддерживающей терапии/плюс дексаметазон: умер 1 (5%) человек в возрасте старше 60.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапевтическая стратегия с использованием препаратов моноклональных антител у пациентов с COVID-19 имеет ограничения по многим аспектам, включая ограничения по профилю безопасности, экономической затратности и недоказанной эффективности. Согласно рекомендациям ВОЗ, применение тоцилизумаба рекомендовано исключительно пациентам с критическим течением COVID-19. Однако в методических рекомендациях РФ предложено использовать данную стратегию лечения стационарным пациентам не только с тяжелым течением, но и со среднетяжелыми вариантами COVID-19 и факторами риска прогрессирования заболевания [22]. На сегодняшний день тоцилизумаб широко применяют в профильных больницах при лечении пациентов с COVID-19. Однако данные клинических испытаний тоцилизумаба и результаты реальной клинической практики все еще противоречивы.

В нашей оценке клинической эффективности тоцилизумаба у лиц с факторами риска мы исследовали общепринятые факторы риска прогрессирования заболевания, среди них и уровень СРБ, SpO₂. Следует отметить, что у наблюдаемой когорты пациентов лечение тоцилизумабом было связано с положительной динамикой некоторых лабораторных показателей: СРБ, тромбоциты.

Однако достоверного снижения риска прогрессирования заболевания до тяжелой формы в сравниваемых группах отмечено не было. После госпитализации респираторная поддержка требовалась в основной группе 37 (71,2%) пациентам, а в группе поддерживающей терапии — 9 (45%) пациентам. В основной группе 5 (9,6%) пациентов имели отрицательную динамику по синдрому дыхательной недостаточности, в группе с поддерживающей терапией — 1 (5%) пациент. Летальность пациентов в основной группе составила 10 (19,2%) пациентов, тогда как в группе поддерживающей терапии — 1 пациент (5%)

Наблюдаемое в когорте наших пациентов повышение уровня IL6 и резкое снижение уровня СРБ на фоне применения тоцилизумаба свидетельствуют об улучшении гипертосспалительного статуса, что отражено во многих наблюдениях и систематическом обзоре индивидуальных данных пациентов с обобщением начальных характеристик и клинических исходов пациентов с COVID-19, находящихся на терапии биологическим препаратом [23].

В нашем наблюдении было затруднительно выявить согласующиеся причинные факторы между первичной и конечной точками. Можем предположить, что поздняя госпитализация и связанное с ней позднее начало терапии тоцилизумабом стали причиной прогрессирования заболевания. Наши суждения согласуются с выводами ряда зарубежных исследований, свидетельствующими о том, что группа пациентов с поздним началом терапии тоцилизумабом чаще нуждалась в кислородной поддержке. Эти данные указывают на целесообразность более раннего назначения тоцилизумаба с целью

Таблица 4. Оценка динамики опорных показателей у пациентов, принимавших дексаметазон

Показатель	Исходно	Контрольный после введения	<i>p</i>
Температура	36,8 [36,6–37,35]	36,65 [36,5–36,8]	0,005 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Сатурация	95,5 [94,5–97]	96[95–98]	0,810 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Лейкоциты	7,05 [6,20–10,05]	8,35 [5,8–10,5]	0,140 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Лимфоциты	1,24 [0,85–1,64]	1,62 [1,14–1,84]	0,121 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
СРБ	74 [39,5–105,5]	6 [5–12,5]	0,001* (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Ферритин	319 [295–399]	1252 [783–1500]	1,000 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Интерлейкин	12 [7–439]	16 [8–37]	Только для одного пациента известны значения в обеих точках
Прокальцитонин	0,23 [0,10–6,10]	0,14 [0,08–0,18]	Только для одного пациента известны значения в обеих точках
Д-димер	391,5 [163–1193]	332 [252–1009]	0,500 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
ЛДГ	385 [265–443]	245 [197–324]	0,893 (критерий Уилкоксона для связанных выборок)
Тромбоциты	172 [143–185]	274,5 [222–357]	0,002* (критерий Уилкоксона для связанных выборок)

предотвращения прогрессирования синдрома генерализованного воспаления [21, 23]. Возможно, дополнительные малоизученные факторы помогут лучше объяснить неэффективность лечения тоцилизумабом. Поскольку потенциальные факторы вирулентности, связанные с вирусной мутацией и вирусной нагрузкой, не были изучены в настоящей работе, для детального выяснения факторов, связанных с ограничениями терапии тоцилизумабом, резонно опираться на более масштабные продолжающиеся когортные исследования, учитывающие мутации вируса.

При проведении анализа были учтены основные демографические факторы, такие как возраст, пол и сопутствующие заболевания. В течение периода наблюдения протоколы ведения пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 значительно не были изменены, однако имело место распространение различных вариантов SARS-CoV-2, в том числе и в РФ. В то же время наше наблюдение имеет ряд ограничений. Одним из них является меньшее число пациентов сравниваемой группы в отношении группы, принимавшей тоцилизумаб. Во-вторых, наблюдение проводили только в одной больнице и отдаленные результаты после направления пациентов

в учреждения амбулаторного звена не оценивали. Кроме того, имеет место еще одно ограничение: несмотря на подтверждение диагноза COVID-19 с помощью ОТ-ПЦР, мутации SARS-CoV-2 и уровень вирусной нагрузки нами не учитывались.

ВЫВОДЫ

Данное ретроспективное когортное исследование, в котором оценивали результаты лечения тоцилизумабом пациентов со среднетяжелым течением COVID-19, не продемонстрировало снижения риска прогрессирования заболевания до тяжелой формы и числа летальных случаев, что обусловлено рядом причин, основная из которых — позднее начало терапии. В связи с этим при лечении пациентов с COVID-19 препаратами моноклональных антител соответствующие условия и показания должны быть учтены и скорректированы в клинической практике. Целесообразно продолжение исследований по оценке клинической эффективности различных медикаментозных стратегий, включая биологическую, противовирусную и другие, с целью определения опорных критериев их инициации у различных групп пациентов.

Литература

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (2021). Available from: <https://covid19.who.int/> (Accessed 19 October, 2021).
2. Song P, Li W, Xie J, et al. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clin Chim Acta*. 2020; 509: 280–7. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.017.
3. Zhao Z, Wei Y, Tao C. An enlightening role for cytokine storm in coronavirus infection. *Clin Immunol*. 2021; 222: DOI: 10.1016/j.clim.2020.108615.
4. Moradian N, Gouravani M, Salehi MA, et al. Cytokine release syndrome: inhibition of pro-inflammatory cytokines as a solution for reducing COVID-19 mortality. *Eur Cytokine Netw*. 2020; 31 (3): 81–93. DOI: 10.1684/ecn.2020.0451.
5. Pum A, Ennemoser M, Adage T, Kungl AJ. Cytokines and Chemokines in SARS-CoV-2 Infections—Therapeutic Strategies Targeting Cytokine Storm. *Biomolecules*. 2021; 11 (1): DOI: 10.3390/biom11010091.
6. Nasonov E, Samsonov M. The role of Interleukin 6 inhibitors in therapy of severe COVID-19. *Biomed Pharmacother*. 2020; 131: DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110698.
7. Zhou Z, Price C. Overview on the use of IL6 agents in the treatment of patients with cytokine release syndrome (CRS) and pneumonitis related to COVID-19 disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2020; 29 (12): 1407–12. DOI: 10.1080/13543784.2020.1840549.
8. Chen J, Zhang L, Hou H, et al. Interleukin 6 signaling blockade treatment for cytokine release syndrome in COVID 19 (Review). *Exp Ther Med*. 2021; 21 (1): 24. DOI: 10.3892/etm.2020.9456.
9. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020; 368 (6490): 473–4. DOI: 1126/science. Abb 8925.
10. Kumar A, Sharma A, Tirpude NV, Sharma S, Padwad YS, Kumar S. Pharmac-immunomodulatory interventions for averting cytokine storm-linked disease severity in SARS-CoV-2 infection. *Inflammopharmacology*. 2022 Jan 20: 1–27. DOI: 10.1007/s10787-021-00903-x. Online ahead of print. PMID: 35048262.
11. Jiang Y, Rubin L, Peng T, Liu L, Xing X, Lazarovici P, Zheng W. Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. *Int J Biol Sci*. 2022 Jan 1; 18 (2): 459–72. DOI: 10.7150/ijbs.59272. eCollection 2022. PMID: 35002503.
12. Group A-TL-CS. A Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients With Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 384 (10): 905–14. DOI: 10.1056/NEJMoa2033130.
13. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhoore R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients With Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 384 (3): 238–51. DOI: 10.1056/NEJMoa2035002.
14. Verderese JP, Stepanova M, Lam B, Racila A, Kolacevski A, Allen D, et al. Neutralizing Monoclonal Antibody Treatment Reduces Hospitalization for Mild and Moderate COVID-19: A Real-World Experience. *Clin Infect Dis*. 2021; DOI: 10.1093/cid/ciab579.
15. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients With Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384 (3): 229–37. DOI: 10.1056/NEJMoa2029849.
16. Kulanthaivel S, Kaliberdenko VB, Balasundaram K, Shtrenshis MV, Scarpellini E, Abenavoli L. Tocilizumab in SARS-CoV-2 Patients with the Syndrome of Cytokine Storm: A Narrative Review. *Rev Recent Clin Trials*. 2021; 16 (2): 138–45. DOI: 10.2174/1574887115666200917110954. PMID: 32940187 Review.
17. Tleyjeh IM, Kashour Z, Riaz M, Hassett L, Veiga VC, Kashour T. Efficacy and safety of tocilizumab in COVID-19 patients: a living systematic review and meta-analysis, first update. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Aug; 27 (8): 1076–82. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.04.019. Epub 2021 Apr 27.
18. Cortegiani A, Ippolito M, Greco M, Granone V, Protti A, Gregoretto C, et al. Rationale and evidence on the use of tocilizumab in COVID-19: a systematic review. *Pulmonology*. 2021 Jan-Feb; 27 (1): 52–66. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2020.07.003. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32713784.
19. Salvarani C, Dolci G, Massari M, et al. Effect of tocilizumab vs standard care on clinical worsening in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2021; 181 (1): 24–31. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.6615.
20. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 383 (24): 2333–44. DOI: 10.1056/NEJMoa2028836.
21. Verderese JP, Stepanova M, Lam B, Racila A, Kolacevski A, Allen D, et al. Neutralizing Monoclonal Antibody Treatment Reduces Hospitalization for Mild and Moderate COVID-19: A Real-World Experience. *Clin Infect Dis*. 2021; DOI: 10.1093/cid/ciab579.
22. Временные методические рекомендации № 14 от 27.12.2021 «Профилактика, диагностика и лечение новой

коронавирусной инфекции (COVID-19)».

23. Antwi-Amoabeng D, Kanji Z, Ford B, Beutler BD, Riddle MS, Siddiqui F. Clinical outcomes in COVID-19 patients treated with

tocilizumab: An individual patient data systematic review. *J Med Virol.* 2020 Nov; 92 (11): 2516–22. DOI: 10.1002/jmv.26038. Epub 2020 Jun 9.

References

- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (2021). Available from: <https://covid19.who.int/> (Accessed 19 October, 2021).
- Song P, Li W, Xie J, et al. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clin Chim Acta.* 2020; 509: 280–7. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.017.
- Zhao Z, Wei Y, Tao C. An enlightening role for cytokine storm in coronavirus infection. *Clin Immunol.* 2021; 222: DOI: 10.1016/j.clim.2020.108615.
- Moradian N, Gouravani M, Salehi MA, et al. Cytokine release syndrome: inhibition of pro-inflammatory cytokines as a solution for reducing COVID-19 mortality. *Eur Cytokine Netw.* 2020; 31 (3): 81–93. DOI: 10.1684/ecn.2020.0451.
- Pum A, Ennemoser M, Adage T, Kungl AJ. Cytokines and Chemokines in SARS-CoV-2 Infections—Therapeutic Strategies Targeting Cytokine Storm. *Biomolecules.* 2021; 11 (1): DOI: 10.3390/biom11010091.
- Nasonov E, Samsonov M. The role of Interleukin 6 inhibitors in therapy of severe COVID-19. *Biomed Pharmacother.* 2020; 131: DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110698.
- Zhou Z, Price C. Overview on the use of IL6 agents in the treatment of patients with cytokine release syndrome (CRS) and pneumonitis related to COVID-19 disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020; 29 (12): 1407–12. DOI: 10.1080/13543784.2020.1840549.
- Chen J, Zhang L, Hou H, et al. Interleukin 6 signaling blockade treatment for cytokine release syndrome in COVID 19 (Review). *Exp Ther Med.* 2021; 21 (1): 24. DOI: 10.3892/etm.2020.9456.
- Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science.* 2020; 368 (6490): 473–4. DOI: 1126/science. Abb 8925.
- Kumar A, Sharma A, Tirpude NV, Sharma S, Padwad YS, Kumar S. Pharmac-immunomodulatory interventions for averting cytokine storm-linked disease severity in SARS-CoV-2 infection. *Inflammopharmacology.* 2022 Jan 20: 1–27. DOI: 10.1007/s10787-021-00903-x. Online ahead of print. PMID: 35048262.
- Jiang Y, Rubin L, Peng T, Liu L, Xing X, Lazarovici P, Zheng W. Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. *Int J Biol Sci.* 2022 Jan 1; 18 (2): 459–72. DOI: 10.7150/ijbs.59272. eCollection 2022. PMID: 35002503.
- Group A-TL-CS. A Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients With Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 384 (10): 905–14. DOI: 10.1056/NEJMoa2033130.
- Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients With Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 384 (3): 238–51. DOI: 10.1056/NEJMoa2035002.
- Verdere JP, Stepanova M, Lam B, Racila A, Kolacevski A, Allen D, et al. Neutralizing Monoclonal Antibody Treatment Reduces Hospitalization for Mild and Moderate COVID-19: A Real-World Experience. *Clin Infect Dis.* 2021; DOI: 10.1093/cid/ciab579.
- Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients With Covid-19. *N Engl J Med.* 2021; 384 (3): 229–37. DOI: 10.1056/NEJMoa2029849.
- Kulanthaivel S, Kaliberdenko VB, Balasundaram K, Shtrenshis MV, Scarpellini E, Abenavoli L. Tocilizumab in SARS-CoV-2 Patients with the Syndrome of Cytokine Storm: A Narrative Review. *Rev Recent Clin Trials.* 2021; 16 (2): 138–45. DOI: 10.2174/1574887115666200917110954. PMID: 32940187 Review.
- Tleyjeh IM, Kashour Z, Riaz M, Hassett L, Veiga VC, Kashour T. Efficacy and safety of tocilizumab in COVID-19 patients: a living systematic review and meta-analysis, first update. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Aug; 27 (8): 1076–82. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.04.019. Epub 2021 Apr 27.
- Cortegiani A, Ippolito M, Greco M, Granone V, Protti A, Gregoretti C, et al. Rationale and evidence on the use of tocilizumab in COVID-19: a systematic review. *Pulmonology.* 2021 Jan-Feb; 27 (1): 52–66. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2020.07.003. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32713784.
- Salvarani C, Dolci G, Massari M, et al. Effect of tocilizumab vs standard care on clinical worsening in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2021; 181 (1): 24–31. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.6615.
- Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 383 (24): 2333–44. DOI: 10.1056/NEJMoa2028836.
- Verdere JP, Stepanova M, Lam B, Racila A, Kolacevski A, Allen D, et al. Neutralizing Monoclonal Antibody Treatment Reduces Hospitalization for Mild and Moderate COVID-19: A Real-World Experience. *Clin Infect Dis.* 2021; DOI: 10.1093/cid/ciab579.
- Vremennye metodicheskie rekomendacii # 14 ot 27.12.2021 «Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19)». Russian.
- Antwi-Amoabeng D, Kanji Z, Ford B, Beutler BD, Riddle MS, Siddiqui F. Clinical outcomes in COVID-19 patients treated with tocilizumab: An individual patient data systematic review. *J Med Virol.* 2020 Nov; 92 (11): 2516–22. DOI: 10.1002/jmv.26038. Epub 2020 Jun 9.

МИКРОГЛИЯ И ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МАКРОФАГИ СУБФОРНИКАЛЬНОГО ОРГАНА: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

В. В. Гусельникова^{1,2} ✉, В. А. Разенкова¹, Д. А. Суфиева¹, Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

Субфорникальный орган является важным регулятором водно-солевого обмена и энергетического баланса организма, участвует в контроле работы сердечно-сосудистой системы и иммунной регуляции. В состав субфорникального органа входят разные клеточные популяции, среди которых неохарактеризованными остаются микроглия и макрофаги. Целью работы было изучить структурные, цитохимические и функциональные характеристики микроглии и макрофагов субфорникального органа головного мозга крысы. Исследовали образцы головного мозга половозрелых крыс-самцов породы Вистар ($n = 8$). Для выявления микроглии и макрофагов применяли поли- и моноклональные антитела против кальций-связывающего белка Iba1 и лизосомного белка CD68 и анализировали препараты методами световой и конфокальной лазерной микроскопии. В рамках исследования дана комплексная морфологическая характеристика клеток микроглии и макрофагов субфорникального органа. Показано, что большинство Iba1-содержащих клеток этой области головного мозга являются микроглиями, а не макрофагами. Микроглия субфорникального органа находится в преактивированном состоянии, что может быть обусловлено структурно-функциональными особенностями этого органа и специфическими функциями местной микроглии. Среди Iba1-содержащих клеток в субфорникальном органе выявлена особая популяция субependимных микроглиями, отростки которых проникают в полость третьего желудочка головного мозга. Помимо микроглии в субфорникальном органе обнаружены единичные тканевые макрофаги, для которых характерно высокое содержанием CD68, но незначительное количество или отсутствие Iba1.

Ключевые слова: субфорникальный орган, микроглия, макрофаги, циркумвентрикулярные органы

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>

Вклад авторов: В. В. Гусельникова — анализ литературы, интерпретация результатов, подготовка рукописи; В. А. Разенкова — отработка протоколов иммунофлуоресцентных реакций, проведение конфокальной лазерной микроскопии; Д. А. Суфиева — гистологическая проводка биологического материала, постановка иммуногистохимических реакций для световой микроскопии; Д. Э. Коржевский — концепция, планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/22 от 18 февраля 2022 г.), проведено в полном соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

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

Статья получена: 27.03.2022 **Статья принята к печати:** 18.04.2022 **Опубликована онлайн:** 28.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.020

MICROGLIA AND PUTATIVE MACROPHAGES OF THE SUBFORNICAL ORGAN: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES

Guselnikova VV^{1,2} ✉, Razenkova VA¹, Sufieva DA¹, Korzhevskii DE¹

¹ Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia

² St Petersburg State University, St Petersburg, Russia

The subforanical organ is an important regulator of water-salt metabolism and energy balance of the body, involved in the control of the cardiovascular system and immune regulation. The organ comprises several cell populations, among which microglia and macrophages remain uncharacterized. The study aimed at structural, cytochemical, and functional characterization of microglia and macrophages of the subforanical organ in rats. Brain specimens were collected from mature male Wistar rats ($n = 8$). Microglia and macrophages were revealed by immunostaining with poly- and monoclonal antibodies against calcium-binding protein Iba1 and lysosomal protein CD68; the slides were examined by light and confocal laser microscopy. The study provides a complex morphological characterization of microglial cells and macrophages of the subforanical organ. We demonstrate that the majority of Iba1-expressing cells in this area of the brain are microglial cells, not macrophages. Microglia of the subforanical organ reveals preactivated state, which may reflect structural and functional features of this organ and specific functions of local microglia. Subependymal microglial cells, the processes of which penetrate into the cavity of the third ventricle of the brain, constitute a distinct subpopulation among the Iba1-expressing cells of the subforanical organ. Apart from microglial elements, the subforanical organ contains sparse tissue macrophages with characteristic strong expression of CD68 accompanied by undetectable or weak expression of Iba1.

Keywords: subforanical organ, microglia, macrophages, circumventricular organs

Funding: the study was supported by Russian Science Foundation, RSF Project № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>

Author contribution: Guselnikova VV — literature analysis, interpretation of the results, manuscript preparation; Razenkova VA — fluorescence immunoassay protocols development, confocal laser microscopy; Sufieva DA — histological processing, immunochemical staining, light microscopy; Korzhevskii DE — concept and planning of the study, editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Institute of Experimental Medicine (Protocol № 1/22 of 18 February 2022) and carried out in full compliance with the 2013 Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria V. Guselnikova
Akad. Pavlova, 12, St Petersburg, 197376, Russia; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Received: 27.03.2022 **Accepted:** 18.04.2022 **Published online:** 28.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.020

Субфорникальный орган (*organum subfornicum*) локализован вблизи свода конечного мозга (fornix) вдоль передней стенки третьего желудочка, где занимает дорсальный конец терминальной пластинки, немного выступая в просвет третьего желудочка. Важный регулятор водно-солевого обмена и энергетического баланса организма, он участвует в контроле работы сердечно-сосудистой системы и иммунной регуляции [1, 2]. Это обуславливает интерес исследователей к изучению общей структуры и клеточного состава субфорникального органа, который остается на сегодняшний день одной из самых загадочных структур мозга.

Микроглия и макрофаги являются резидентами субфорникального органа. Эти два типа клеток выполняют схожие функции, однако различаются структурно (по профилю экспрессии ряда генов и иммунофенотипу) и онтогенетически (по источнику происхождения). Важность их изучения в контексте исследований субфорникального органа определяется тем, что он относится к циркумвентрикулярным органам, для которых характерно отсутствие гемато-энцефалического барьера. Вследствие этого местные макрофаги и микроглия, в отличие от аналогичных клеток в других отделах головного мозга, находятся в постоянном контакте с циркулирующими в крови молекулами [3], что подразумевает наличие у этих клеток определенных структурно-функциональных особенностей. Еще большую актуальность изучение микроглии и макрофагов субфорникального органа приобретает в связи с его возможной вовлеченностью в течение коронавирусной инфекции. В настоящее время известно, что SARS-CoV-2 обладает сильным нейротропизмом [4]. Как полагают, хроническая активация микроглии, наблюдаемая в циркумвентрикулярных органах в норме, способствует тому, что микроглия в этих областях обладает повышенной чувствительностью и гиперактивируется в ответ на любые патологические воздействия (например, на инфицирование SARS-CoV-2) [5]. Следствие гиперактивации — формирование провоспалительного фенотипа микроглии, что сопровождается активным синтезом провоспалительных медиаторов и усилением фагоцитоза. В результате, при инфицировании SARS-CoV-2 в циркумвентрикулярных органах развивается нейровоспаление, приводящее к нейродегенерации. Кроме того, активацию микроглии сопровождается увеличением ее подвижности, что приводит к миграции амебоидной микроглии в другие области мозга и способствует распространению нейровоспаления [5], что может быть одной из причин развития неврологических симптомов у пациентов с коронавирусной инфекцией.

Цель работы — изучение структурных, цитохимических и функциональных характеристик микроглии и макрофагов субфорникального органа головного мозга крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на образцах головного мозга половозрелых (3–5 месяцев) крыс-самцов породы Вистар ($n = 8$). Животные были получены из питомника лабораторных животных «Раполово» (Ленинградская область, Россия) и содержались в виварии при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота и свободным доступом к корму и воде. Образцы головного мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [6] и заливали в парафин (Paraffin Type 6, ThermoScientific Richard-Allan Scientific; США) по стандартной методике. С парафиновых блоков на

ротационном микротоме Microm HM 325 (ThermoScientific; США) изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм, содержащие область субфорникального органа, которые наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Menzel; Германия). После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации срезы подвергали тепловому демаскированию в 10%-м водном растворе тиосульфата натрия в течение 23 мин [7].

Для светооптического исследования микроглии и/или макрофагов применяли кроличьи поликлональные антитела к Iba1 (Biocare medical; США) в разведении 1 : 1500 и мышиные моноклональные (клон ED1) антитела к CD68 (Abcam; Великобритания) в разведении 1 : 4000. В качестве вторичного реагента использовали набор Reveal Rabbit Specific HRP-DAB Detection System в разведении производителя (Spring Bioscience; США). Для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3'3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent; США). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином.

Для иммунофлуоресцентного выявления Iba1 на срезы наносили кроличьи поликлональные антитела в разведении 1 : 1000 (Biocare medical; США). Для визуализации комплекса антиген-антитело использовали сначала Reveal Rabbit Specific HRP-DAB Detection System в разведении производителя (Spring Bioscience; США), а затем козы антитела против HRP, конъюгированные с флуорохромом Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure Goat antihorseradish Peroxidase, Jackson Immuno Research; США). Для подкраски ядер клеток применяли ядерный флуоресцентный краситель SYTOX Green (InvitroGen; США).

Для постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 на срезы наносили смесь кроличьих поликлональных антител к Iba1 в разведении 1 : 500 (Biocare medical; США) и мышиных моноклональных антител к CD68 в разведении 1 : 1000 (Agilent; США) в соотношении 1 : 1. В качестве вторичных реагентов применяли смесь антител против иммуноглобулинов кролика, меченных биотином (из набора R&D Systems; США), и реагента EnVision+HRP-Anti-Mouse (Agilent; США). После инкубации в смеси вторичных антител срезы последовательно обрабатывали раствором конъюгата стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch; США) и раствором антител против HRP, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (Jackson Immuno Research; США).

Анализ и фотографирование препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Leica; Германия), оснащенного фотокамерой ICC50 (Leica; Германия), и конфокального лазерного микроскопа LSM800 (Zeiss; Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 и SYTOX Green применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 — 561 нм. Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерных программ ZEN2012 и LSM Image Browser (Zeiss; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты иммуногистохимического выявления кальций-связывающего белка Iba1

После постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1, являющийся маркерным белком микроглии и макрофагов, иммунопозитивные клетки в области субфорникального органа были

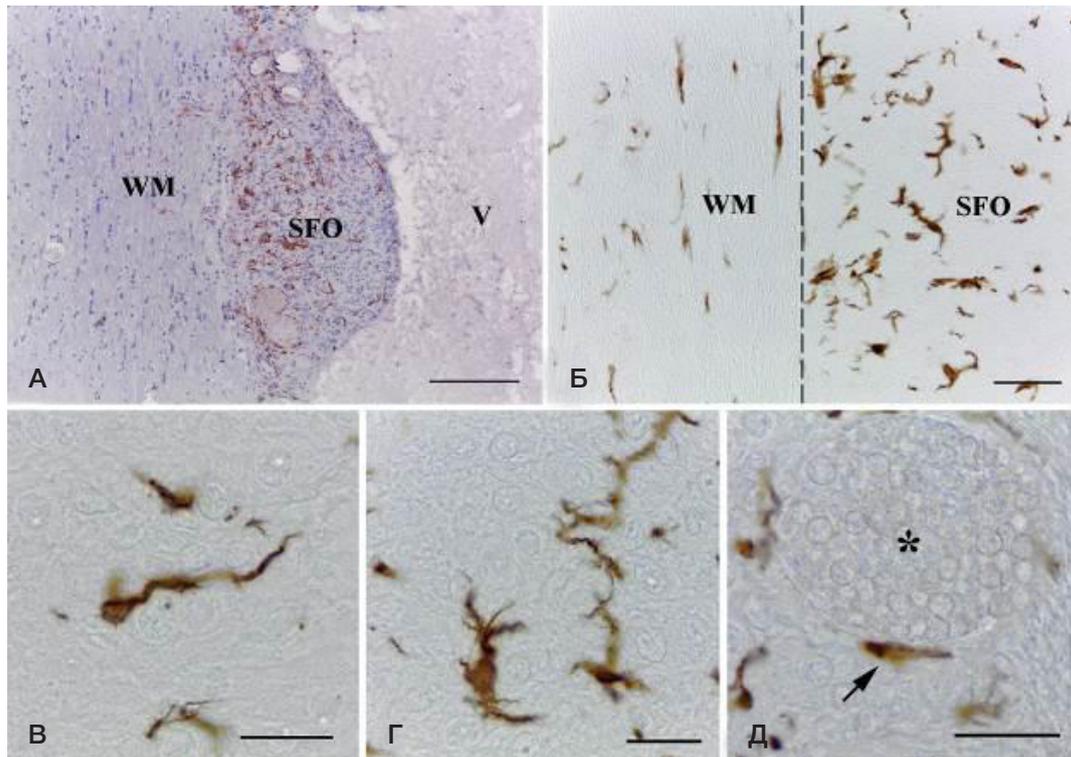


Рис. 1. Iba1-иммунопозитивные клетки в субфорникальном органе и прилегающем белом веществе головного мозга крысы. **А.** Общий вид. **Б.** Граница субфорникального органа и подлежащего белого вещества. **В–Г.** Разные морфотипы Iba1-иммунопозитивных клеток в пределах субфорникального органа. SFO — субфорникальный орган, WM — белое вещество, V — просвет третьего желудочка мозга, пунктирная линия — граница субфорникального органа и белого вещества, звездочка — просвет кровеносного сосуда, стрелка указывает на периваскулярную малоотростчатую клетку, содержащую Iba1. Масштабный отрезок равен 200 мкм (**А**), 50 мкм (**Б**), 20 мкм (**В–Г**)

идентифицированы во всех исследованных образцах головного мозга (рис. 1). При анализе препаратов на малом увеличении микроскопа ($\times 10$) субфорникальный орган хорошо визуализируется и выглядит как компактное клеточное скопление, вдающееся в просвет третьего желудочка (рис. 1А, SFO). Он характеризуется высокой клеточной плотностью, выявляемой за счет подкраски ядер клеток гематоксилином (рис. 1А, SFO, *синий цвет*), а также высокоинтенсивной реакцией на Iba1 (рис. 1А, SFO, *коричневый цвет*). Уже при малом увеличении микроскопа видно, что в субфорникальном органе присутствует большое количество Iba1-иммунопозитивных элементов,

распределенных относительно равномерно в пределах органа.

При анализе области субфорникального органа и его границы с прилегающим белым веществом при большом увеличении микроскопа ($\times 40$, $\times 100$) отмечено, что продукт иммуногистохимической реакции на Iba1 сосредоточен в отростчатых клетках (рис. 1Б–Д, *коричневый цвет*). Морфология выявленных клеток существенно различается. В белом веществе (рис. 1Б, WM) большинство Iba1-иммунопозитивных клеток имеют веретеновидную форму, которая характеризуется присутствием двух длинных неветвящихся или слабоветвящихся отростков, отходящих

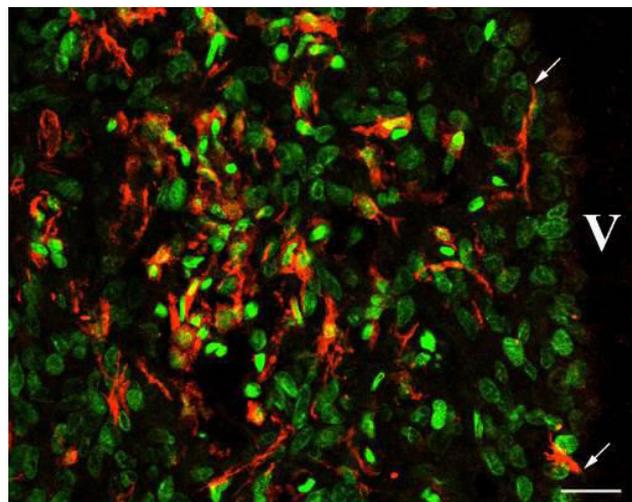


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное выявление Iba1-содержащих клеток в субфорникальном органе головного мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция на Iba1, визуализация с помощью флуорохрома Cy3 (*красный цвет*), ядра подкрасены ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green (*зеленый цвет*). V — просвет третьего желудочка, стрелка указывает на отростки Iba1-содержащих клеток, выходящие в полость желудочка. Масштабный отрезок равен 20 мкм

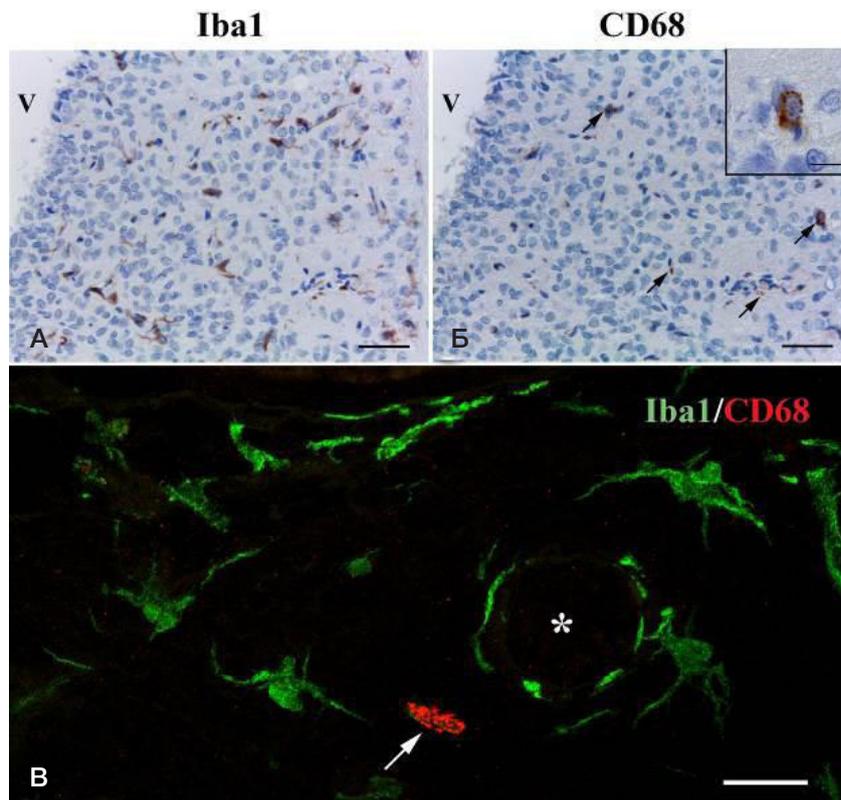


Рис. 3. Распределение Iba1- и CD68-иммуоокрашивания в субфорникальном органе головного мозга крысы. **А.** Иммуногистохимическая реакция на Iba1 с подкраской ядер клеток квасцовым гематоксилином. **Б.** Иммуногистохимическая реакция на CD68 с подкраской ядер клеток квасцовым гематоксилином, стрелка указывает на CD68-иммунопозитивные структуры в пределах субфорникального органа, выноска — увеличенный фрагмент рисунка **Б**, содержащий CD68-иммунопозитивную клетку. На рисунках **А** и **Б** представлен идентичный участок серийных срезов одного и того же случая (световая микроскопия). **В.** Двойная иммунофлуоресцентная реакция Iba1/CD68. Иммуногистохимическая реакция на Iba1, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет), и иммуногистохимическая реакция на CD68, визуализация с помощью флуорохрома Cy3 (красный цвет). Стрелка указывает на CD68-содержащую клетку, звездочка — просвет кровеносного сосуда (конфокальная лазерная микроскопия). Масштабный отрезок равен 50 мкм (**А**, **Б**), 10 мкм (**Б**, вставка, **В**)

от разных полюсов тела клетки в противоположных направлениях. Тела и отростки этих клеток ориентированы вдоль нервных волокон (рис. 1Б, WM, *коричневый цвет*). В субфорникальном органе (рис. 1Б–Д, SFO) Iba1-содержащие клетки визуально более крупные по сравнению с соответствующими клетками в составе белого вещества. Они имеют более сложную архитектуру отростков и обладают высокой морфологической гетерогенностью. Среди Iba1-содержащих клеток субфорникального органа можно выделить клетки веретеновидной формы, которые характеризуются небольшим телом с отходящим от него длинным неветвящимся отростком (рис. 1В, *коричневый цвет*). Другой морфотип Iba1-иммунопозитивных клеток субфорникального органа характеризуется наличием относительно толстых, умеренно ветвящихся в разных направлениях отростков (рис. 1Г, *коричневый цвет*). Наконец, вблизи сосудов субфорникального органа были выявлены периваскулярные Iba1-иммунопозитивные малоотростчатые клетки, распластаные по периметру расширенных тонкостенных сосудов (рис. 1Д, *стрелка*).

Аналогичные результаты были получены при иммунофлуоресцентном выявлении Iba1 (рис. 2). В области субфорникального органа отмечено присутствие большого количества клеточных элементов, выявляемых за счет подкраски ядер клеток флуоресцентным красителем Sytox Green (рис. 2, *зеленая флуоресценция*). Иммунофлуоресцентное выявление Iba1, как и светооптическое исследование, продемонстрировало высокую плотность Iba1-содержащих клеток в пределах субфорникального органа (рис. 2, *красная флуоресценция*). При изучении этих клеток на большом

увеличении микроскопа была отмечена их высокая морфологическая гетерогенность. В случае использования метода иммунофлуоресценции более контрастно (по сравнению со световой микроскопией) визуализировались тонкие отростки Iba1-содержащих клеток, что позволило описать особую субпопуляцию этих клеток, локализованную в области выстилки третьего желудочка на уровне субфорникального органа. Тела этих Iba1-иммунопозитивных клеток непосредственно примыкали к клеткам выстилки и часто были распластаны вдоль нее, а тонкие отростки тянулись сквозь ряды клеток выстилки и доходили до просвета третьего желудочка мозга (рис. 2Б, *стрелка*).

Результаты иммуногистохимического выявления CD68

При сопоставлении результатов Iba1-иммуоокрашивания (рис. 3А) и CD68-иммуоокрашивания (рис. 3Б), выполненных на серийных срезах одного и того же случая, было отмечено, что в области субфорникального органа плотность CD68-иммунопозитивных элементов визуально существенно ниже плотности Iba1-иммунопозитивных структур. В пределах субфорникального органа визуализируются лишь единичные CD68-иммунопозитивные элементы, которые локализованы в паренхиме органа или периваскулярно. В большинстве случаев продукт иммуногистохимической реакции обнаружен в виде отдельных мелких CD68-иммунопозитивных гранул, распределенных в нервной ткани (рис. 3Б, *стрелка*). Лишь изредка при проведении CD68-иммуоокрашивания четко визуализируются клеточные границы. В этом случае

иммунопозитивные клетки имеют овальную или вытянутую форму и выраженную гранулярность в цитоплазме (рис. 3Б, *выноска*).

При постановке двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 было показано, что большинство присутствующих в субфорникальном органе клеток являются Iba1+/CD68- (рис. 3В, *зеленая флуоресценция*). Эти клетки имеют отростчатую форму и гетерогенную морфологию, как и Iba1-иммунопозитивные клетки, выявляемые при проведении светооптического исследования. Единичные клетки субфорникального органа содержат CD68, но не имеют Iba1, т. е. являются Iba1-/CD68+. Форма таких клеток овальная или вытянутая, отростки не визуализируются, а цитоплазма характеризуется выраженной гранулярностью (рис. 3В; *стрелка, красная флуоресценция*). В некоторых CD68-иммунопозитивных клетках Iba1 присутствует в небольшом количестве, но при этом он никогда не колокализован с CD68.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Субфорникальный орган остается на сегодня одной из самых мало исследованных структур головного мозга. Основные научные результаты, связанные с его изучением, были получены в 1960–80-х гг. Тогда было показано, что субфорникальный орган имеет синаптические входы от ядра одиночного пути [8], латеральной области гипоталамуса и срединного ядра [9], и сам направляет проекции в различные центры мозга, в том числе в паравентрикулярное ядро и латеральную область гипоталамуса [10], аркуатное ядро [11], срединное преоптическое ядро [9]. В те же годы была установлена важная роль субфорникального органа в осморегуляции [12] и работе сердечно-сосудистой системы [13]. Очевидно, что все эти данные, а также сведения о клеточном составе субфорникального органа, нуждаются в проверке и уточнении с применением современных иммуноморфологических методов. В 2021 г. проведено комплексное морфологическое исследование по изучению особенностей структурно-функциональной организации разных субпопуляций нейронов и астроцитов, а также клеток сосудистого русла субфорникального органа у крысы [2], однако полностью незатронутыми остались такие важнейшие клетки, как макрофаги и микроглия.

Микроглия и тканевые макрофаги мозга осуществляют иммунную функцию, формируя первую линию защиты центральной нервной системы от различных возбудителей инфекций, способных преодолевать эндотелиальный барьер. Несмотря на схожие функции, эти клеточные популяции имеют разное происхождение [14]. В эмбриогенезе предшественники микроглии образуются во внезародышевом желточном мешке в ходе первой волны кроветворения, мигрируют в развивающийся мозг до закрытия гематоэнцефалического барьера и дифференцируются в микроглиальные клетки, формируя самоподдерживающуюся популяцию. Другие макрофагальные клетки, присутствующие в мозге (менингеальные макрофаги, периваскулярные макрофаги и макрофаги сосудистого сплетения) происходят от эритро-миелоидных клеток-предшественников и гемопоэтических стволовых клеток, которые образуются в эмбриональной печени и костном мозге в ходе второй и третьей волн кроветворения. Таким образом, в отличие от других макрофагов, дифферон микроглии лишен стадии моноцитов [15–17]. Помимо происхождения, микроглиоциты отличаются от других

макрофагов мозга по ряду структурных характеристик. Так, микроглия демонстрирует низкий уровень экспрессии трансмембранной тирозинфосфатазы CD45 и уникальную экспрессию молекул P2RY12, Sall1 и Tmem119. Другим макрофаги мозга характеризуются высоким (по сравнению с микроглией) уровнем экспрессии CD45 и молекул главного комплекса гистосовместимости класса II, что предполагает важную антиген-презентирующую роль этих клеток. В отличие от микроглии, периваскулярные и менингеальные макрофаги имеют высокий уровень экспрессии молекулы CD206, известной как макрофагальный маннозный рецептор [18].

Считается, что в норме (при отсутствии патологических процессов) микроглиальные клетки характеризуются наличием многочисленных тонких ветвящихся отростков, которые осуществляют постоянный мониторинг микроокружения на наличие потенциальных угроз (так называемая наблюдающая или покоящаяся микроглия). При появлении патологического стимула микроглия переходит в активированное состояние с формированием амебоидной микроглии. При трансформации отростчатой микроглии в амебоидную происходит увеличение размеров тела клетки (за счет возрастания объема перинуклеарной цитоплазмы), укорочение и утолщение отростков. Эти изменения в морфологии микроглии соответствуют увеличению ее фагоцитарной активности и/или усилению продукции цитокинов [19, 20]. Иными словами, морфологические особенности клеток микроглии отражают функциональный статус этих клеток.

В рамках проведенного нами исследования для оценки морфофункционального состояния микроглии субфорникального органа в качестве маркера был выбран кальций-связывающий белок Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1). На сегодня он остается наиболее широко используемым иммуногистохимическим маркером микроглии [21]. Тем не менее, Iba1 не является специфичным маркером только клеток микроглии, а выявляет также в типичных тканевых макрофагах, таких как клетки Купфера [22]. Применение антител против этого белка позволяет выявлять как покоящуюся, так и активированную микроглию, а также все промежуточные состояния [20, 23]. Равномерное распределение Iba1 в цитоплазме микроглиоцитов дает возможность максимально полно охарактеризовать структурные особенности этих клеток [24]. Все это обуславливает широкое использование Iba1 в качестве маркера для изучения этой клеточной популяции. При применении антител против Iba1 в субфорникальном органе крысы нами были выявлены многочисленные отростчатые Iba1-иммунопозитивные клетки, морфологически соответствующие микроглиоцитам. Были отмечены высокая плотность клеток микроглии в субфорникальном органе и их выраженная морфологическая гетерогенность. Кроме того, по сравнению с классической покоящейся микроглией, выявленные клетки имели более толстые и короткие отростки с уменьшенным ветвлением. Классической амебоидной микроглии нами не было обнаружено ни в одном из исследованных случаев. Это позволяет заключить, что все выявленные в субфорникальном органе микроглиальные клетки имеют промежуточный статус между активированной и покоящейся микроглией, который можно охарактеризовать как преактивированное состояние.

Важно отметить, что субфорникальный орган является одним из циркумвентрикулярных органов,

характерной особенностью которых служит отсутствие гематоэнцефалического барьера. Ранее признаки активации микроглии в норме были отмечены для других циркумвентрикулярных органов. Так, продемонстрировано присутствие высоко активированной микроглии в циркумвентрикулярных органах у мыши в физиологических условиях [3]. Активация микроглии в данном случае выражалась в том, что общая длина и число отростков микроглиальных клеток были значительно меньше, чем в других областях мозга, а уровень экспрессии молекулярных маркеров активации, наоборот, повышен. Сильная активация микроглии в норме характерна также для области срединного возвышения головного мозга крысы [25].

Вопрос о том, чем именно обусловлена хроническая активация микроглии в циркумвентрикулярных органах, остается на сегодня открытым. Очевидно, что это связано с особенностями структурно-функциональной организации этих органов. Одной из таких особенностей является присутствие здесь капилляров фенестрированного типа, вследствие чего клетки микроглии в циркумвентрикулярных органах находятся в постоянном контакте с циркулирующими в крови молекулами (в отличие от микроглии других областей мозга, где этому препятствует гематоэнцефалический барьер). Вероятной функцией микроглии в данном случае может быть фагоцитирование нейротоксических молекул, поступающих из кровеносного русла, с целью поддержания нормального микроокружения в циркумвентрикулярных органах [3]. Еще одна возможная функция активированной микроглии — участие в структурной реорганизации этих зон. Ранее было показано, что в циркумвентрикулярных органах осуществляется интенсивный ангиогенез, сопровождающийся постоянной пролиферацией и апоптозом эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. В свою очередь, для активированной микроглии показана способность регулировать пролиферативную активность эндотелия, а также участвовать в удалении апоптотических телец, оставшихся от погибших эндотелиальных клеток [26, 27]. Наконец, микроглия может быть вовлечена в процессы нейрогенеза, и приобретает при этом активированный морфотип. Присутствие нейрональных стволовых клеток было недавно продемонстрировано для некоторых циркумвентрикулярных органов, в том числе для субфорникального органа [28, 29]. Это позволяет предполагать возможный вклад активированной микроглии в формирование в этом органе нейрогенных ниш, что ранее было отмечено для субвентрикулярной зоны боковых желудочков и субгранулярной зоны зубчатой извилина гиппокампа [30].

Интересным наблюдением в рамках проведенного нами исследования стало описание в области выстилки субфорникального органа особых клеток микроглии, направляющих свои отростки в полость третьего желудочка. Ранее аналогичные клетки были описаны в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и обозначены как субэпендимные микроглиоциты [31]. Тесный контакт субэпендимной микроглии со спинномозговой жидкостью может указывать на контроль этими клетками ее состава.

Одной из проблем, возникающих при исследовании микроглии, является морфологическое и цитохимическое сходство этих клеток с тканевыми макрофагами мозга. Микроглия и макрофаги имеют разное происхождение, но характеризуются наличием целого ряда общих маркерных белков, среди которых и Iba1 [32]. Основываясь исключительно на результатах иммуногистохимического

окрашивания на белок Iba1, однозначно разделить эти две клеточные популяции представляется затруднительным. Чтобы решить вопрос о природе Iba1-иммунопозитивных клеток, присутствующих в составе субфорникального органа, нами была дополнительно поставлена иммуногистохимическая реакция на белок CD68 (трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 110 кДа). Он присутствует в мембране эндосом и лизосом, являясь маркером фагоцитарной активности клетки. CD68 высоко экспрессирован в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, и его широко используют для иммуногистохимического выявления клеток Купфера, альвеолярных макрофагов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и др. [33, 34].

При использовании антител против CD68 и сопоставлении полученных результатов с Iba1-иммуноокрашиванием, нами было отмечено, что в субфорникальном органе присутствуют лишь единичные CD68-содержащие клетки, морфологически схожие с макрофагами. Большинство Iba1-иммунопозитивных клеток не содержит CD68, что позволяет считать эти клетки микроглией. Отсутствие у микроглиоцитов субфорникального органа молекулы CD68 указывает на малое число лизосом у этих клеток, несмотря на наличие у них морфологических признаков активации. Вероятно, функции микроглии субфорникального органа не связаны с активным фагоцитозом, а хроническая активация этих клеток обусловлена другими их функциями, которые еще предстоит изучить. Неожиданным наблюдением оказалось то, что выявленные CD68-иммунопозитивные макрофаги характеризуются полным отсутствием (или незначительным содержанием) белка Iba1. Согласно литературным данным, Iba1 присутствует в тканевых макрофагах мозга в большом количестве, что подтверждается в том числе нашими данными, полученными при исследовании других отделов головного мозга лабораторных животных и человека [35, 36]. Вероятно, отсутствие в макрофагах субфорникального органа этого белка является цитохимической особенностью именно этой региональной клеточной популяции.

ВЫВОДЫ

Большинство Iba1-содержащих клеток субфорникального органа являются микроглиоцитами, а не макрофагами. Микроглия субфорникального органа находится в преактивированном состоянии, что может быть обусловлено структурно-функциональными особенностями этого органа и специфическими функциями местной микроглии. Среди клеток субфорникального органа присутствует особая популяция субэпендимных микроглиоцитов, отростки которых проникают в полость третьего желудочка и контактируют со спинномозговой жидкостью. Помимо микроглии в состав субфорникального органа входят единичные тканевые макрофаги, которые характеризуются высоким содержанием CD68, но незначительным количеством или отсутствием Iba1. Важность дальнейшего изучения микроглии и макрофагов определяется участием этих клеток не только в регуляции нормальной работы нервной системы, но и их вовлеченностью в развитие процессов нейровоспаления и нейродегенерации. С этой точки зрения, исследования микроглии и макрофагов представляются перспективными в контексте поиска новых мишеней для направленной фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний.

Литература

- McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2003; 172: III–XII, 1–122. DOI: 10.1007/978-3-642-55532-9.
- Hicks A-I, Kobrinsky S, Zhou S, Yang J, Prager-Khoutorsky M. Anatomical organization of the rat subfornical organ. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 691711. DOI: 10.3389/fncel.2021.691711.
- Takagi S, Furube E, Nakano Y, Morita M, Miyata S. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *J Neuroimmunol.* 2019; 331: 74–86. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.10.008.
- DosSantos MF, Devalle S, Aran V, Capra D, Roque NR, Coelho-Aguiar JdM, et al. Neuromechanisms of SARS-CoV-2: A Review *Front Neuroanat.* 2020; 14: 37. DOI: 10.3389/fnana.2020.00037.
- Tremblay M-E, Madore C, Bordeleau M, Tian L, Verkhratsky A. Neuropathobiology of COVID-19: The Role for Glia. *Front. Cell. Neurosci.* 2020; 14: 592214. DOI: 10.3389/fncel.2020.592214.
- Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem.* 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Алексеева О. С. Способ демаскирования антигенов при проведении иммуноцитохимических реакций. Патент РФ №2719163. 17.04.2020.
- Tanaka J, Hayashi Y, Shimamune S, Nomura M. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* 1997; 777: 237–41. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)01211-0.
- Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. *Brain Res.* 1984; 321: 209–15. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90174-4.
- Miselis RR. The subfornical organ's neural connections and their role in water balance. *Peptides.* 1982; 3: 501–2. DOI: 10.1016/0196-9781(82)90115-2.
- Gruber K, McRae-Degueurce A, Wilkin LD, Mitchell LD, Johnson AK. Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions. *Neurosci Lett.* 1987; 75: 1–5. DOI: 10.1016/0304-3940(87)90065-6.
- Felix D. Peptide and acetylcholine action on neurones of the cat subfornical organ. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1976; 292: 15–20. DOI: 10.1007/BF00506484.
- Mangiapan ML, Simpson JB. Drinking and pressor responses after acetylcholine injection into subfornical organ. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1983; 244: R508–13. DOI: 10.1152/ajpregu.1983.244.4.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18 (4): 225–42. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature.* 2015; 518: 547–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, et al. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity.* 2015; 42 (4): 665–78. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.03.011.
- Bennett ML, Bennett FC. The influence of environment and origin on brain resident macrophages and implications for therapy. *Nat Neurosci.* 2020; 23: 157–166. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0545-6>
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology.* 2017; 18 (4): 385–92. DOI:10.1038/ni.3703
- Hanisch U-K. Functional diversity of microglia — how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 65. DOI: 10.3389/fncel.2013.00065.
- Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Microglia of the brain: Origin, structure, functions. *J Evol Biochem Phys.* 2019; 55: 257–68. Available from: <https://doi.org/10.1134/S002209301904001X>.
- Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Коржевский Д. Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы. *Морфология.* 2010; 137 (2): 5–8.
- Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, et al. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol.* 2014; 96 (3): 382–92. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.04.003.
- Kolos E, Korzhevskiy D. Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae.* 2020; 12 (1): 4–17. DOI: 10.32607/actanaturae.10934.
- Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Гусельникова В. В., Колос Е. А., Петрова Е. С., Кирик О. В., и др. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии. *Мед Акад Журнал.* 2019; 19 (4): 7–24. DOI: 10.17816/MAJ16548.
- Sufieva DA, Razenkova VA, Antipova MV, Korzhevskii DE. Microglia and tanycytes of the infundibular recess of the brain in early postnatal development and during aging. *Russ J Dev Biol.* 2020; 51: 189–96. Available from: <https://doi.org/10.1134/S106236042003008X>.
- Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, et al. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 2016; 363: 497–511. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2207-7>.
- Furube E, Mannari T, Morita S, Nishikawa K, Yoshida A, Itoh M, et al. VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J Endocrinol.* 2014; 222: 161–79. Available from: <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>.
- Hourai A, Miyata S. Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *J Neurosci Res.* 2013; 91: 757–70. DOI: 10.1002/jnr.23206.
- Furube E, Morita M, Miyata S. Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell Tissue Res.* 2015; 362 (2): 347–65. DOI: 10.1007/s00441-015-2201-0.
- Matarredona ER, Talaverón R, Pastor AM. Interactions between neural progenitor cells and microglia in the subventricular zone: physiological implications in the neurogenic niche and after implantation in the injured brain. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 268. DOI: 10.3389/fncel.2018.00268.
- Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Коржевский Д. Э. Субэпендимные микроглиоциты III желудочка головного мозга. *Морфология.* 2014; 145 (2): 67–9.
- Amici SA, Dong J, Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front Immunol.* 2017; 8: 1520. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01520.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017; 97 (1): 4–13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
- Kirik OV, Tsyba DL, Alekseeva OS, Kolpakova ME, Jakovleva AA, Korzhevskii DE. Alterations in Kolmer cells in SHR line rats after brain ischemia. *Russian Journal of Physiology.* 2021; 107 (2): 177–86. DOI: 10.31857/S0869813921010052.
- Korzhevskiy DE, Kirik OV, Gusel'nikova VV, Tsyba DL, Fedorova EA, Grigorev IP. Changes in cytoplasmic and extracellular neuromelanin in human substantia nigra with normal aging. *Eur J Histochem.* 2021; 65 (s1): 3283. DOI: 10.4081/ejh.2021.3283.

References

- McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2003; 172: III–XII, 1–122. DOI: 10.1007/978-3-642-55532-9.
- Hicks A-I, Kobrinsky S, Zhou S, Yang J, Prager-Khoutorsky M. Anatomical organization of the rat subfornical organ. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 691711. DOI: 10.3389/fncel.2021.691711.
- Takagi S, Furube E, Nakano Y, Morita M, Miyata S. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *J Neuroimmunol.* 2019; 331: 74–86. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.10.008.
- DosSantos MF, Devalle S, Aran V, Capra D, Roque NR, Coelho-Aguiar JdM, et al. Neuromechanisms of SARS-CoV-2: A Review *Front Neuroanat.* 2020; 14: 37. DOI: 10.3389/fnana.2020.00037.
- Tremblay M-E, Madore C, Bordeleau M, Tian L, Verkhratsky A. Neuropathobiology of COVID-19: The Role for Glia. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 592214. DOI: 10.3389/fncel.2020.592214.
- Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem.* 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
- Korzhevsky DEh, Kirik OV, Alekseeva OS. Sposob demaskirovaniya antigenov pri provedenii immunocitoximicheskix reakcij. Patent RF #2719163. 17.04.2020. Russian.
- Tanaka J, Hayashi Y, Shimamune S, Nomura M. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* 1997; 777: 237–41. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)01211-0.
- Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. *Brain Res.* 1984; 321: 209–15. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90174-4.
- Miselis RR. The subfornical organ's neural connections and their role in water balance. *Peptides.* 1982; 3: 501–2. DOI: 10.1016/0196-9781(82)90115-2.
- Gruber K, McRae-Degueurce A, Wilkin LD, Mitchell LD, Johnson AK. Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions. *Neurosci Lett.* 1987; 75: 1–5. DOI: 10.1016/0304-3940(87)90065-6.
- Felix D. Peptide and acetylcholine action on neurones of the cat subfornical organ. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1976; 292: 15–20. DOI: 10.1007/BF00506484.
- Mangiapane ML, Simpson JB. Drinking and pressor responses after acetylcholine injection into subfornical organ. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1983; 244: R508–13. DOI: 10.1152/ajpregu.1983.244.4.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18 (4): 225–42. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature.* 2015; 518: 547–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, et al. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity.* 2015; 42 (4): 665–78. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.03.011.
- Bennett ML, Bennett FC. The influence of environment and origin on brain resident macrophages and implications for therapy. *Nat Neurosci.* 2020; 23: 157–166. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0545-6>
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology.* 2017; 18 (4): 385–92. DOI: 10.1038/ni.3703
- Hanisch U-K. Functional diversity of microglia — how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 65. DOI: 10.3389/fncel.2013.00065.
- Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Microglia of the brain: Origin, structure, functions. *J Evol Biochem Phys.* 2019; 55: 257–68. Available from: <https://doi.org/10.1134/S002209301904001X>.
- Kirik OV, Suhorukova EG, Korzhevsky DEh. Kal'cij-svyazyvayushij belok Iba-1/AIF-1 v kletkax golovnogo mozga krysy. *Morfologiya.* 2010; 137 (2): 5–8. Russian.
- Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, et al. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol.* 2014; 96 (3): 382–92. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.04.003.
- Kolos E, Korzhevsky D. Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae.* 2020; 12 (1): 4–17. DOI: 10.32607/actanaturae.10934.
- Korzhevsky DEh, Grigorev IP, Gusel'nikova VV, Kolos EA, Petrova ES, Kirik OV, i dr. Immunogistoximicheskie markery dlya neyrobiologii. *Med Akad Zhurnal.* 2019; 19 (4): 7–24. DOI: 10.17816/MAJ16548. Russian.
- Sufieva DA, Razenkova VA, Antipova MV, Korzhevskii DE. Microglia and tanyocytes of the infundibular recess of the brain in early postnatal development and during aging. *Russ J Dev Biol.* 2020; 51: 189–96. Available from: <https://doi.org/10.1134/S106236042003008X>.
- Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, et al. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 2016; 363: 497–511. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2207-7>.
- Furube E, Mannari T, Morita S, Nishikawa K, Yoshida A, Itoh M, et al. VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J Endocrinol.* 2014; 222: 161–79. Available from: <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>.
- Hourai A, Miyata S. Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *J Neurosci Res.* 2013; 91: 757–70. DOI: 10.1002/jnr.23206.
- Furube E, Morita M, Miyata S. Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell Tissue Res.* 2015; 362 (2): 347–65. DOI: 10.1007/s00441-015-2201-0.
- Matarredona ER, Talaverón R, Pastor AM. Interactions between neural progenitor cells and microglia in the subventricular zone: physiological implications in the neurogenic niche and after implantation in the injured brain. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 268. DOI: 10.3389/fncel.2018.00268.
- Kirik OV, Suhorukova EG, Alekseeva OS, Korzhevsky DEh. Subehpendimnye mikroglia III zheludochka golovnogo mozga. *Morfologiya.* 2014; 145 (2): 67–9. Russian.
- Amici SA, Dong J, Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front Immunol.* 2017; 8: 1520. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01520.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017; 97 (1): 4–13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
- Kirik OV, Tsyba DL, Alekseeva OS, Kolpakova ME, Jakovleva AA, Korzhevskii DE. Alterations in Kolmer cells in SHR line rats after brain ischemia. *Russian Journal of Physiology.* 2021; 107 (2): 177–86. DOI: 10.31857/S0869813921010052.
- Korzhevskii DE, Kirik OV, Gusel'nikova VV, Tsyba DL, Fedorova EA, Grigorev IP. Changes in cytoplasmic and extracellular neuromelanin in human substantia nigra with normal aging. *Eur J Histochem.* 2021; 65 (s1): 3283. DOI: 10.4081/ejh.2021.3283.

РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ GLY-HIS-LYS И GLY-HIS-LYS-D-ALA ПРИ КОЖНОЙ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЕ

К. К. Рахметова, Е. С. Мишина, А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев[✉], М. Е. Долгинцев, А. И. Бежин

Курский государственный медицинский университет, Курск

Исследование механизмов регенерации при раневом процессе и поиск новых путей повышения эффективности заживления являются одними из актуальных направлений в медицине. Поэтому представляется целесообразным изучение репаративных эффектов регуляторных пептидов, обладающих физиологической полифункциональностью и оказывающих влияние на процессы роста и дифференцировки клеток. Целью исследования было изучить влияние пептидов Gly-His-Lys (GHK) и Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) на процессы регенерации в условиях инфицированной кожной раны у крыс. Рану моделировали на 150 животных путем нанесения на участке спины полнослойной раны, пептиды вводили в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг подкожно в области раны раз в день в течение 3, 7 или 10 суток. Для оценки течения раневого процесса изучали гистологические и морфологические препараты участков раны с прилежащей интактной кожей. GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг оказывал более выраженное, чем GHK, влияние на регенеративные процессы в ране, что отразилось в значимом снижении числа гранулоцитов и лимфоцитов и повышении числа клеток фибробластического ряда, макрофагов и клеточного индекса по сравнению как с контрольной группой ($p < 0,05-0,001$), так и с животными, которым вводили GHK в эквивалентной дозе ($p < 0,05-0,001$). При увеличении дозы до 1,5 мкг/кг эффекты GHK-D-Ala несколько ослабевали. По результатам сравнения исследованных показателей наибольшая активация регенеративных процессов в ране выявлена после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. Таким образом, присоединение D-аланина к C-концу пептида GHK способствовало ослаблению воспалительной реакции и усилению регенеративных процессов при местном введении в условиях инфицированной кожной раны.

Ключевые слова: Gly-His-Lys-D-Ala, GHK-D-Ala, инфицированная рана, регенерация, воспаление

Вклад авторов: К. К. Рахметова — сбор материала, разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи; Е. С. Мишина — проведение гистологического и морфологического исследования, анализ и интерпретация данных; А. О. Ворвуль — статистическая обработка данных, написание рукописи; И. И. Бобынцев — разработка концепции и дизайна исследования, научное редактирование рукописи; М. Е. Долгинцев — анализ и интерпретация данных, написание рукописи; А. И. Бежин — разработка концепции и дизайна исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 16 января 2014 г.), проведено с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях; «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012).

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Иванович Бобынцев
ул. К. Маркса, д. 3, г. Курск, 305041, Россия; bobig@mail.ru

Статья получена: 10.02.2022 **Статья принята к печати:** 01.03.2022 **Опубликована онлайн:** 13.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.014

REGENERATIVE EFFECTS OF GLY-HIS-LYS AND GLY-HIS-LYS-D-ALA PEPTIDES IN INFECTED SKIN WOUNDS

Rakhmetova KK, Mishina ES, Vorvul AO, Bobytsev II[✉], Dolgintsev ME, Bezhin AI

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Skin wound healing mechanisms and new ways of improving their efficiency represent an important focus in medicine. In this regard, regulatory peptides, which exhibit physiological polyfunctionality and modulate cell growth and differentiation, are of special interest. This study evaluates the effects of Gly-His-Lys (GHK) and Gly-His-Lys-D-Ala (GHK-D-Ala) peptides in the infected skin wound healing. The wounds were modeled in rats ($n=150$) by full-thickness dorsal skin defects. The peptides were administered intracutaneously at daily doses of 0.5 or 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The healing was assessed on days 3, 7, and 10 by histomorphometric examination of the wounds with adjacent intact skin. GHK-D-Ala administered at daily doses of 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ had pronounced positive effect on regeneration processes in the wound, as indicated by significantly reduced numbers of granulocytes and lymphocytes with increased representation of fibroblastic lineages and macrophages, and the resulting higher cellular index ($p < 0.05-0.001$). At higher doses of GHK-D-Ala (1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the beneficial effects were less pronounced. According to the comparative morphological examination, the highest positive effect was achieved with 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of GHK-D-Ala. Thus, local administration of the GHK peptide with extra D-alanine at carboxy-terminus significantly mitigated the inflammatory reaction and facilitated the healing of infected skin wounds in rat model.

Keywords: Gly-His-Lys-D-Ala, GHK-D-Ala, infected wound, regeneration, inflammation

Author contribution: Rakhmetova KK — sample collection, concept and design of the study, data analysis and interpretation, writing of the manuscript; Mishina ES — histological and morphological examination, data analysis and interpretation; Vorvul AO — statistical processing of the data, writing of the manuscript; Bobytsev II — concept and design of the study, scientific editing of the manuscript; Dolgintsev ME — data analysis and interpretation, writing of the manuscript; Bezhin AI — concept and design of the study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethics Committee of the Kursk State Medical University (Protocol № 1 of January 16, 2014). The study was carried out in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and the Guidelines for conducting preclinical drug trials (Moscow, 2012).

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor I. Bobytsev
Karl Marx St., 3, Kursk, 305041, Russia; bobig@mail.ru

Received: 10.02.2022 **Accepted:** 10.03.2022 **Published online:** 13.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.014

Одним из актуальных направлений медицины является изучение регенераторных механизмов при раневом процессе и поиск новых путей повышения эффективности заживления. Известно, что в регенерации кожи принимают активное участие все три регуляторные системы организма — нервная, эндокринная и иммунная [1, 2]. В связи с этим представляется целесообразным изучение репаративных эффектов регуляторных пептидов, обладающих физиологической полифункциональностью и оказывающих влияние на процессы роста и дифференцировки клеток [3]. В их числе — трипептид глицил-гистидил-лизин $\text{NH}_2\text{-Gly-L-His-L-Lys-COOH}$ (GHK) [4–6], который наряду с влиянием на процессы регенерации ткани обладает антиоксидантными, иммуностропными, противовоспалительными и нейротропными эффектами [7–10]. Ранее было показано ранозаживляющее действие GHK при кожных ранах, однако его выраженность была относительно невысокой [11], вероятно, вследствие высокой протеолитической активности в ране. Поэтому нами была выполнена модификация структуры GHK путем присоединения D-аланина (D-Ala) к C-концу для повышения ее устойчивости к действию протеолитических ферментов и усиления регенераторного действия.

Целью исследования было изучить эффекты пептида GHK и его структурной модификации GHK-D-Ala в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг на процессы регенерации в условиях инфицированной кожной раны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 150 крысах-самцах Вистар массой 180–240 г в возрасте 6–8 месяцев (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и температуре воздуха 22 ± 2 °C. Все подопытные группы включали по 10 крыс.

Инфицированную рану моделировали нанесением на выбритом от шерсти участке спины наркотизированного животного полнослойной раны площадью 250 мм².

В работе использовали пептиды GHK и GHK-D-Ala, синтезированные в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрикочно (в двух точках вокруг раны, ежедневно меняя области введения по часовой стрелке на 90°) в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг в 0,1 мл через 24 ч после моделирования инфицированной раны с последующим введением той же дозы препарата каждые 24 ч на протяжении 3, 7 или 10 суток. В контрольной серии животным в аналогичные промежутки времени вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы тела.

Животных выводили из эксперимента путем забора крови из правого желудочка сердца под эфирным наркозом, что было обусловлено необходимостью получения достаточного количества крови для дальнейших биохимических и иммунологических исследований.

После выведения животных из эксперимента для объективной оценки характера протекания раневого процесса проводили гистологическое изучение раневых аутоптов на 3, 7 и 10 сутки от начала эксперимента. Для морфологического исследования иссекали участок раны с прилегающей интактной кожей, фиксировали в формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Далее

с парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Морфологическое исследование гистологических препаратов выполняли на микроскопе Nikon Eclipse Ci (Nicon; Япония) со штатной цифровой камерой. При описании гистологических срезов оценивали выраженность воспалительной реакции, сроки образования грануляционной ткани, появление краевой эпителизации, а также структурную полноценность вновь образованного эпителия.

Морфологическую оценку течения раневого процесса проводили на основе морфометрического исследования гистологических срезов. Для этого при увеличении $\times 400$ на определенном участке гистологического препарата в пределах раневого дефекта под лейкоцитарно-фибринозным струпом проводили подсчет числа клеток фибробластического ряда, макрофагов, гранулоцитов, лимфоцитов до 100 клеток. Результаты выражали в процентах.

Для определения стадии раневого процесса и выраженности регенерации вычисляли клеточный индекс:

$$\text{КИ} = \frac{\text{Фб} + \text{М}}{\text{Гр} + \text{Л}} \times 100\%,$$

где КИ — клеточный индекс, Фб — клетки фибробластического ряда (префибробласты, фибробласты, фиброциты), М — макрофаги, Гр — гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), Л — лимфоциты. Если $\text{КИ} > 1$ ($> 100\%$), преобладают процессы регенерации, если $\text{КИ} < 1$ ($< 100\%$), преобладают воспалительные процессы.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием языка программирования R v.4.1.0 [12] в интегрированной среде разработки RStudio Desktop v. 1.4.1717 (RStudio, PBC; США). Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка (функция `shapiro.test()` из стандартного пакета), а равенства дисперсий — критерий Левене (функция `levene.test()` из пакета `lawstat`). В случае подтверждения гипотез для сравнения двух групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) (функция `aov()` из стандартного пакета) с апостериорным тестом Данетта (функция `DunnettTest()` из пакета `DescTools`), данные представляли в виде «среднее \pm стандартное отклонение» ($M \pm SD$), M и SD вычисляли с помощью функций `mean()` и `sd()` из стандартного пакета. При отклонении применяли критерий Краскала–Уоллиса (функция `kruskal.test()` из стандартного пакета) с апостериорным тестом Данна (функция `dunn.test()` из пакета `dunn.test`), данные представлены в виде «Медиана [нижний квартиль; верхний квартиль]» ($Me[1Q; 3Q]$), которые вычисляли с использованием функций `median()` и `quantile()` из стандартного пакета. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что данные морфологического исследования кожной раны, полученной на 3-и сутки после ее моделирования, во всех экспериментальных группах существенно не различаются. На участках повреждения четко выражен поверхностный лейкоцитарно-некротический слой. Кожный дефект заполнен полиморфноклеточной инфильтрацией с преобладанием лейкоцитов. На границе с интактной дермой отмечены признаки отека: единичные расширенные с истонченной

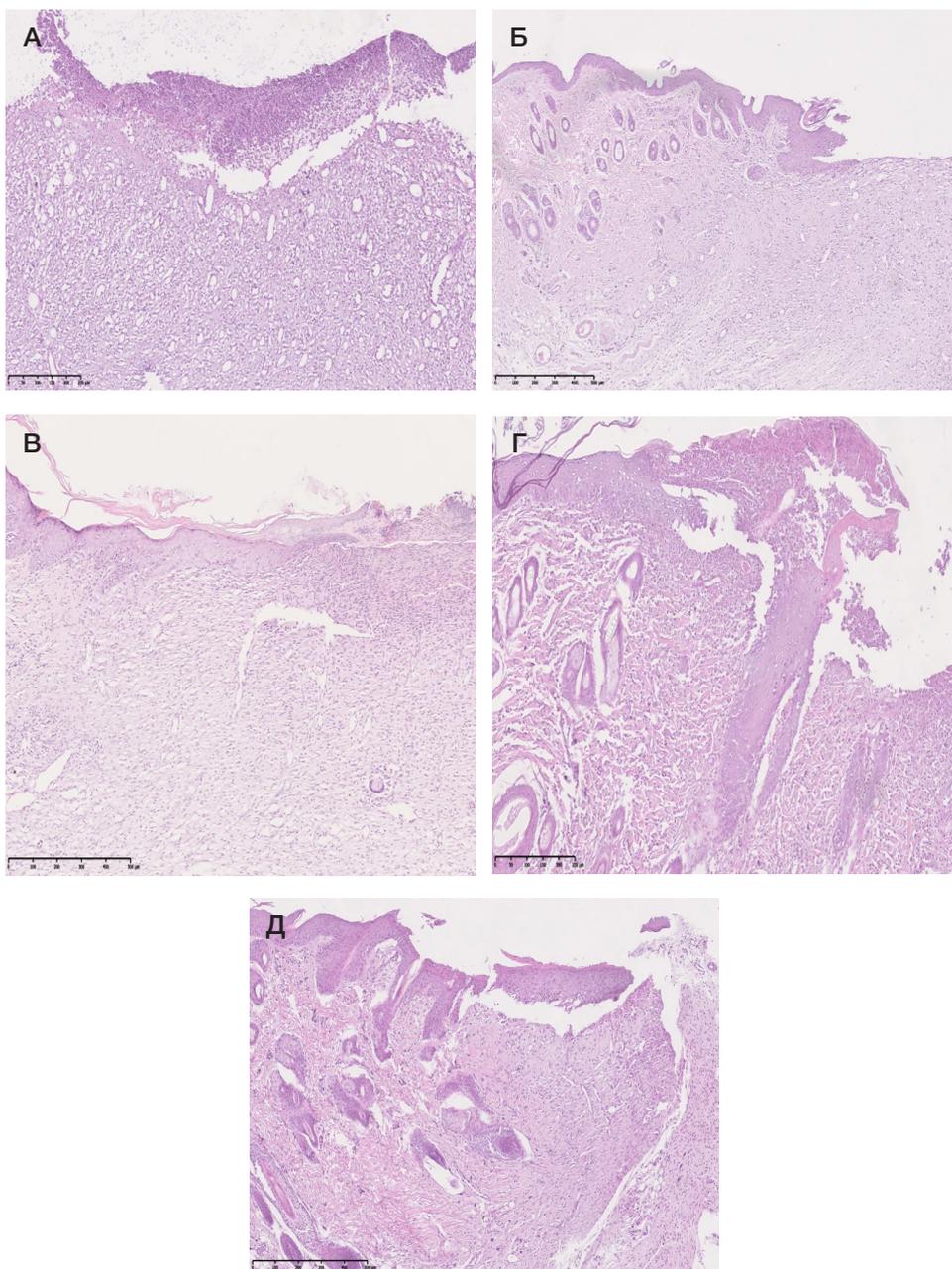


Рис. 1. Микрофотографии фрагментов кожи на месте раны на 10-е сутки эксперимента (окраска гематоксилином и эозином; ув. $\times 40$). (А) Контроль. (Б) После введения пептида GHK в дозе 0,5 мкг/кг. (В) После введения пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг. (Г) После введения пептида GHK в дозе 1,5 мкг/кг. (Д) После введения пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг

стенкой «пустые» сосуды, набухшие волокна, образующие сеть, более густую ближе к лейкоцитарно-некротическому слою.

На 7-е сутки эксперимента в контрольной группе на участке повреждения обнаружен лейкоцитарно-некротический слой, не всегда четко отграниченный зоной инфильтрации. В нижележащих отделах отмечены начальные этапы формирования грануляционной ткани. Клеточный состав представлен нейтрофилами, гистиоцитами и лимфоцитами. При использовании пептида GHK в дозе 0,5 мкг/кг и пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой все еще присутствует, но он значительно меньших размеров по сравнению с контролем. На участках, где этот слой отсутствует, хорошо различимы наслоения фибрина, который четко отграничен зоной инфильтрации. Нижележащая молодая соединительная ткань богата полнокровными

расширенными капиллярами округлой формы. Признаки отека выражены: эндотелий капилляров умеренно истончен, межструктурные промежутки увеличены. Клеточный состав преимущественно представлен макрофагами, фибробластами и лимфоцитами. При введении животным пептида GHK в дозе 1,5 мкг/кг и пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг отмечено уменьшение признаков отека, лейкоцитарно-некротический струп отсутствует на большем протяжении. На месте повреждения видна грануляционная ткань и тонкими коллагеновыми волокнами, однако на фоне этого присутствует круглоклеточная инфильтрация. Кроме того, в этих группах можно наблюдать начало краевой эпителизации раны в виде утолщения краевого слоя эпидермиса с сохраненной стратификацией.

На 10-е сутки эксперимента в контрольной группе продолжают преобладать воспалительные изменения. В более глубоких слоях соединительная ткань приобретает

Таблица. Динамика изменения морфометрических показателей при гистологическом изучении при введении пептида Gly-His-Lys-D-Ala ($M \pm SD / Me [1Q; 3Q]$, $n = 10$) на 3-и, 7-е, 10-е сутки

Показатель	Группа	Срок		
		3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки
Клетки фибробластического ряда, %	Контроль	15,9 ± 2,47	15,9 ± 3,54	20,6 ± 6,67
	GHK 0,5 мкг/кг	9,5 ± 3,31***	15,2 ± 1,55	22,5 ± 3,50
	GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	17,00 ± 2,49###	43,20 ± 4,44***,###	34,80 ± 1,93***,#
	GHK 1,5 мкг/кг	11,7 ± 1,77**	22,50 [20,50; 23,00]***	34,8 ± 1,93***
	GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	12,1 ± 3,60**	20,5 ± 1,43**	30,1 ± 3,38***,SSS
Макрофаги, %	Контроль	13,3 ± 3,97	17,6 ± 3,06	16,5 ± 8,18
	GHK 0,5 мкг/кг	20,7 ± 4,57**	24,4 ± 3,12***	19,4 ± 3,86
	GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	34,60 ± 3,10***,###	23,30 ± 4,57**	33,90 ± 3,14***,##
	GHK 1,5 мкг/кг	27,1 ± 7,03***	34,3 ± 3,09***	54,2 ± 4,52***
	GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	21,4 ± 5,68***	23,9 ± 4,20**,\$	26,4 ± 3,17***,SSS
Гранулоциты, %	Контроль	55 ± 3,50	36,2 ± 2,30	20,2 ± 5,85
	GHK 0,5 мкг/кг	46,5 ± 2,22***	36,50 [36,00; 37,75]	28,1 ± 1,20***
	GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	13,00 [12,00; 14,00]***,###	13,50 [11,25; 17,50]***,###	4,00 [3,00; 5,00]***,#
	GHK 1,5 мкг/кг	18,2 ± 2,53***	23,50 [22,25; 24,75]***	15,5 ± 5,23*
	GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	44,00 ± 3,65***,SS	24,2 ± 2,30***	18,4 ± 1,71
Лимфоциты, %	Контроль	15,8 ± 4,76	30,3 ± 4,06	42,7 ± 8,07
	GHK 0,5 мкг/кг	23,3 ± 1,25***	24,50 [24,00; 26,00]**	30 ± 3,94
	GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	35,00 [34,25; 36,75]***,#	18,40 ± 3,41***,##	27,70 ± 4,47***
	GHK 1,5 мкг/кг	43,0 ± 5,10***	21,4 ± 4,58***	19,9 ± 4,46***
	GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	22,5 ± 2,46***,SSS	31,4 ± 3,10\$\$\$	25,5 [25,00; 26,75]***
Клеточный индекс, %	Контроль	37,9 [35,6; 44,9]	51,0 ± 10,35	61,2 ± 20,92
	GHK 0,5 мкг/кг	43,4 ± 4,69	63,9 [58,7; 68,8]**	72,9 ± 12,14
	GHK-D-Ala 0,5 мкг/кг	108,33 [104,08; 112,77]***,###	206,7 ± 54,09***,###	225,6 ± 46,76***,###
	GHK 1,5 мкг/кг	65,0 ± 17,35***	128,31 ± 20,26***	184,89 ± 28,27***
	GHK-D-Ala 1,5 мкг/кг	51,1 ± 10,68*	80,7 ± 12,88***	130,1 ± 8,71***,\$

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ в сравнении с группой GHK 0,5 мкг/кг; \$ — $p < 0,05$; \$\$ — $p < 0,01$; \$\$\$ — $p < 0,001$ в сравнении с группой GHK 1,5 мкг/кг.

более сформированный вид, как по клеточному составу, так и по виду и качеству волокон. Сохраняется незначительная лимфоцитарная инфильтрация. На границе с гиподермой появляется сформированная зрелая соединительная ткань. В участках, прилежащих к неповрежденной коже, непосредственно на границе с дефектом заметно утолщение базального слоя эпидермиса. При этом на большем протяжении на поверхности раны располагается клеточный детрит (рис. 1А).

В группе с введением пептида GHK в дозе 0,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой присутствует только в центре раны. Ниже лежащая молодая грануляционная ткань имеет расширенные капилляры округлой формы и вертикальные капилляры слабого кровенаполнения. Волокна более зрелые, чем в контроле. Признаки отека выражены незначительно. Сохраняется незначительная полиморфноклеточная инфильтрация, но преобладают клетки фибробластического ряда. Глубже появляется сформированная зрелая соединительная ткань. В участках прилежащей неповрежденной коже непосредственно на

границе с дефектом заметны утолщение слоев эпидермиса и краевое нарастание новообразованного эпителия. Эпителий имеет нарушенную стратификацию (рис. 1Б).

При введении пептида GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на 10-е сутки лейкоцитарно-некротический слой отсутствует. Ниже лежащая молодая соединительная ткань богата обескровленными расширенными капиллярами округлой формы. В поле зрения преобладают клетки фибробластического ряда. Заметно прорастание эпителиального лоскута на поверхности грануляционной ткани. Эпителий оформленный, за исключением рогового слоя. По сравнению с размерами дефекта прорастание эпителиального лоскута значительно, на отдельных срезах обнаружено полное покрытие дефекта эпителием. В дерме неповрежденной кожи признаки отека сохранены, но выражены меньше, чем в контроле (рис. 1В).

В группе животных, получавших пептид GHK в дозе 1,5 мкг/кг, лейкоцитарно-некротический слой все еще присутствует, хотя и заметно меньших размеров, зачастую отслаивается в процессе приготовления

препарата. В таких участках четко видны наслоения фибрина. Нижележащая молодая соединительная ткань богата обескровленными расширенными капиллярами округлой формы. Прорастание эпителиального лоскута происходит по границе между лейкоцитарно-некротическим слоем и слоем молодой грануляционной ткани. Эпителий оформленный, за исключением рогового слоя. По сравнению с размерами дефекта прорастание эпителиального лоскута значимо, на отдельных срезах отмечено полное покрытие дефекта эпителием. Под эпителиальным наростом грануляционная ткань близка по строению к типичной соединительной ткани дермы (рис. 1Г).

При введении пептида GHK-D-Ala в дозе 1,5 мкг/кг лейкоцитарно-некротический слой присутствует локально. В участках прилежащей неповрежденной кожи непосредственно на границе с дефектом можно наблюдать утолщение базального и зернистого слоев эпидермиса. Прорастание эпителиального лоскута происходит по границе между лейкоцитарно-некротическим слоем и более глубоко расположенной грануляционной тканью, по размеру несколько более обширное, чем в контроле. Эпителий оформленный, кроме самого дистального участка. В дерме признаки отека сохраняются, но выражены значительно меньше, чем в контроле (рис. 1Д).

Проведенный морфометрический анализ подтверждает смену воспалительных изменений на регенеративную фазу (см. таблицу). На всех сроках эксперимента после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг число гранулоцитов было достоверно ниже по сравнению как с контрольной группой (в 3–5 раз; $p < 0,05–0,001$), так и с животными, получавшими GHK (в 3,5–7 раз; $p < 0,05–0,001$), что впоследствии могло отразиться в меньшей выраженности вторичной альтерации в ране и повышении эффективности репаративных процессов. После введения пептидов в дозе 1,5 мкг/кг направленность эффектов сохранялась при меньшей степени различий между пептидами. При этом показатели у животных всех подопытных групп на всех сроках эксперимента были достоверно ниже контрольных значений.

Число макрофагов в группе, получавшей GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг, на всех сроках наблюдения было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05–0,001$), а на 3-и и 10-е сутки — и в сравнении с животными, получавшими GHK. После введения пептидов в дозе 1,5 мкг/кг во всех группах по сравнению с контрольными животными происходило достоверное увеличение числа макрофагов ($p < 0,05–0,001$) при несколько большей выраженности эффекта при использовании GHK ($p < 0,05–0,001$).

Миграция клеток фибробластического ряда в место повреждения, которая отражает начало регенеративных процессов, имела наиболее выраженный характер после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на всех сроках эксперимента в сравнении как с контрольной группой, так и с животными, получавшими GHK. При использовании GHK-D-Ala и GHK в дозе 1,5 мкг/кг направленность эффектов сохранялась ($p < 0,05–0,01$) при отсутствии значительных различий между подопытными группами ($p > 0,05$).

Изменение числа лимфоцитов на разных сроках эксперимента в целом согласуется с динамикой перехода воспалительной реакции в регенеративную фазу. Данный переход был отмечен и по числу других исследованных видов клеток. При введении GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг на 3-и сутки наблюдается их значительное увеличение относительно обеих групп сравнения ($p < 0,05–0,001$), тогда как на 7-е и 10-е сутки направленность эффекта

имела обратный характер. Введение GHK в дозе 1,5 мкг/кг вызывало достоверно значимые сдвиги относительно контрольных значений на всех сроках эксперимента ($p < 0,05–0,001$). При этом эффекты GHK-D-Ala имели менее выраженный характер.

Расчет клеточного индекса показал, что наиболее выраженные регенеративные процессы на всех сроках наблюдения развивались после введения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг ($p < 0,05–0,001$). При использовании GHK в данной дозе существенной активации регенерации не отмечено ($p > 0,05$). Однако при введении GHK в дозе 1,5 мкг/кг на 7-е и 10-е сутки значения клеточного индекса свидетельствуют о преобладании регенеративных процессов и большей выраженности эффекта, чем после введения GHK-D-Ala.

Таким образом, GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг оказывает более выраженное, чем GHK, влияние на регенеративные процессы в ране. При увеличении дозы до 1,5 мкг/кг эффекты GHK-D-Ala несколько ослабевают, а эффекты GHK — возрастают. При этом наибольшие изменения показателей, свидетельствующих об активации регенеративных процессов в ране, отмечены после применения GHK-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют об усилении процессов регенерации и ослаблении воспалительной реакции в условиях инфицированной кожной раны после присоединения к С-концу GHK D-аланина. В настоящее время в литературе существуют различные точки зрения на механизмы реализации данных эффектов пептида. Так, в более ранних работах GHK рассматривали как транспортную молекулу для Cu^{2+} . Данные катионы имеют важное значение для завершенности фагоцитоза, полного очищения раны и эффективного заживления. В частности, установлено, что Cu^{2+} связывается N-концом GHK, взаимодействуя с глицином и гистидином [13]. В использованной в нашей работе структурной модификации трипептида N-конец оставался интактным и, следовательно, катионы Cu^{2+} могли взаимодействовать с указанными аминокислотами, а GHK играть роль переносчика катионов. Более поздние исследования показали возможность «самостоятельного» действия GHK за счет способности повышать прикрепление клеток к структурам внеклеточного матрикса дермы, облегчая их передвижение и стимулирование выработки важных сигнальных и структурных молекул, например, факторов роста и декорина [4, 14].

Повышение устойчивости молекулы трипептида к деградирующему действию карбоксипептидаз могло стать основным фактором, обусловившим более высокую стимуляцию регенераторных процессов в ране структурно модифицированной молекулой. Полученные данные согласуются с результатами выполненных ранее исследований, в которых было показано выраженное влияние GHK-D-Ala на фагоцитарную активность гранулоцитов и процессы перекисного окисления липидов при кожной инфицированной ране у крыс [15]. Отмеченный при этом уровень репаративной активности GHK был близок к известному из литературных данных [11].

При анализе полученных данных необходимо также учитывать использованный способ введения пептидов. Цель введения пептидов в область раны — облегчение их доступа к клеткам, участвующим в процессе регенерации. Однако

пептиды могли попадать в системный кровоток и оказывать действие на другие органы и системы. В частности, при внутрибрюшинном введении в сопоставимых дозах GHK оказывал анальгетическое и анксиолитическое действие, что может способствовать ослаблению стрессорной реакции и увеличению регенераторного потенциала с учетом нейроиммунокутанных взаимодействий [2]. Однако присоединение к С-концу трипептида D-аланина нивелировало данные эффекты [16, 17]. В связи с этим обстоятельством можно предположить, что большая эффективность GHK-D-Ala в отношении репаративных процессов в ране была достигнута без участия нейротропных эффектов, описанных для GHK.

Сохранение направленности регенеративных и противовоспалительных эффектов, характерных для GHK, после применения GHK-D-Ala свидетельствует об общности их механизмов. Так, наряду с указанными выше данными литературы, известно, что GHK увеличивает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов 2 (FGF-2) [18]. Кроме того, трипептид улучшает заживление кожных ран и стимулирует обновление кожи за счет высвобождения факторов роста из гранул тромбоцитов (трансформирующий фактор роста

β , TGF β), которые мобилизуют иммунные клетки в области повреждения [19]. Кроме того, GHK снижает продукцию фибробластами провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерлейкин 6 (IL6), что приводит к снижению активности воспаления в коже и препятствует образованию гипертрофических рубцов [20].

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало, что присоединение D-аланина к С-концу пептида GHK способствует усилению регенеративных процессов и ослаблению воспалительной реакции при местном введении в условиях инфицированной кожной раны на 3-и, 7-е и 10-е сутки в дозах 0,5 и 1,5 мкг/кг. GHK-D-Ala способствовал увеличению в ране числа клеток фибробластического ряда, макрофагов на фоне уменьшения числа гранулоцитов и лимфоцитов. Результаты настоящей работы свидетельствуют о возможности разработки на основе структурных модификаций пептида GHK эффективных средств для повышения эффективности заживления при кожных раневых процессах. Необходимо продолжать изучение механизмов пептидной регуляции регенераторных процессов.

Литература

1. Башкина О. А., Самотруева М. А., Ажикова А. К., Пахнова Л. Р. Нейроиммуноэндокринная регуляция физиологических и патофизиологических процессов в коже. *Медицинская иммунология*. 2019; 21 (5): 807–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820.
2. Makarevich PI, Efimenko AY, Tkachuk VA Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2020; 85 (1): 11–26. DOI: 10.1134/S0006297920010022. PubMed PMID: 32079514.
3. Хавинсон В. X. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее. *Клиническая медицина*. 2020; 98 (3): 165–77. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177.
4. Siméon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol*. 2000; 115 (6): 962–8. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00166.x. PubMed PMID: 11121126
5. Pickart L, Margolina A. Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (7): 1987. DOI: 10.3390/ijms19071987. PubMed PMID: 29986520.
6. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 648108. DOI: 10.1155/2015/648108. PubMed PMID: 26236730.
7. Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R, Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst*. 2005; 10 (1): 17–30. DOI: 10.1111/j.1085-9489.2005.10105.x. PubMed PMID: 15703015.
8. Mazurowska L, Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. *J Cosmet Sci*. 2008; 59 (1): 59–69. PubMed PMID: 18350235
9. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 324832. DOI: 10.1155/2012/324832. PubMed PMID: 22666519.
10. Siméon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00803-1. PubMed PMID: 11045606.
11. Курцева А. А., Смахтин М. Ю., Иванов А. В., Беседин А. В., Чердаков В. Ю. Репаративная и иммунотропная активность пептида gly-his-lys в условиях кожных ран. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2008; (1): 36–40.
12. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
13. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK-Cu may Prevent Oxidative Stress in Skin by Regulating Copper and Modifying Expression of Numerous Antioxidant Genes. *Cosmetics*. 2015; 2 (3): 236–47. DOI: 10.3390/cosmetics2030236.
14. McCormack MC, Nowak KC, Koch RJ. The effect of copper peptide and tretinoin on growth factor production in a serum-free fibroblast model. *Arch Facial Plast Surg*. 2001; 3 (1): 28–32. PubMed PMID: 11176716.
15. Рахметова К. К., Долгинцев М. Е., Бобынцев И. И., Бежин А. И., Ворвуль А. О., Белых А. Е. Влияние пептида GHK-D-Ala на механизмы врожденного иммунитета и процессы перекисного окисления липидов в условиях инфицированной раны. *Человек и его здоровье*. 2021; 24 (1): 54–61. DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/07.
16. Bobyntsev II, Chernysheva OI, Dolgintsev ME, Smakhtin MY, Belykh AE. Anxiolytic effects of Gly-His-Lys peptide and its analogs. *Bull Exp Biol Med*. 2015; 158 (6): 726–8. DOI: 10.1007/s10517-015-2847-3. PubMed PMID: 25900608.
17. Бобынцев И. И., Чернышёва О. И., Долгинцев М. Е., Смахтин М. Ю., Белых А. Е. Влияние пептида Gly-His-Lys и его аналогов на болевую чувствительность у мышей. *Экспер. и клин. фармакол*. 2015; 78 (1): 13–15. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-1-13-15.
18. Wang X, Liu B, Xu Q, Sun H, Shi M, Wang D et al. GHK-Cu-liposomes accelerate scald wound healing in mice by promoting cell proliferation and angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 2017; 25 (2): 270–8. DOI: 10.1111/wrr.12520. PubMed PMID: 28370978.
19. Gruchlik A, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-His-Lys and its copper complex on TGF- β secretion in normal human dermal

fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2014; 71 (6): 954–8. PubMed PMID: 25745767.

20. Gruchlik A, Jurzak M, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-

Gly-His, Gly-His-Lys and their copper complexes on TNF-alpha-dependent IL-6 secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69 (6): 1303–6. PubMed PMID: 23285694.

References

- Bashkina OA, Samotrueva MA, Azhikova AK, Paknnova LR. Neuroimmunoendocrine regulation of the skin functioning. *Meditsinskaya Immunologiya.* 2019; 21 (5): 807–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-807-820. Russian.
- Makarevich PI, Efimenko AY, Tkachuk VA Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry (Moscow).* 2020; 85 (1): 11–26. DOI: 10.1134/S0006297920010022. PubMed PMID: 32079514.
- Khavinson VKh. Peptide medicines: past, present, future. *Clinical Medicine (Russian Journal).* 2020; 98 (3): 165–177. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177. Russian.
- Siméon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol.* 2000; 115 (6): 962–8. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00166.x. PubMed PMID: 11121126
- Pickart L, Margolina A. Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (7): 1987. DOI: 10.3390/ijms19071987. PubMed PMID: 29986520.
- Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 648108. DOI: 10.1155/2015/648108. PubMed PMID: 26236730.
- Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R, Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst.* 2005; 10 (1): 17–30. DOI: 10.1111/j.1085-9489.2005.10105.x. PubMed PMID: 15703015.
- Mazurowska L, Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. *J Cosmet Sci.* 2008; 59 (1): 59–69. PubMed PMID: 18350235
- Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 324832. DOI: 10.1155/2012/324832. PubMed PMID: 22666519.
- Siméon A, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci.* 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00803-1. PubMed PMID: 11045606.
- Kurtseva AA, Smakhtin MYu, Ivanov AV, Besedin AV, Cherdakov VYu. The effects of Gly-His-Lys peptide on neutrophil functions and its regenerative activity in skin wounds. *Kursk scientific and practical bulletin "Man and his health".* 2008; (1): 36–40. Russian.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK-Cu may Prevent Oxidative Stress in Skin by Regulating Copper and Modifying Expression of Numerous Antioxidant Genes. *Cosmetics.* 2015; 2 (3): 236–47. DOI: 10.3390/cosmetics2030236.
- McCormack MC, Nowak KC, Koch RJ. The effect of copper peptide and tretinoin on growth factor production in a serum-free fibroblast model. *Arch Facial Plast Surg.* 2001; 3 (1): 28–32. PubMed PMID: 11176716.
- Rakhmetova KK, Dolgintsev ME, Bobytsev II, Bezhin AI, Vorvul AO, Belykh AE. Effect of GHK-D-Ala peptide on innate immunity mechanisms and lipid peroxidation processes in infected wounds. *Humans and their Health.* 2021; 24 (1): 54–61. DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/07. Russian.
- Bobytsev II, Chernysheva OI, Dolgintsev ME, Smakhtin MY, Belykh AE. Anxiolytic effects of Gly-His-Lys peptide and its analogs. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 158 (6): 726–8. DOI: 10.1007/s10517-015-2847-3. PubMed PMID: 25900608.
- Bobytsev II, Chernysheva OI, Dolgintsev ME, Smakhtin MYu, Belykh AE. Effect of Gly-His-Lys peptide and its analogs on pain sensitivity in mice. *Eksper. i klin. farmakol.* 2015; 78 (1): 13–15. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-1-13-15. Russian.
- Wang X, Liu B, Xu Q, Sun H, Shi M, Wang D et al. GHK-Cu-liposomes accelerate scald wound healing in mice by promoting cell proliferation and angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2017; 25 (2): 270–8. DOI: 10.1111/wrr.12520. PubMed PMID: 28370978.
- Gruchlik A, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-His-Lys and its copper complex on TGF- β secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2014; 71 (6): 954–8. PubMed PMID: 25745767.
- Gruchlik A, Jurzak M, Chodurek E, Dzierzewicz Z. Effect of Gly-Gly-His, Gly-His-Lys and their copper complexes on TNF-alpha-dependent IL-6 secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69 (6): 1303–6. PubMed PMID: 23285694.

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ КОНСОЛИДАЦИИ И РЕКОНСОЛИДАЦИИ ПАМЯТИ ПРИ ЗРИТЕЛЬНЫХ И СЛУХОВЫХ НАРУШЕНИЯХ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ

И. А. Захарова¹, Е. А. Петраш¹ ✉, В. Б. Никишина¹, Т. Н. Разуваева², Т. В. Шутеева³¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия³ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Сенсорные нарушения (зрительные, слуховые) ограничивают количество и качество поступающей информации. При этом существенные затруднения вызывает решение вопроса о том, что выявленное нарушение памяти является собственно нарушением памяти или обусловлено сенсорными дефицитами. В связи с поиском ответа на поставленный вопрос нами была сформулирована цель исследования. Целью исследования было изучить процессы консолидации и реконсолидации памяти у лиц пожилого возраста с сенсорными нарушениями. В исследовании участвовали пациенты в возрасте 65–75 лет ($n = 61$), разбитые на четыре группы: пациенты с односторонней нейросенсорной тугоухостью ($n = 17$); пациенты с двусторонней нейросенсорной тугоухостью ($n = 14$); пациенты с нарушением зрения ($n = 19$); пациенты с сочетанным сенсорным дефицитом ($n = 11$). В качестве методов использовали методики А. Р. Лурия «10 слов» и «Зрительная память», а также экспериментальную процедуру, предложенную Ф. Бартлеттом. Установлено снижение объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти по всем группам испытуемых у пациентов пожилого возраста с сенсорными нарушениями. Достоверно показано изменение качественно-количественных характеристик процессов консолидации и реконсолидации памяти при сенсорных нарушениях. Данное изменение обусловлено снижением объема кратковременной памяти (как слухоречевой, так и зрительно-образной). Сделан вывод, что важными условиями повышения эффективности процессов консолидации и реконсолидации являются необходимость «подстройки» вновь поступающей информации к уже имеющейся в памяти (предшествующем опыте), а также необходимость дозированного снижения объема вновь поступающей информации с целью сохранения ее целостности на этапе консолидации.

Ключевые слова: зрительно-образная память, семантическая память, консолидация памяти, реконсолидация памяти, сенсорные нарушения, пожилой возраст

Вклад авторов: И. А. Захарова, Т. В. Шутеева — проведение исследования, сбор первичного эмпирического материала; Е. А. Петраш — количественная и качественная обработка полученного эмпирического материала, интерпретация и обобщение результатов исследования; В. Б. Никишина, Т. Н. Разуваева — формирование концепции исследования, интерпретация и обобщение полученного эмпирического материала.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 207 от 19 апреля 2021 г.); все участники подписали информированное согласие на обследование.

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

Статья получена: 22.03.2022 **Статья принята к печати:** 14.04.2022 **Опубликована онлайн:** 28.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.018

SPECIFIC FEATURES OF MEMORY CONSOLIDATION AND RECONSOLIDATION IN OLDER INDIVIDUALS WITH VISION AND HEARING IMPAIRMENTS

Zakharova IA¹, Petrash EA¹ ✉, Nikishina VB¹, Razuvaeva TN², Shuteeva TV³¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia³ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Sensory impairments (visual and auditory) reduce quantity and quality of the information input. The associated memory loss can be classified as intrinsic decline in memory functionalities or mere physiological effect of sensory deprivation. This study aimed to specify this issue by analyzing memory consolidation and reconsolidation processes in older people with sensory deficits. The study enrolled 65–75 year-old individuals ($n = 61$) distributed into four groups: patients with unilateral sensorineural hearing loss ($n = 17$); patients with bilateral sensorineural hearing loss ($n = 14$); patients with visual impairment ($n = 19$); and patients with combined sensory deficits ($n = 11$). The methods included Luria's auditory-verbal ("10 words") and visual memory tests and Bartlett's experimental procedure. A decrease in memory volume for auditory-verbal and visual-figurative short-term memories was observed in all groups. The results reveal significant adverse dynamics of qualitative and quantitative indicators for memory consolidation and reconsolidation processes, associated with decreased volume of short-term memories, both auditory-verbal and visual-figurative. Based on these findings, we conclude that consolidation and reconsolidation efficiency depends on proper accommodation of the newly incoming information to already memorized modules (previous experience) and requires dosing of the newly incoming information in order to preserve its integrity at the stage of consolidation.

Keywords: visual-figurative memory, semantic memory, memory consolidation, memory reconsolidation, sensory impairments, old age

Author contribution: Zakharova IA, Shuteeva TV — empirical research and collection of primary data; Petrash EA — quantitative and qualitative data processing, interpretation and generalization of the results; Nikishina VB, Razuvaeva TN — research concept development, interpretation and generalization of the results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 207 of April 19, 2021). All participants provided written informed consent for the study.

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

Received: 22.03.2022 **Accepted:** 14.04.2022 **Published online:** 28.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.018

Интеграцию субъективного содержания картины мира обеспечивает системное многообразие процессов и видов памяти. Возрастные изменения процессов памяти обусловлены не только фактором возраста, но и сопутствующими нарушениями.

Ряд авторов указывают на взаимосвязь сенсорных нарушений у пожилых людей с когнитивными функциями [1–8].

Возрастные нарушения слуха ряд исследователей связывают с изменениями памяти у пожилых людей [5]. Так в одной из работ проверяли гипотезу о том, что связь обусловлена социальным отчуждением после начала предполагаемой потери слуха. Участники Висконсинского лонгитюдного исследования (WLS) сообщили о проблемах со слухом и нескольких типах социальной активности. Воспринимаемая потеря слуха была связана с ухудшением памяти. Авторы исследования пришли к выводу, что потеря слуха, о которой сообщают люди, и социальная изоляция, вероятно, являются независимыми факторами риска потери памяти среди пожилых людей. Предполагаемая потеря слуха, согласно результатам исследования, была связана со снижением памяти [5].

Память, изучаемая со стороны процессов и видов, в которых она реализуется и функционирует, обладает важным компенсаторным ресурсом при целом ряде нарушений вне зависимости от возраста.

Установлена взаимосвязь между субъективной возрастной тугоухостью (SARHL) и функционированием эпизодической памяти [6]. Сделан вывод, что самооценка нарушений слуха может оказывать косвенное влияние на эпизодическую память через еженедельную социальную активность. Влияние снижения слуха на когнитивное функционирование опосредовано через социальное взаимодействие. Снижение слуха снижает социальную активность, широту коммуникации, что может ухудшить когнитивное функционирование.

Возрастная тугоухость влияет на способность слышать высокие частоты и, следовательно, приводит к трудностям в восприятии звуков, пониманию речи, особенно в неблагоприятных условиях прослушивания [7]. Это снижение слуха может быть частично скомпенсировано задействованием исполнительных функций, например, рабочей памяти. При этом нейронные и поведенческие признаки рабочей памяти не изменены при легкой и средней степени тяжести потери слуха а когнитивная гибкость тесно связана с нарушениями слуха и речи.

Описаны четыре возможных механизма связи снижения слуха и снижения когнитивного функционирования: 1) общая патология, которая изначально приводит к нарушению слуха и когнитивных функций; 2) снижение когнитивного резерва из-за снижения слуха (редукция источников для получения информации, потеря целостности); 3) увеличение расхода когнитивных ресурсов при восприятии слухоречевой информации; 4) интеграция первого и третьего механизмов, т. е. определенные структуры вовлечены в патологический процесс, а сохраненные участки и нейронные сети перенаправлены на обеспечение функции слухового восприятия [8].

Согласно концепции К. В. Анохина, память как процесс осуществляется посредством запоминания, который проходит два этапа (фазы). Кратковременная фаза характеризуется фиксацией сохраняемой информации в полном объеме (без потери и искажения содержания) в течение короткого промежутка времени. Это лабильная фаза памяти, которой соответствует удержание информационного следа в форме

реверберации нервных импульсов. Долговременная фаза запоминания характеризуется сокращением объема информации при ее последующем длительном хранении без внесения изменений (рис. 1).

Долговременная память предполагает сохранение следа за счет процесса консолидации и последующих структурных изменений. При консолидации новой информации происходит формирование нейронных цепочек путем изменения синаптической активности между нейронами, входящими в эту цепочку. Формируется система доступа для извлечения необходимой в данный момент времени информации, а также для реконсолидации следов памяти после «пользования» ими (воспроизведением сохраненной информации). При реактивации памяти, обеспечивающей процесс извлечения информации, происходит ее активная реконструкция, которая, в свою очередь, сопровождается рекатегоризацией. После каждой рекатегоризации следует процесс реконсолидации (повторного сохранения информации). Каждое извлечение памяти сопровождается заменой старого следа памяти новым содержанием (оно может полностью или частично измениться).

Сенсорные нарушения (зрительные, слуховые) ограничивают количество и качество поступающей информации. При этом существенные затруднения вызывает решение вопроса о том, что выявленное нарушение памяти является собственно нарушением памяти или же обусловлено сенсорными дефицитами. В связи с поиском ответа на поставленный вопрос целью исследования было изучить процессы консолидации и реконсолидации памяти у лиц пожилого возраста с сенсорными нарушениями.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Объем выборки составил 61 пациент (28 мужчин и 33 женщины) в возрасте 65–75 лет (средний возраст пациентов — $68,4 \pm 2,12$ лет). Данный возрастной диапазон пациентов с сенсорными нарушениями, участвующими в исследовании, характеризуется отсутствием включенности в трудовую деятельность не менее 3 лет на момент исследования. В первую группу вошли 17 пациентов с односторонней нейросенсорной тугоухостью (H90.4 Нейросенсорная потеря слуха односторонняя с нормальным слухом на противоположном ухе, по МКБ-10). Во вторую группу вошли 14 человек с двусторонней нейросенсорной тугоухостью (H90.3 Нейросенсорная потеря слуха двусторонняя, по МКБ-10). Третью группу составили 19 пациентов с нарушением зрения (H52.1 Миопия, по МКБ-10) — снижение остроты зрения до 7 диоптрий), четвертую — 11 пациентов с сочетанным сенсорным дефицитом (односторонняя нейросенсорная тугоухость со снижением остроты зрения). Все группы уравнивали по полу. Критерии включения пациентов в программу исследования: отсутствие когнитивных нарушений (не менее 23 баллов по шкале MMSE); наличие высшего образования; отсутствие включенности в трудовую деятельность.

Исследование включало в себя подготовительный этап и три экспериментальных этапа.

Подготовительный этап

Проведение оценки соматического и неврологического статусов профильными специалистами. Когнитивный

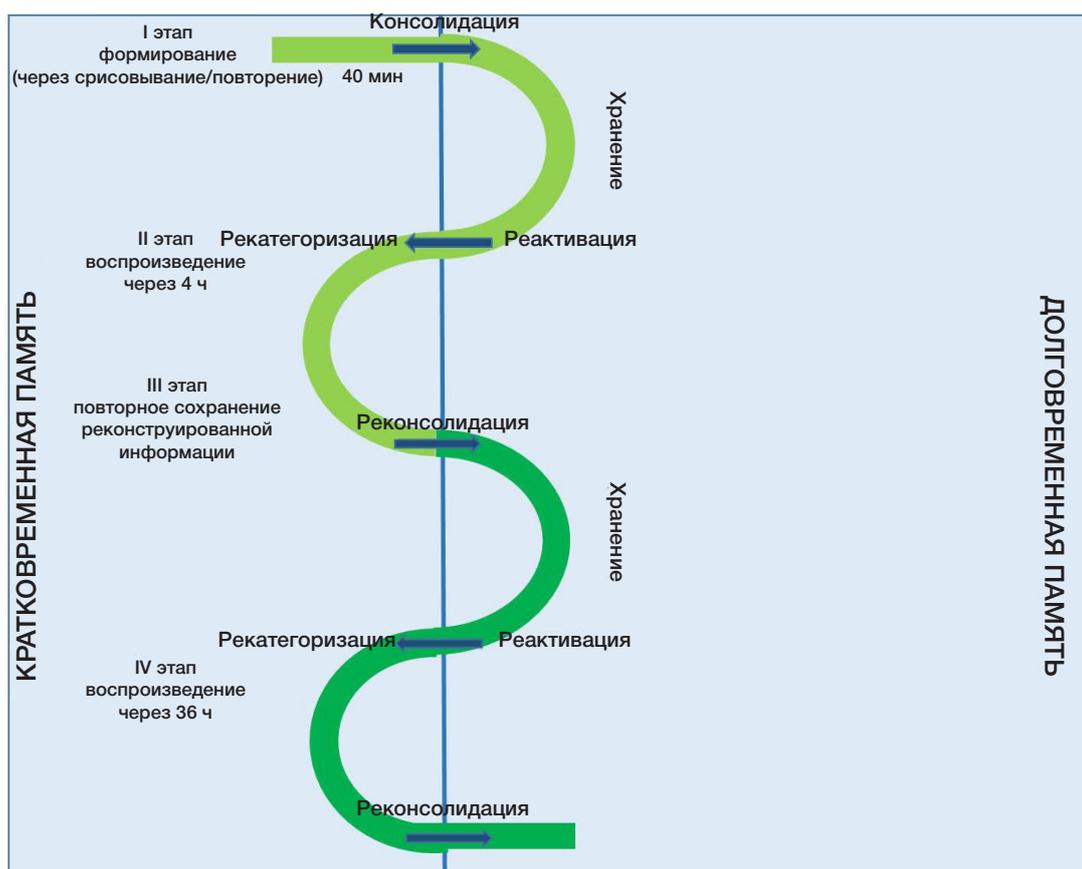


Рис. 1. Концептуальное и экспериментальное моделирование исследования процессов сохранения и извлечения памяти

статус определяли с помощью шкалы Mini-mental State Examination (MMSE). Исследование осуществляли в индивидуальной форме на условиях добровольного письменного информированного согласия.

Экспериментальные этапы

Оценка объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти

Для оценки объема кратковременной слухоречевой памяти использовали методику «10 слов» А. Р. Лурия [9]. Пациенту зачитывали перечень из 10 семантически не связанных между собой слов, обозначающих конкретные объекты. После прослушивания слов-стимулов пациенту необходимо было их воспроизвести. Процедуру повторяли пять раз. Фиксируемые показатели: число верно воспроизведенных слов-стимулов; число неоднократно повторяющихся слов в каждом предъявлении; число привнесенных слов. Оценка объема кратковременной зрительно-образной памяти осуществляли с помощью методики «Зрительная память». Пациентам предъявляли таблицу, состоящую из 16 клеток. В каждой клетке было одно контурное изображение отдельного объекта (геометрические фигуры и схематичные изображения предметов). Время предъявления — 2 мин, после чего пациент называл изображенные объекты. Таблицу тоже предъявляли пятикратно. После каждого предъявления фиксировали аналогичные показатели.

За основу организации двух последующих экспериментальных этапов исследования был взят эксперимент Ф. Бартлетта по реконструкции памяти при ее активном извлечении.

Изучение процессов консолидации и реконсолидации зрительно-образной памяти

В качестве стимульного материала на втором этапе пациентам предлагали символическое изображение — букву древнегреческого алфавита, напоминающую сову (рис. 2). Основанием выбора изображения было его отсутствие в предшествующем опыте.

Символическое изображение (символ) включало в себя четыре части: «голову», «туловище с ног», «крыло», «ногу». В каждой из частей символического изображения выделяли элементы (например, часть «голова» содержит два элемента — саму голову и внутреннюю часть в виде «галочки»). Инструкция: «Перед вами определенное изображение. Скопируйте его, пожалуйста, по образцу». Далее (через 40 мин, 4 ч, 36 ч) пациентам давали следующую инструкцию: «Помните, мы копировали с вами изображение? Нарисуйте его сейчас, как помните, максимально приближенно к оригиналу». Оценка зрительной образной памяти проводили по четырем критериям: целостность фигуры, число потерь, число искажений, число сохраненных элементов.

Оценка процессов консолидации и реконсолидации семантической слухоречевой памяти

Стимульный материал — текст из эпоса индейцев Канады, предъявляемый на русском языке, содержащий 79 смысловых единиц, 33 предложения, 1427 знаков, 295 слов. Смысловая единица — грамматическая форма, характеризующаяся семантическим содержанием и реализующаяся в различных сочетаниях существительных как основной лингвистической формы с другими

Таблица. Показатели разброса объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти по группам испытуемых

Группы испытуемых	Серии воспроизведения (min-max)											
	1		2		3		4		5		40 мин	
	CP	ЗО	CP	ЗО	CP	ЗО	CP	ЗО	CP	ЗО	CP	ЗО
Односторонняя тугоухость	5-7	9-10	5-6	10-12	5-7	11-12	6-7	11-12	6-7	11-12	4-5	8-10
Двусторонняя тугоухость	5-6	8-9	5-7	8-10	5-6	9-10	5-6	9-11	4-6	9-10	3-6	8-9
Нарушения зрения	5-7	7-9	6-7	8-9	5-7	8-10	6-7	9-11	6-7	7-9	4-6	6-9
Сочетанная патология	4-6	5-7	5-6	6-7	5-6	6-8	4-6	7-8	4-5	7-8	3-5	5-7

Примечание: CP — слухоречевая память; ЗО — зрительно-образная память.

формами (прилагательными, глаголами, местоимениями). Инструкция: «Сейчас я прочитаю текст. Послушайте его и перескажите максимально близко к тексту». По истечении 40 мин, 4 ч, 36 ч пациентам было предложено вспомнить текст и воспроизвести по памяти. Критерии оценки: число сохраненных предложений, число сохраненных семантических единиц, число искаженных предложений, число искаженных семантических единиц, число нарушений последовательности предложений, число нарушений последовательности семантических единиц. За семантические единицы были приняты следующие категории: объект и признак (кто и какой), объект и время (когда), объект и действие (что делали), объект и место (где), а также причинно-следственные связи. Для регистрации разработана семантическая карта. Выделяли две формы ошибок: ошибки замен и ошибки потерь. Ошибки замен — искаженные семантические единицы и конфабляторные семантические единицы. Ошибки потерь — бессвязные предложения, не имеющие семантического содержания.

Количественную обработку осуществляли с использованием методов описательной (показатели средних значений, стандартное отклонение) и сравнительной (непараметрические критерии: *U*-критерий Манна-Уитни, *T*-критерий Уилкоксона, $p < 0,05$) статистики. Сравнение исследовательских групп осуществляли попарно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате первого этапа исследования сформированы исследовательские группы по критериям неврологического и соматического статуса.

При оценке объема кратковременной памяти (первый экспериментальный этап) установлено снижение объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти по всем группам испытуемых (табл.).

При оценке значимости различий в числе верно воспроизведенных вербальных и зрительно-образных стимулов по группам испытуемых путем попарного сравнения значимых различий не выявлено. На уровне статистической тенденции максимальное снижение объема кратковременной слухоречевой памяти выявлено при двусторонней тугоухости ($x \pm \sigma = 5,12 \pm 0,72$) и сочетанной патологии ($x \pm \sigma = 4,12 \pm 0,10$). Потеря исходного содержания составляет более 50%. Сенсорный дефицит слуховой анализаторной системы приводит к частичной потере и искажению поступающей информации уже на этапе восприятия. Для пациентов с нарушениями слуха характерно привнесение большого числа новых слов при их многократном повторении. Снижение объема зрительно-образной памяти до минимальных значений выявлено при сочетанной патологии ($x \pm \sigma = 7,19 \pm 0,22$)

и нарушениях зрения ($x \pm \sigma = 7,42 \pm 0,68$). Потеря исходного содержания в указанных группах составляет более 50%. Происходит замена исходных зрительно-образных стимулов схожими по размеру и общей форме изображения (вместо изображения дивана называют кровать; яблоко заменяют мячом; козу заменяют собакой и др.). На этапе запоминания (при каждом предъявлении таблицы с изображениями на 2 мин) все пациенты верно идентифицируют и называют изображенные объекты.

В результате экспериментального исследования процессов консолидации и реконсолидации зрительно-образной памяти были выявлены следующие особенности. На этапе копирования стимульного изображения максимальное сходство с сохранением всех частей и элементов изображения символа выявлено в группе пациентов с односторонней тугоухостью (рис. 2А). При двусторонней тугоухости на этапе копирования отмечена сохранность частей стимульного изображения при искажении его элементов. Скопированное изображение привнесло к созданию конкретного образа — совы, с прорисовкой глаз и клюва (рис. 2Б). При зрительном дефиците и сочетанной патологии зафиксировано искажение образа в направлении нарушения его целостности. При наличии зрительного дефицита происходит распад исходного изображения в виде отдельных, несвязанных между собой линий (рис. 2В, Г). На этапе копирования стимульного изображения, характеризующем процесс сохранения зрительно-образной информации в кратковременной памяти с последующей консолидацией, отмечена трансформация символического изображения в образное, что приводит к изначальной фиксации искаженного образа.

При исследовании процесса реконсолидации образно-символической информации через 40 мин, через 4 ч, через 36 ч у пациентов с сенсорными нарушениями отмечено воспроизведение искаженного консолидированного зрительно-образного содержания вне зависимости от степени и характера нарушения (рис. 3).

Минимальные искажения выявлены при односторонней тугоухости. Лишь при воспроизведении через 36 ч пациенты данной группы сокращают число частей и элементов изображения при внесении конкретного образного содержания (четко прорисованы птичьи лапки с пальцами) (рис. 3-III-A).

При двусторонней тугоухости на этапе консолидации (при непосредственном срисовывании стимульного символического изображения) происходит трансформация символического изображения в образное — четко прорисованы клюв, глаза, уши у совы. При последующих воспроизведениях через 40 мин, 4 ч и 36 ч конкретность и детализированность прорисовки образа совы



Рис. 2. Стимульное изображение для копирования и примеры изображений на этапе копирования по группам пациентов

сохраняется. Число частей, при этом, остается неизменным и соответствует исходному символическому изображению. Также у данной группы пациентов в процессе реконсолидации (через 40 мин, 4 ч и 36 ч) выявлено дальнейшее упрощение образа в сторону трансформации в конкретные образы, имеющиеся в предшествующем опыте, при уменьшении количества элементов.

В группе пациентов со зрительным дефицитом, при использовании средств коррекции зрения, искажения при срисовывании характеризуются нарушением целостности частей изображения (рис. 2В). При воспроизведении через 40 мин фиксируется распад исходного стимула. Изображение становится конкретизированным, теряет символическое значение. В процессе реконсолидации образ приобрел более целостный, завершённый вид. Присутствуют дополнительные линии, которые

накладываются на изображение. Спустя 4 ч пациент воспроизводит целостный образ, который остается непохожим ни на стимул, ни на срисованное изображение. В процессе консолидации информации, при переводе образа в долговременную память, символ приобретает черты птицы. Пациент не просто пытается механически скопировать фигуру (что затруднительно при сенсорном дефиците), а воссоздает новый образ, имеющийся в его опыте.

Обратная картина происходит при сочетанной патологии. Копирование стимульного изображения сохраняет черты символа (рис. 2Г). Однако через 40 мин происходит дальнейший распад фигуры, в которой от первоначального стимула остается только «голова», туловище представлено серией неупорядоченных линий. Данный феномен можно объяснить функционированием

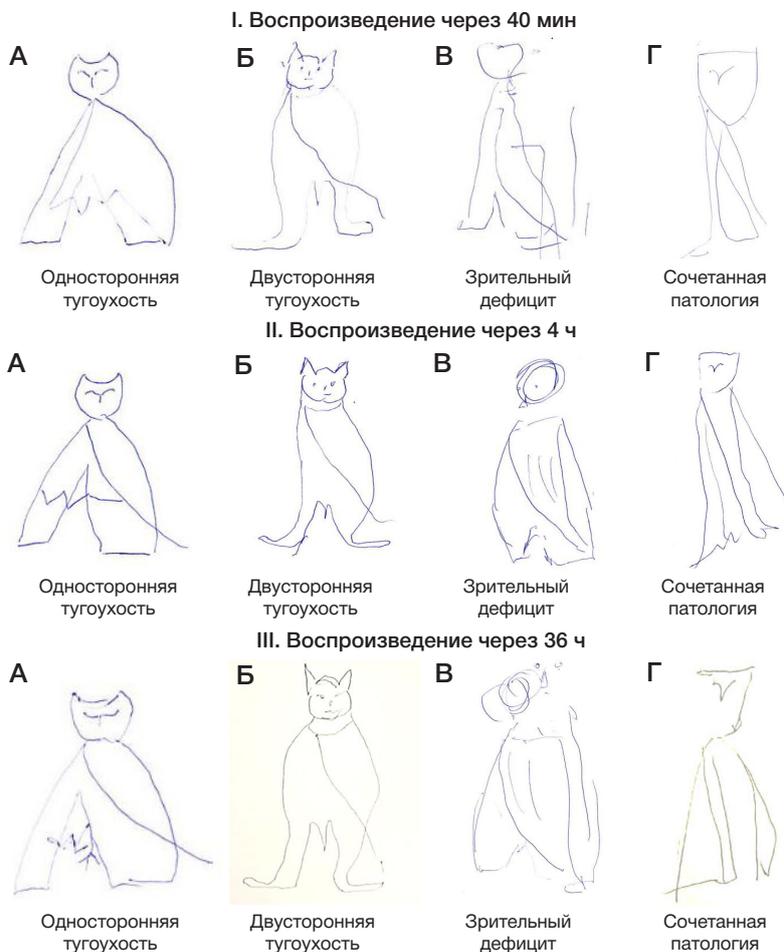


Рис. 3. Примеры изображений пациентов с сенсорным дефицитом при срисовывании и воспроизведении (через 40 мин, 4 ч, 36 ч)

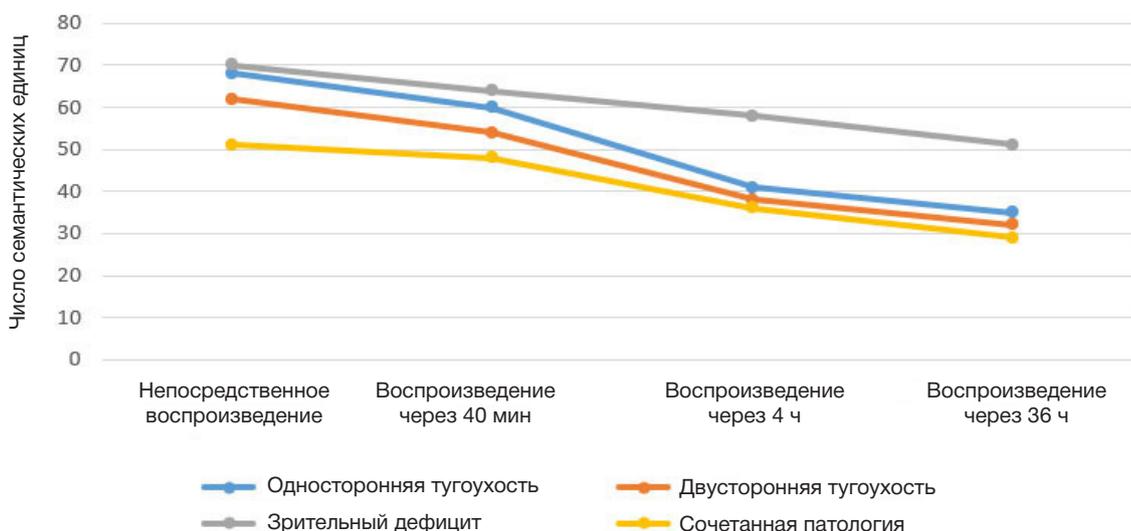


Рис. 4. Усредненные профили верно воспроизведенных семантических единиц при воспроизведении текста по группам испытуемых

компенсаторных механизмов, которые при воспроизведении позволяют пациенту сформировать целостность изображения, опираясь на имеющийся опыт. При воспроизведении стимульного изображения через 4 ч и через 36 ч происходит дальнейший распад — потеря отдельных элементов и упрощение имеющихся до отдельных линий, частично связанных между собой.

Итак, при извлечении зрительно-образной информации у пациентов с сенсорными нарушениями зафиксирована трансформация изображения с утратой символического значения. Происходят его конкретизация и детализация в соответствии с имеющейся в предшествующем опыте информацией (приведение символического изображения к образу совы). В случаях слухового нарушения — в конкретный образ; при зрительном дефиците — полный распад зрительно-образного содержания в две отдельные самостоятельные детали — окружность головы и «туловище» с множественностью дополнительных линий (рис. 3-II-B и 3-III-B).

При исследовании процессов консолидации и реконсолидации слухоречевой памяти у пациентов с сенсорными нарушениями на основании показателей средних значений числа семантических единиц при воспроизведении текста по группам испытуемых были сформированы усредненные профили (рис. 4).

В результате воспроизведения текста непосредственно после предъявления максимальная потеря семантического содержания выявлена в группе пациентов с сочетанной патологией. Наиболее полно семантическое содержание воспроизводили пациенты со зрительным дефицитом. Снижение числа верно воспроизведенных семантических единиц в данной группе испытуемых через 40 мин, 4 ч и 36 ч в группе пациентов со зрительным дефицитом значимо не различаются. В результате оценки значимости различий числа верно воспроизведенных семантических единиц в группах пациентов с одно- и двусторонней тугоухостью, а также сочетанной патологией, значимое снижение числа верно сохраненных семантических единиц выявлено между воспроизведением через 40 мин и через 4 ч: при односторонней тугоухости ($p = 0,019$); при двусторонней тугоухости ($p = 0,021$); при сочетанной патологии ($p = 0,021$). Между группами пациентов статистически значимые различия выявлены лишь при воспроизведении информационного содержания через 4 ч. Число верно воспроизведенных семантических единиц при зрительном

дефиците значимо выше в сравнении с пациентами с односторонней тугоухостью ($p = 0,022$), с двусторонней тугоухостью ($p = 0,021$), с сочетанной патологией ($p = 0,019$). Между группами пациентов с одно- и двусторонней тугоухостью, а также сочетанной патологией, статистически значимых различий не выявлено.

Анализируя число и характер допущенных ошибок при непосредственном воспроизведении слухоречевой информации, а также через 40 мин, 4 ч и 36 ч, по всем группам испытуемых установлено снижение числа сохраненных верно воспроизведенных семантических единиц при увеличении числа искаженных и конфабуляторных семантических единиц, а также числа бессвязных предложений, не имеющих семантического содержания (рис. 5).

В результате изучения процессов консолидации и реконсолидации слухоречевой памяти у пациентов с сенсорными нарушениями выявлены общие и специфические закономерности. Общей является тенденция к схематизации и конкретизации текста. Отмечена тенденция к изменению предложения при общей сохранности семантических единиц. Смысловое (семантическое) содержание остается более неизменным по сравнению с конкретной формулировкой предложения. На всех этапах воспроизведения зафиксирована относительная стабильность содержания текста по сравнению с тем, который был сохранен пациентами при непосредственном воспроизведении.

Для пациентов со зрительным дефицитом характерны упрощение предложения, а также употребление предложений либо коротких, либо объединение нескольких в одно, если они объединены одной смысловой темой. Для пациентов с нарушением слуха характерны множественное привнесение подробностей, чрезмерная детализация. Излишняя детализация и многословность при пересказе приводят к потере семантического содержания. Пересказ похож на диалог с самим собой относительно правильности услышанного: «...Однажды ночью двое молодых людей пошли на охоту из поселения Эгулак охотиться на тюленей. На тюленей? По-моему, нет. Почему тюленей? Это где-то в южных широтах. Странно. Ну ладно...»

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе исследования результаты согласуются с данными, представленными другими авторами

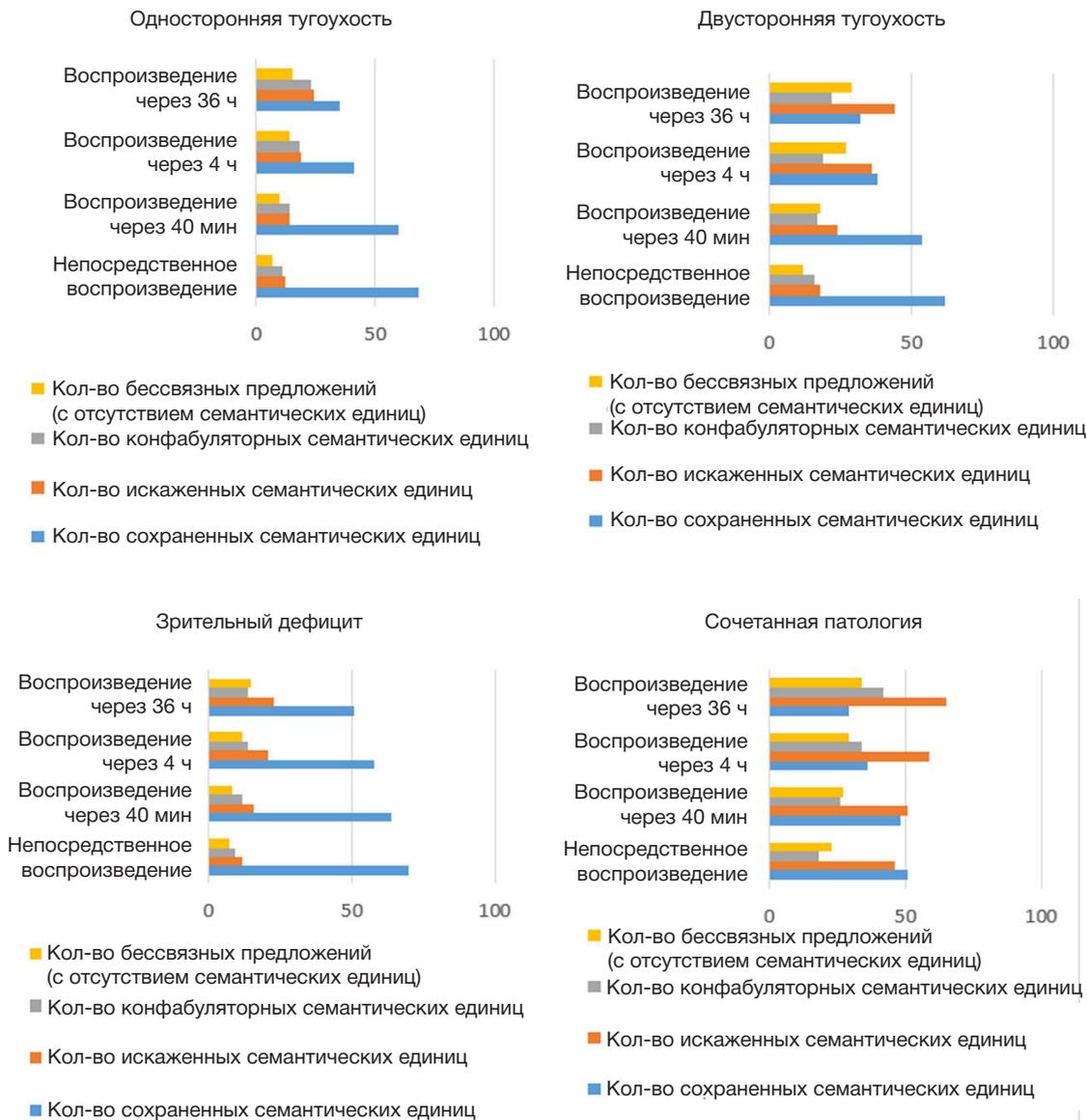


Рис. 5. Гистограммы средних значений показателей изучения слухоречевой памяти в пожилом возрасте по группам испытуемых

[10–12]. Ряд авторов указывают на то, что снижение объема запоминания обусловлено невозможностью переключения внимания с актуальных психологических переживаний на решение когнитивных задач. Объективные нарушения мнестических функций при этом могут отсутствовать или могут быть выражены минимально (по данным объективного нейропсихологического обследования). Выявленное в результате исследования снижение объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти у пациентов пожилого возраста с сенсорными нарушениями приводит к тому, что уже на этапе сохранения информации при копировании (срисовывании) символического изображения и непосредственного пересказе текста происходит искажение и частичная потеря информации. Это приводит к тому, что консолидируется изначально неполная/искаженная информация, которая при последующем ее извлечении из долговременной памяти в процессе реактивации и рекатегоризации претерпевает дальнейшие трансформации, что в итоге приводит к значительным потерям.

Установлено в результате изучения процессов консолидации и реконсолидации памяти у лиц пожилого возраста с сенсорными нарушениями изменение

качественно-количественных характеристик процессов консолидации и реконсолидации памяти. Данное изменение с высокой долей вероятности обусловлено снижением объема кратковременной памяти (как слухоречевой, так и зрительно-образной). На этапе краткосрочной фазы процесса памяти происходит фиксация сохраняемой информации без потери и искажения содержания в течение короткого промежутка времени. С учетом снижения объема кратковременной памяти экспериментально доказано, что при запоминании у пациентов с нарушениями слуха и зрения консолидируется содержательно искаженная и сокращенная по объему информация. Это лабильная фаза памяти, обеспечивающая удержание информационного следа в форме реверберации нервных импульсов, которая в пожилом возрасте также изменяется (что является закономерным изменением нейродинамики в пожилом возрасте).

ВЫВОДЫ

Достоверно установлено, в процессе каждой реактивации зрительно-образной информации у пожилых пациентов с сенсорными нарушениями фиксируется конкретизация

и детализация стимульного изображения в соответствии с имеющейся в предшествующем опыте информацией (приведение символического изображения к образу совы). У пациентов со слуховыми нарушениями — в конкретный образ; у пациентов со зрительными нарушениями — полный распад зрительно-образного содержания на две отдельные несвязанные детали — окружность головы и «туловище» с множественностью дополнительных линий. При сочетанной патологии происходит потеря отдельных элементов и упрощение имеющихся до отдельных линий, частично связанных между собой. Данный распад обусловлен невозможностью представить символ во внутреннем речевом плане через процесс рекатегоризации.

При воспроизведении слухоречевой информации в процессе реактивации памяти происходит ее упрощение с компенсацией недостающего (утраченного) содержания конфабуляциями, семантически «пустыми» многословными предложениями, повторениями упрощенных логико-грамматических конструкций, не соответствующих по семантическому содержанию исходному тексту.

Результаты исследования указывают на необходимость «подстройки» вновь поступающей информации к уже имеющейся в памяти информации, что позволит минимизировать ее искажения на этапе консолидации, а также ее трансформацию при последующей реструктуризации и реконсолидации. В то же время в связи со снижением объема кратковременной памяти, для повышения эффективности процессов консолидации и реконсолидации пациентам пожилого возраста с сенсорными нарушениями необходимо представлять новую информацию дозированно, с учетом объема кратковременной памяти. Это позволит снизить объем потери вновь поступающей информации на этапе ее консолидации. В последующих исследованиях процессов консолидации и реконсолидации памяти при зрительных и слуховых нарушениях в пожилом возрасте следует обозначить расширение возрастного диапазона испытуемых, а также выявить особенности процессов консолидации и реконсолидации у пожилых пациентов с нарушениями зрения и слуха при конкретных нозологиях.

Литература

1. Кузовков В. Е., Сугарова С. Б., Лиленко А. С., Луппов Д. С. Влияние снижения слуха на когнитивную функцию и ее оценка. Российская оториноларингология. 2020; 19 (2-105): 80–84.
2. Сугарова С. Б., Кузовков В. Е., Кантемирова Р. К., Лиленко С. В., Луппов Д. С., Лиленко А. С., Каляпин Д. Д. Влияние снижения слуха на когнитивную функцию у пациентов пожилого и старческого возраста и ее оценка после кохlearной имплантации (обзор литературы). Успехи геронтологии. 2020; 33 (6): 1174–80.
3. Бобошко М. Ю., Голованова Л. Е., Тахтаева Н. Ю., Ефимова М. В. Возрастные нарушения слуха и особенности их коррекции. Российская оториноларингология. 2011; 4 (53): 30–33.
4. Подгорная Н. Н. Нарушения зрительных функций в пожилом и старческом возрасте: основные причины, новые возможности лечения. Клиническая геронтология. 2006; 7: 3–12.
5. Rosemann S, Thiel CM. Neural Signatures of Working Memory in Age-related Hearing Loss. Neuroscience. 2020; 429: 134–42. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.046.
6. Loughrey DG, Feeney J, Kee F, Lawlor BA, Woodside JV, Setti A, et al. Social factors may mediate the relationship between subjective age-related hearing loss and episodic memory. Aging & Mental Health. 2020; 25 (5): 824–31, DOI: 10.1080/13607863.2020.1727847.
7. Moorman SM, Greenfield EA, Lee CSH. Perceived hearing loss, social disengagement, and declines in memory. Journal of Applied Gerontology. 2020. DOI: 10.1177/0733464820909244.
8. Griffiths TD, Lad M, Kumar S, Holmes E, McMurray B, Eleanor A, et al. How Can Hearing Loss Cause Dementia? Neuron. 2020; 108 (3): 401–2. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.08.003.
9. Лурия А. Р. Потерянный и возвращенный мир. Маленькая книжка о большой памяти. СПб.: Питер, 2018; 290 с.
10. Мелёхин А. И. Метакогнитивные способности в пожилом возрасте: специфика и предикторы. Экспериментальная психология. 2019; 12 (3): 47–62. DOI: 10.17759/exppsy.2019120304.
11. Милёхин А. И. Специфика изменений в памяти на лица в пожилом и старческом возрасте. Коллекция гуманитарных исследований. 2017; 6 (9): 81–97.
12. Путилина М. В. Нарушение памяти у пожилых пациентов. Возможные терапевтические стратегии. Поликлиника. 2017; 2: 57–61.

References

1. Kuzovkov VE, Sugarova SB, Lilenko AS, Luppov DS. Vliyanie snizheniya sluxa na kognitivnyuyu funkciyu i ee ocenka. Rossijskaya otorinolaringologiya. 2020; 19 (2-105): 80–84. Russian.
2. Sugarova SB, Kuzovkov VE, Kantemirova RK, Lilenko SV, Luppov DS, Lilenko AS, Kalyapin DD. Vliyanie snizheniya sluxa na kognitivnyuyu funkciyu u pacientov pozhilogo i starcheskogo vozrasta i ee ocenka posle koxlearnoj implantacii (obzor literatury). Uspexi gerontologii. 2020; 33 (6): 1174–80. Russian.
3. Boboshko MYu, Golovanova LE, Taxtaeva NYu, Efimova MV. Vozrastnye narusheniya sluxa i osobennosti ix korrekcii. Rossijskaya otorinolaringologiya. 2011; 4 (53): 30–33. Russian.
4. Podgornaya NN. Narusheniya zritel'nyx funkcyj v pozhilom i starcheskom vozraste: osnovnyye prichiny, novye vozmozhnosti lecheniya. Klinicheskaya gerontologiya. 2006; 7: 3–12. Russian.
5. Rosemann S, Thiel CM. Neural Signatures of Working Memory in Age-related Hearing Loss. Neuroscience. 2020; 429: 134–42. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.046.
6. Loughrey DG, Feeney J, Kee F, Lawlor BA, Woodside JV, Setti A, et al. Social factors may mediate the relationship between subjective age-related hearing loss and episodic memory. Aging & Mental Health. 2020; 25 (5): 824–31, DOI: 10.1080/13607863.2020.1727847.
7. Moorman SM, Greenfield EA, Lee CSH. Perceived hearing loss, social disengagement, and declines in memory. Journal of Applied Gerontology. 2020. DOI: 10.1177/0733464820909244.
8. Griffiths TD, Lad M, Kumar S, Holmes E, McMurray B, Eleanor A, et al. How Can Hearing Loss Cause Dementia? Neuron. 2020; 108 (3): 401–2. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.08.003.
9. Luriya AR. Poteryannyj i vozvrashhennyj mir. Malen'kaya knizhka o bol'shoj pamyati. SPb.: Piter, 2018; 290 s. Russian.
10. Melokhin AI. Metakognitivnye sposobnosti v pozhilom vozraste: specifika i prediktory. Eksperimental'naya psixologiya. 2019; 12 (3): 47–62. DOI: 10.17759/exppsy.2019120304. Russian.
11. Milokhin AI. Specifika izmenenij v pamyati na lica v pozhilom i starcheskom vozraste. Kollekcija gumanitarnyx issledovanij. 2017; 6 (9): 81–97. Russian.
12. Putilina MV. Narushenie pamyati u pozhilyx pacientov. Vozmozhnye terapevticheskie strategii. Poliklinika. 2017; 2: 57–61. Russian.

ГЕМОПЕРФУЗИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКУЛЫ ПОСЛЕ СОЧЕТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И. В. Воробьева^{1,2}✉, Е. В. Булава¹, Л. К. Мошетова¹, А. В. Пинчук^{3,4,5}

¹ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского, Москва, Россия

⁴ Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента, Москва, Россия

Сочетанная трансплантация почки и поджелудочной железы (СТПиПЖ) — эффективный метод лечения больных с сахарным диабетом 1-го типа (СД1) и терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ТХПН), который приводит к купированию гипергликемии и уремического синдрома. Целью работы было изучить морфофункциональное состояние и гемодинамику макулы у пациентов с СД1 после СТПиПЖ. В исследовании участвовали 45 пациентов, разделенных на три группы: в группу А вошли пациенты с СД1 после СТПиПЖ; в группу В — с СД1 и ТХПН, проходящие курсы программного гемодиализа (ПГД) и ожидающие СТПиПЖ; в группу С — лица, не имеющие глазных и системных патологий. Всем пациентам проводили традиционное офтальмологическое обследование, а также измерение центральной толщины сетчатки (ЦТС), среднего значения плотности перфузии в четырех сосудистых слоях: поверхностном (ПКСС) и глубоком (ГКСС) капиллярных сплетениях сетчатки, слое хориокапилляров (ХК) и хориоидеи. После СТПиПЖ, по сравнению с ПГД, выявлено уменьшение ЦТС (в группе А: 241 ± 33 мкм; в группе В: 309 ± 10 мкм; $p < 0,05$), увеличение среднего значения плотности перфузии сетчатки (в группе А: ПКСС — $19,0 \pm 1,6\%$, ГКСС — $10,7 \pm 1,3\%$; в группе В: ПКСС — $11,7 \pm 0,8\%$, ГКСС — $4,8 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$) и хориоидеи (в группе А: ХК — $28,1 \pm 1,8\%$, хориоидея — $31,3 \pm 1,6\%$; в группе В: ХК — $20,4 \pm 1,6\%$, хориоидея — $21,8 \pm 1,3\%$; $p < 0,05$) в макулярной области, остроты зрения (в группе А: $0,7 \pm 0,1$; в группе В: $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$) и порога светочувствительности макулы (в группе А: $25,9 \pm 1,4$ дБ; в группе В: $22,3 \pm 1,1$ дБ; $p < 0,05$). Нормализация углеводного обмена и купирование уремического синдрома у больных с СД1 и ТХПН после СТПиПЖ благоприятно влияют на состояние макулярной области в виде улучшения макулярного кровотока и зрительных функций.

Ключевые слова: сахарный диабет, диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, сочетанная трансплантация почки и поджелудочной железы, оптическая когерентная томография-ангиография

Благодарности: МГОЦ ГКБ им. С. П. Боткина в лице Г. Ш. Аржиматовой.

Вклад авторов: И. В. Воробьева — анализ литературы, планирование и руководство исследованием, анализ и интерпретация данных; Е. В. Булава — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; Л. К. Мошетова — планирование и руководство исследованием, анализ и интерпретация данных; А. В. Пинчук — планирование и руководство исследованием.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (протокол № 1 от 18 января 2021 г.); все участники подписали добровольное согласие на участие в данном исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Витальевна Воробьева
2-й Боткинский пр-д, д. 5, корпус 19, г. Москва, 125284, Россия; irina.docent2000@mail.ru

Статья получена: 22.02.2022 **Статья принята к печати:** 10.03.2022 **Опубликована онлайн:** 05.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.013

HEMOPERFUSION AND FUNCTIONAL STATE OF THE MACULA AFTER SIMULTANEOUS PANCREAS AND KIDNEY TRANSPLANTATION

Vorobyeva IV^{1,2}✉, Bulava EV¹, Moshetova LK¹, Pinchuk AV^{3,4,5}

¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³ Sklifosovskiy Research Institute for Emergency Medical Aid, Moscow, Russia

⁴ Evdokimov Moscow University of Medicine & Dentistry, Moscow, Russia

⁵ Research Institute of Healthcare Organization and Medical Management, Moscow, Russia

Simultaneous pancreas and kidney transplantation (SPK) provides effective treatment in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) and end-stage renal failure (ESRF), mitigating the hyperglycemia and uremic syndrome. The study aimed at the assessment of morphofunctional status of the macula and macular hemodynamics in patients with T1DM after SPK. The study enrolled 45 patients subdivided into three groups: Group A — patients with T1DM after SPK; Group B — patients with T1DM and ESRF, maintained on programmed hemodialysis (PH), on waiting list for SPK; and Group C — individuals without ophthalmic or systemic pathologies. All patients were subject to the standard ophthalmological examination complemented by measurements of the central retinal thickness (CRT) and the average perfusion density (PD) in four vascular layers: superficial capillary plexus of the retina (SCP), deep capillary plexus of the retina (DCP), choriocapillaris, and choroid. The patients after SPK had significantly lower CRT (241 ± 33 μ m in Group A, 309 ± 10 μ m in Group B; $p < 0,05$) and significantly higher PD of the macular region in both the retina (Group A: SCP — $19,0 \pm 1,6\%$, DCP — $10,7 \pm 1,3\%$; Group B: SCP — $11,7 \pm 0,8\%$, DCP — $4,8 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$) and the choroid (Group A: choriocapillaris — $28,1 \pm 1,8\%$, choroid — $31,3 \pm 1,6\%$; Group B: choriocapillaris — $20,4 \pm 1,6\%$, choroid — $21,8 \pm 1,3\%$; $p < 0,05$), as well as significantly higher visual acuity (Group A: $0,7 \pm 0,1$; Group B: $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$) and macular light threshold (Group A: $25,9 \pm 1,4$ dB; Group B: $22,3 \pm 1,1$ dB; $p < 0,05$) compared with the patients on PH. Thus, the normalization of carbohydrate metabolism and the mitigation of uremic syndrome in patients with T1DM and ESRF after SPK favorably affect the functional condition of the macular area, as indicated by the improvement in macular blood flow and visual functions.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, simultaneous pancreas and kidney transplantation, optical coherence tomography angiography

Acknowledgements: the authors acknowledge Prof. G.Sh. Arzhimatova of the Botkin Hospital (Moscow) for helpful discussions.

Author contribution: Vorobyeva IV — literature analysis, planning and coordination of the study, data analysis and interpretation; Bulava EV — literature analysis, data collection, analysis and interpretation, preparation of the manuscript; Moshetova LK — study planning and supervision, data analysis and interpretation; Pinchuk AV — study planning and supervision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Committee at the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Protocol № 1 of January 18, 2021); the written informed consent for the study was provided by all participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Vorobyeva
Botkinsky pr-d, 2, korp. 19, Moscow, 125284 Russia; irina.docent2000@mail.ru

Received: 22.02.2022 **Accepted:** 10.03.2022 **Published online:** 05.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.013

Около 10% случаев сахарного диабета во всем мире приходится на диабет 1-го типа (СД1). Этот наиболее тяжелый тип диабета развивается вследствие аутоиммунного поражения β -клеток поджелудочной железы. До 85% случаев СД1 диагностируют в раннем подростковом возрасте. Во всем мире им страдают более 1 100 000 людей в возрасте до 20 лет. Данный показатель растет: ежегодно выявляется 132 600 новых случаев заболевания [1]. Распространенность СД1 в России на конец 2020 г. составила 180,9 случаев на 100 тыс. населения [2].

Основным лечением СД1 остается инсулинотерапия. Адекватная экзогенная доставка инсулина способна купировать гипергликемию и предупредить развитие и прогрессирование диабетических осложнений [3]. Несмотря на это, согласно реестру T1D Exchange, только 21% пациентов с СД1 могут достичь рекомендованного уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) [4], в связи с чем осложнения СД1 остаются лидирующими причинами инвалидизации и смерти пациентов [5].

После сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний диабетическая нефропатия (ДН) — третья по значимости причина смерти населения. У лиц, страдающих СД1, ДН в течение 15–20 лет прогрессирует до терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ТХПН) [6]. Для спасения жизни пациентов требуется проведение заместительной почечной терапии. Диализная терапия достаточно дорогостоящая процедура в системе здравоохранения, для ее проведения необходимы специализированные учреждения, оборудование, штат медицинских специалистов. Кроме того, это очень изнурительная процедура для пациентов с рядом побочных эффектов [7]. Пересадка почки пациентам с СД1 — малоэффективный метод лечения: нередко происходит развитие вторичной нефропатии в посттрансплантационном периоде [8].

Сочетанная трансплантация почки и поджелудочной железы (СТПиПЖ) — наиболее эффективный метод лечения пациентов с СД1 и ТХПН, нормализующий углеводный обмен и выделительную функцию почек, который освобождает пациентов от постоянного мониторинга глюкозы, инсулинотерапии и изнурительных курсов гемодиализа [9].

Цель исследования — оценить морфофункциональное состояние и гемодинамику макулы на фоне нормализации гликемии и купирования уремического синдрома у пациентов с СД1 после СТПиПЖ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 45 пациентов (68 глаз). Критерии включения пациентов в исследование: наличие СД1 и ТХПН, прохождение курсов программного гемодиализа (ПГД), функционирующий поджелудочный и почечный аллотрансплантаты, отсутствие глазных и системных патологий. Критерии исключения: СД2 и другие системные патологии, ТХПН недиабетического генеза, отторжение трансплантата поджелудочной железы и/или почки. Глаза пациентов после лазерной коагуляции сетчатки в макулярной области, витрэктомии, экстракции катаракты, панретинальной лазерной коагуляции сетчатки (ПРЛКС) менее чем за 6 месяцев до обследования, имеющие выраженные пролиферативные изменения макулы, сопутствующую патологию сетчатки, глаукому, интенсивное помутнение оптических сред, аномалию рефракции высокой степени были исключены из исследования.

Все пациенты были поделены на три группы: группа А (основная группа) — пациенты с СД1 (15 человек, 18 глаз), перенесшие СТПиПЖ (рис. 1); группа В (группа сравнения) — пациенты из списка ожидающих СТПиПЖ (15 человек, 20 глаз), страдающие СД1 в тяжелой форме в фазе декомпенсации и ТХПН, проходящие курсы ПГД; группа С (группа контроля) — лица, не имеющие глазных и системных патологий (15 человек, 30 глаз).

При офтальмологическом осмотре всем пациентам измеряли максимально коррегируемую остроту зрения (МКОЗ), внутриглазное давление, проводили биомикроскопию переднего отрезка глаза, непрямую офтальмоскопию при помощи щелевой лампы и асферической линзы в 78 диоптрий, фоторегистрацию глазного дна.

Измерение центральной толщины сетчатки (ЦТС) и плотности перфузии сетчатки и хориоидеи проводили на оптическом когерентном томографе с режимом

Таблица. Анализ плотности перфузии макулярной области в четырех сосудистых слоях

Показатель	Группа	M ± SD	95% ДИ	n	p	
Плотность перфузии ПКСС (%)	A	19,0 ± 1,6	17,0–21,0	18	группа А – группа В	<0,05*
	B	11,7 ± 0,8	10,7–12,7	20	группа А – группа С	<0,05*
	C	34,3 ± 1,0	33,6–35,4	30	группа В – группа С	<0,05*
Плотность перфузии ГКСС (%)	A	10,7 ± 1,3	9,3–12,2	18	группа А – группа В	<0,05*
	B	4,8 ± 0,8	3,8–5,8	20	группа А – группа С	<0,05*
	C	14,3 ± 1,2	13,3–15,6	30	группа В – группа С	<0,05*
Плотность перфузии ХК (%)	A	28,1 ± 1,8	25,7–30,5	18	группа А – группа В	<0,05*
	B	20,4 ± 1,6	18,3–22,4	20	группа А – группа С	<0,05*
	C	45,7 ± 0,8	45,0–46,4	30	группа В – группа С	<0,05*
Плотность перфузии хориоидеи (%)	A	31,3 ± 1,6	29,2–33,8	18	группа А – группа В	<0,05*
	B	21,8 ± 1,3	20,2–23,4	20	группа А – группа С	<0,05*
	C	48,0 ± 0,8	47,2–48,8	30	группа В – группа С	<0,05*

Примечание: ПКСС — поверхностное капиллярное сплетение сетчатки; ГКСС — глубокое капиллярное сплетение сетчатки; ХК — хориокапилляры; группа А — пациенты после сочетанной трансплантации почки и поджелудочной железы; группа В — пациенты из листа ожидания сочетанной трансплантации почки и поджелудочной железы; группа С — здоровые пациенты.

ангиографии (ОКТА) RS-3000 Advance 2 (NIDEK; Япония). Среднее значение плотности перфузии макулы определяли в режиме AngioScan в четырех сосудистых сплетениях (площадь сканирования составила $3,0 \times 3,0$ мм): поверхностном (ПКСС) и глубоком (ГКСС) капиллярных сплетениях сетчатки, слое хориокапилляров (ХК) и хориоидеи (рис. 2). Порог светочувствительности сетчатки определяли при помощи фундус-микроскопии МАΙΑ (CenterVue Spa; Италия).

Для оценки степени компенсации СД1 и состояния выделительной функции почек всем пациентам производили анализ крови с целью определения уровня HbA1c, креатинина и мочевины, а также расчет скорости клубочковой фильтрации (СКФ).

Полученные результаты анализировали в программе StatTech v. 2.6.2 («Статтех»; Россия). С помощью критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению. Сравнение трех и более групп по количественному показателю выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Определение тесноты и направления корреляционной связи между количественными данными проводили с помощью коэффициента корреляции Пирсона и коэффициента Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были обследованы 24 женщины и 21 мужчина, средний возраст пациентов составил 35 ± 7 лет. Статистически значимая разница между группами по половому ($p = 0,784$) и возрастному ($p = 0,839$) признакам отсутствовала. Средняя продолжительность СД1 в группах А и В составила 27 ± 8 лет. Статистически значимой разницы в длительности СД1 между группами не выявлено ($p = 0,475$). Среди пациентов групп А и В встречались препролиферативная (ППДР) и пролиферативная (ПДР) стадии диабетической ретинопатии, в связи с чем всем пациентам данных групп ранее была выполнена ПРЛКС. Различий в частоте распространенности ППДР и ПДР между группами не наблюдалось ($p = 0,756$). Средняя продолжительность посттрансплантационного периода в группе А составила 21 ± 11 месяцев. Средняя продолжительность курсов ПГД в группе В составила 24 ± 8 месяцев.

При сравнительном анализе ЦТС между тремя группами пациентов выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$). Наибольшую ЦТС наблюдали в группе пациентов с декомпенсированным течением СД1 (309 ± 10 мкм), нежели в группе пациентов, перенесших СТПиПЖ (241 ± 33 мкм), и здоровых лиц (260 ± 6 мкм).

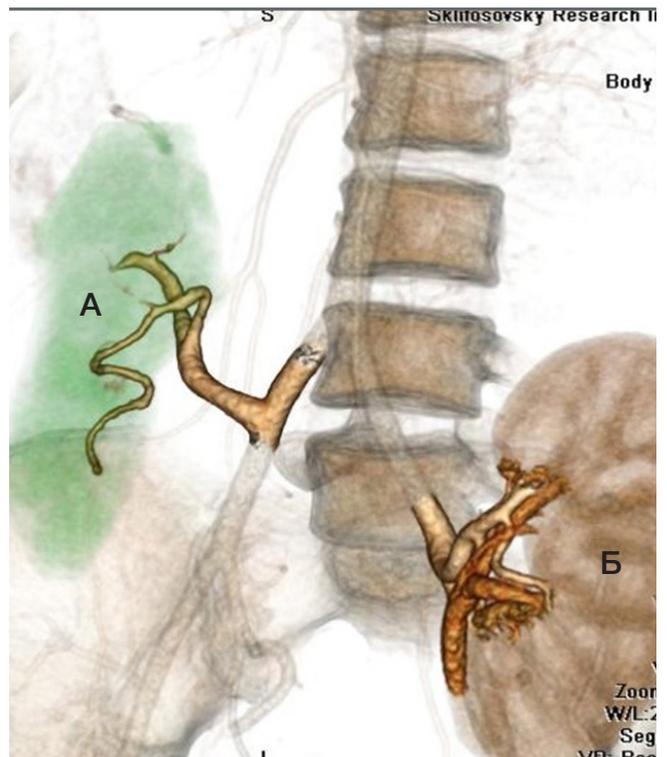


Рис. 1. Результаты компьютерной томографии с внутривенным контрастированием, 3D-реконструкция. Типичное расположение трансплантата поджелудочной железы (А) и почки (Б) при сочетанной трансплантации

Наиболее высокое среднее значение плотности перфузии сетчатки и хориоидеи отмечено у пациентов контрольной группы. Пациенты после СТПиПЖ имели более высокие показатели перфузии сетчатки и хориоидеи, чем пациенты, ожидающие трансплантацию (табл.).

После сочетанной трансплантации МКОЗ и светочувствительность макулы пациентов были значительно ($p < 0,05$) выше (МКОЗ — $0,7 \pm 0,1$; порог светочувствительности — $25,9 \pm 1,4$ дБ), чем у пациентов с декомпенсированным течением СД1 (МКОЗ — $0,5 \pm 0,1$; порог светочувствительности — $22,3 \pm 1,1$ дБ), ожидающих трансплантацию (рис. 3).

Во всех трех группах отмечена выраженная корреляция между показателями, отражающими функциональное состояние макулы и плотностью перфузии сетчатки и хориоидеи. МКОЗ имела прямую корреляционную взаимосвязь с плотностью перфузии хориокапилляров ($p = 0,886$; $p < 0,05$), а порог светочувствительности с плотностью перфузии ПКСС ($p = 0,772$; $p < 0,05$).

Уровень HbA1c был значительно выше в группе пациентов на ПГД, чем в группе после СТПиПЖ (группа А —

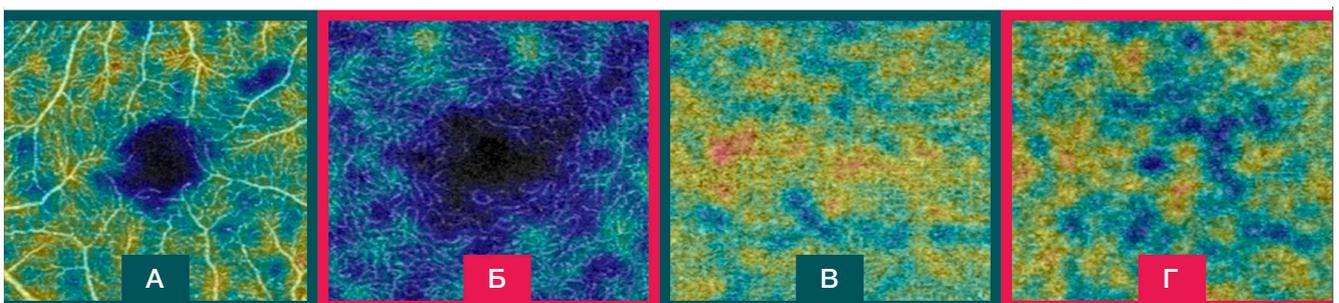


Рис. 2. Плотность перфузии в четырех сосудистых слоях макулярной области в цветовой кодировке на ОКТ-приборе NIDEK (Япония) RS-3000 Advance 2 в режиме AngioScan. (А) Поверхностное капиллярное сплетение сетчатки. (Б) Глубокое капиллярное сплетение сетчатки. (В) Слой хориокапилляров. (Г) Хориоидея

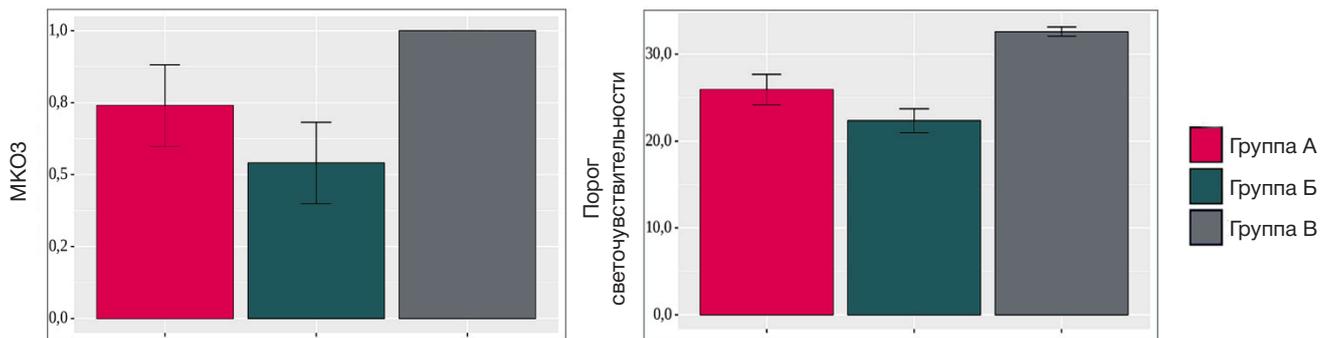


Рис. 3. Анализ функциональных показателей макулы. МКОЗ — максимально коррегируемая острота зрения. Группа А — пациенты после сочетанной трансплантации почки и поджелудочной железы. Группа Б — пациенты, ожидающие сочетанную трансплантацию почки и поджелудочной железы. Группа В — здоровые пациенты

$4,8 \pm 0,4\%$; группа В — $7,1 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$). Показатели ЦТС и плотность перфузии ПКСС зависели от уровня HbA1c. При высоких значениях HbA1c обнаружены увеличение ЦТС ($p = 0,848$; $p < 0,05$) и снижение плотности перфузии ПКСС ($r = -0,723$; $p < 0,05$).

Низкий показатель плотности перфузии ГКСС и ХК у пациентов группы В имел высокую корреляционную связь с функциональными почечными показателями (рис. 4). Между уровнем креатинина и плотностью перфузии ГКСС отмечена обратная зависимость ($p = -0,758$; $p < 0,05$), а между СКФ и плотностью перфузии ХК прямая ($p = 0,867$; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство исследований, посвященных изучению состояния сетчатки в посттрансплантационном периоде СТППЖ конца прошлого и начала нынешнего столетий, оценивали клинические проявления диабетической ретинопатии (ДР) по данным офтальмоскопии и флюоресцентной ангиографии. Результаты данных работ продемонстрировали стабилизацию и улучшение ДР, проявляющиеся в виде снижения потребности проведения лазерной коагуляции сетчатки и витрэктомии более чем в 60% случаев [10–13]. Ряд авторов зафиксировали улучшение офтальмоскопической картины у 21,3 и 41,7% больных, проявляющееся уменьшением числа твердых и мягких экссудатов, интравитреальных микрососудистых аномалий [14, 15]. Имеется сообщение об улучшении остроты зрения у пациентов с ПДР после СТППЖ [16].

На сегодняшний день, с появлением современного офтальмологического диагностического оборудования (ОКТА и микропериметрии), широко изучают вопрос гемодинамики и морфофункционального состояния сетчатки у пациентов с ДР на фоне разных видов лечения [17–21], однако мы не смогли найти данных о состоянии гемоперфузии и светочувствительности сетчатки у пациентов после СТППЖ.

До трансплантации наши пациенты имели более высокий показатель ЦТС (309 ± 10 мкм) и более низкий показатель среднего значения плотности перфузии макулы в четырех сосудистых слоях (ПКСС — $11,7 \pm 0,8\%$; ГКСС — $4,8 \pm 0,8\%$; ХК — $20,4 \pm 1,6\%$; хориоида — $21,8 \pm 1,3\%$), чем пациенты после пересадки почки и поджелудочной железы (ЦТС — 241 ± 33 мкм; ПКСС — $19,0 \pm 1,6\%$; ГКСС — $10,7 \pm 1,3\%$; ХК — $28,1 \pm 1,8\%$; хориоида — $31,3 \pm 1,6\%$; $p < 0,05$). Между ЦТС, плотностью перфузии макулы и лабораторными показателями крови, отражающими степень компенсации СД1 и функциональное состояние почек, обнаружена выраженная корреляционная зависимость. Нормализация гликемии и купирование уремии на фоне СТППЖ положительно влияют на периферическое микроциркуляторное русло: происходят улучшение состояния сосудистой стенки и уменьшение транссудации жидкости и форменных элементов крови в межсосудистое пространство сетчатки, проявляющееся снижением толщины сетчатки и улучшением гемоперфузии сетчатки и хориоидеи. Улучшение морфометрических показателей (уменьшение ЦТС) и гемоперфузии макулы (увеличение среднего значения плотности перфузии в четырех сосудистых слоях)

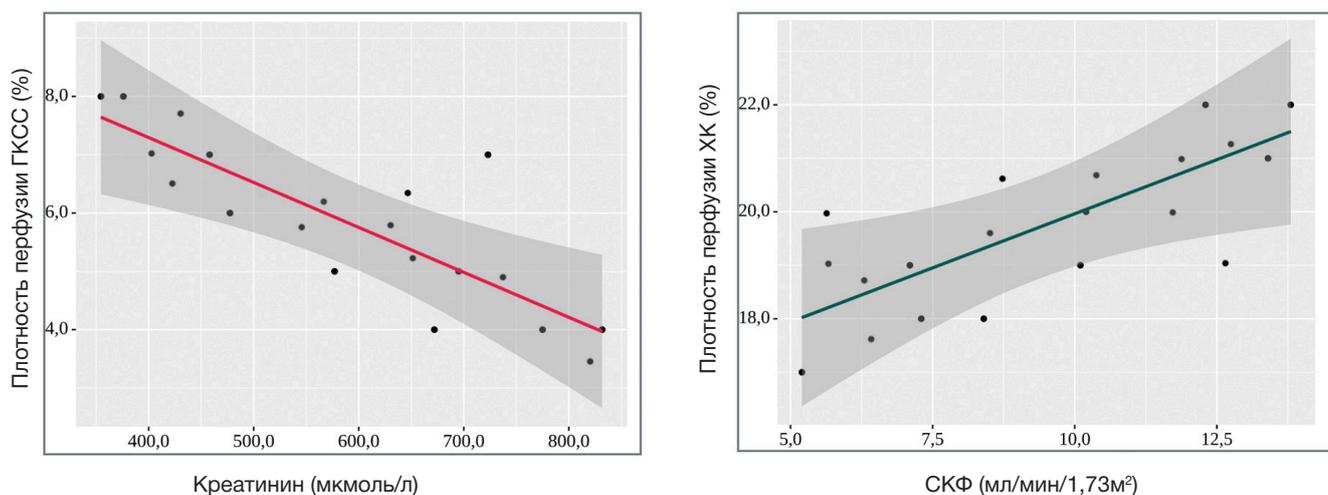


Рис. 4. График регрессионной функции, характеризующий зависимость плотности перфузии в ГКСС и плотности перфузии ХК от креатинина и СКФ. ГКСС — глубокое капиллярное сплетение сетчатки; ХК — хориокапилляры; СКФ — скорость клубочков фильтрации

напрямую связаны с улучшением зрительных функций (МКОЗ, светочувствительность сетчатки) у пациентов в посттрансплантационном периоде.

ВЫВОДЫ

Современный диагностический комплекс с применением неинвазивной ОКТА и фундус-микрпериметрии

позволяет с высокой точностью оценить состояние макулярной области у пациентов до и после СТПиПЖ. Проведенное исследование демонстрирует улучшение гемоперфузии и морфофункционального состояния макулы у пациентов с сохраненным макулярным кровотоком и остротой зрения в посттрансплантационном периоде, по сравнению с пациентами, ожидающими пересадку органов.

Литература

- Diaz-Valencia PA, Bougnères P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2015; 15: 255. DOI: 10.1186/s12889-015-1591-y.
- Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К., Железнякова А. В., Исаков М. А. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021. *Сахарный диабет*. 2021; 24 (3): 204–21.
- Cichocka E, Wietchy A, Nabrdalik K, Gumprecht J. Insulin therapy — new directions of research. *Endokrynol Pol*. 2016; 67 (3): 314–24. DOI: 10.5603/EP.2016.0044.
- Foster NC, Beck RW, Miller KM, Clements MA, Rickels MR, DiMeglio LA, et al. State of Type 1 Diabetes Management and Outcomes from the T1D Exchange in 2016–2018. *Diabetes Technol Ther*. 2019; 21 (2): 66–72. DOI: 10.1089/dia.2018.0384.
- Wong E, Backholer K, Gearon E, Harding J, Freak-Poli R, Stevenson C, et al. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013; 1 (2): 106–14. DOI: 10.1016/S2213-8587(13)70046-9.
- Baek JH, Lee WJ, Lee BW, Kim SK, Kim G, Jin SM, et al. Age at Diagnosis and the Risk of Diabetic Nephropathy in Young Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*. 2021; 45 (1): 46–54. DOI: 10.4093/dmj.2019.0134.
- Schiller B. Leading a Dialysis Organization: Role and Responsibilities of the Chief Medical Officer (Nephrologist Leadership in a Dialysis Provider Organization). *Adv Chronic Kidney Dis*. 2018; 25 (6): 485–9. DOI: 10.1053/j.ackd.2018.08.015.
- Kaku K, Kitada H, Noguchi H, Kurihara K, Kawanami S, Nakamura U, et al. Living donor kidney transplantation preceding pancreas transplantation reduces mortality in type 1 diabetics with end-stage renal disease. *Transplant Proc*. 2015; 47 (3): 733–7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2014.12.048.
- Barlow AD, Saeb-Parsy K, Watson CJE. An analysis of the survival outcomes of simultaneous pancreas and kidney transplantation compared to live donor kidney transplantation in patients with type 1 diabetes: a UK Transplant Registry study. *Transpl Int*. 2017; 30 (9): 884–92. DOI: 10.1111/tri.12957.
- Zech JC, Trepsat D, Gain-Gueugnon M, Lefrancois N, Martin X, Dubernard JM. Ophthalmological follow-up of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients after kidney and pancreas transplantation. *Diabetologia*. 1991; 34 (1): 89–91. DOI: 10.1007/BF00587628.
- Chow VC, Pai RP, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Mitchell P, et al. Diabetic retinopathy after combined kidney-pancreas transplantation. *Clinical Transplantation*. 1999; 13 (4): 356–62. DOI: 10.1034/j.1399-0012.1999.130413.x.
- Pearce IA, Ilango B, Sells RA, Wong D. Stabilisation of diabetic retinopathy following simultaneous pancreas and kidney transplant. *British Journal of Ophthalmology*. 2000; 84 (7): 736–40. DOI: 10.1136/bjo.84.7.736.
- Глазунова А. М., Арутюнова М. С., Тарасов Е. В., Шамхалова М. Ш., Шестакова М. В., Мойсюк Я. Г. и др. Влияние сочетанной трансплантации почки и поджелудочной железы на динамику поздних осложнений у больных сахарным диабетом 1 типа. *Сахарный диабет*. 2015; 18 (2): 69–78.
- Koznarová R, Saudek F, Sosna T, Adamec M, Jedináková T, Boucek P et al. Beneficial effect of pancreas and kidney transplantation on advanced diabetic retinopathy. *Cell Transplantation*. 2000; 9 (6): 903–8. DOI: 10.1177/096368970000900617.
- Giannarelli R, Coppelli A, Sartini M, Aragona M, Boggi U, Vistoli F et al. Effects of pancreas-kidney transplantation on diabetic retinopathy. *Transplant International*. 2005; 18 (5): 619–22. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2005.00108.x.
- Shipman KE, Patel CK. The effect of combined renal and pancreatic transplantation on diabetic retinopathy. *Clinical Ophthalmology*. 2009; 3: 531–5. DOI: 10.2147/oph.s7141.
- Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi A, Omae T, Tani T, Sogawa K, et al. Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy: A Prospective Pilot Study. *Am J Ophthalmol*. 2015; 160 (1): 35–44. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.04.021.
- Agemy SA, Scripsema NK, Shah CM, Chui T, Garcia PM, Lee JG, et al. Retinal vascular perfusion density mapping using optical coherence tomography angiography in normals and diabetic retinopathy patients. *Retina*. 2015; 35 (11): 2353–63. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000862.
- Nesper PL, Roberts PK, Onishi AC, Chai H, Liu L, Jampol LM, et al. Quantifying Microvascular Abnormalities with Increasing Severity of Diabetic Retinopathy Using Optical Coherence Tomography Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58 (6): 307–15. DOI: 10.1167/iov.17-21787.
- Vujosevic S, Bottega E, Casciano M, Pilotto E, Convento E, Midea E. Microperimetry and fundus autofluorescence in diabetic macular edema: subthreshold micropulse diode laser versus modified early treatment diabetic retinopathy study laser photocoagulation. *Retina*. 2010; 30 (6): 908–16. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181c96986.
- Boned-Murillo A, Diaz-Barreda MD, Ferreras A, Bartolomé-Sesé I, Orduña-Hospital E, Montes-Rodríguez P, et al. Structural and functional findings in patients with moderate diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2021; 259 (12): 3625–35. DOI: 10.1007/s00417-021-05277-y.

References

- Diaz-Valencia PA, Bougnères P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2015; 15: 255. DOI: 10.1186/s12889-015-1591-y.
- Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA. Jepidemiologicheskie harakteristiki saharnogo diabeta v Rossijskoj Federacii: kliniko-statisticheskij analiz po dannym registra saharnogo diabeta na 01.01.2021. *Saharnyj diabet*. 2021; 24 (3): 204–21. Russian.
- Cichocka E, Wietchy A, Nabrdalik K, Gumprecht J. Insulin therapy — new directions of research. *Endokrynol Pol*. 2016; 67 (3): 314–24. DOI: 10.5603/EP.2016.0044.
- Foster NC, Beck RW, Miller KM, Clements MA, Rickels MR, DiMeglio LA, et al. State of Type 1 Diabetes Management and Outcomes from the T1D Exchange in 2016–2018. *Diabetes Technol Ther*. 2019; 21 (2): 66–72. DOI: 10.1089/dia.2018.0384.
- Wong E, Backholer K, Gearon E, Harding J, Freak-Poli R,

- Stevenson C, et al. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013; 1 (2): 106–14. DOI: 10.1016/S2213-8587(13)70046-9.
6. Baek JH, Lee WJ, Lee BW, Kim SK, Kim G, Jin SM, et al. Age at Diagnosis and the Risk of Diabetic Nephropathy in Young Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J.* 2021; 45 (1): 46–54. DOI: 10.4093/dmj.2019.0134.
 7. Schiller B. Leading a Dialysis Organization: Role and Responsibilities of the Chief Medical Officer (Nephrologist Leadership in a Dialysis Provider Organization). *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018; 25 (6): 485–9. DOI: 10.1053/j.ackd.2018.08.015.
 8. Kaku K, Kitada H, Noguchi H, Kurihara K, Kawanami S, Nakamura U, et al. Living donor kidney transplantation preceding pancreas transplantation reduces mortality in type 1 diabetics with end-stage renal disease. *Transplant Proc.* 2015; 47 (3): 733–7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2014.12.048.
 9. Barlow AD, Saeb-Parsy K, Watson CJE. An analysis of the survival outcomes of simultaneous pancreas and kidney transplantation compared to live donor kidney transplantation in patients with type 1 diabetes: a UK Transplant Registry study. *Transpl Int.* 2017; 30 (9): 884–92. DOI: 10.1111/tri.12957.
 10. Zech JC, Trepsat D, Gain-Gueugnon M, Lefrancois N, Martin X, Dubernard JM. Ophthalmological follow-up of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients after kidney and pancreas transplantation. *Diabetologia.* 1991; 34 (1): 89–91. DOI: 10.1007/BF00587628.
 11. Chow VC, Pai RP, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Mitchell P, et al. Diabetic retinopathy after combined kidney-pancreas transplantation. *Clinical Transplantation.* 1999; 13 (4): 356–62. DOI: 10.1034/j.1399-0012.1999.130413.x.
 12. Pearce IA, Ilango B, Sells RA, Wong D. Stabilisation of diabetic retinopathy following simultaneous pancreas and kidney transplant. *British Journal of Ophthalmology.* 2000; 84 (7): 736–40. DOI: 10.1136/bjo.84.7.736.
 13. Glazunova AM, Arutyunova MS, Tarasov EV, Shamhalova MSh, Shestakova MV, Mojsyuk YaG, i dr. Vliyanie sochetannoj transplantacii pochki i podzheludochnoj zhelezy na dinamiku pozdnih oslozhnenij u bol'nyh saharnym diabetom 1 tipa. *Saharnyj diabet.* 2015; 18 (2): 69–78. Russian.
 14. Koznarová R, Saudek F, Sosna T, Adamec M, Jedináková T, Bouček P et al. Beneficial effect of pancreas and kidney transplantation on advanced diabetic retinopathy. *Cell Transplantation.* 2000; 9 (6): 903–8. DOI: 10.1177/096368970000900617.
 15. Giannarelli R, Coppelli A, Sartini M, Aragona M, Boggi U, Vistoli F et al. Effects of pancreas-kidney transplantation on diabetic retinopathy. *Transplant International.* 2005; 18 (5): 619–22. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2005.00108.x.
 16. Shipman KE, Patel CK. The effect of combined renal and pancreatic transplantation on diabetic retinopathy. *Clinical Ophthalmology.* 2009; 3: 531–5. DOI: 10.2147/oph.s7141.
 17. Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi A, Omae T, Tani T, Sogawa K, et al. Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy: A Prospective Pilot Study. *Am J Ophthalmol.* 2015; 160 (1): 35–44. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.04.021.
 18. Agemy SA, Scipsema NK, Shah CM, Chui T, Garcia PM, Lee JG, et al. Retinal vascular perfusion density mapping using optical coherence tomography angiography in normals and diabetic retinopathy patients. *Retina.* 2015; 35 (11): 2353–63. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000862.
 19. Nesper PL, Roberts PK, Onishi AC, Chai H, Liu L, Jampol LM, et al. Quantifying Microvascular Abnormalities with Increasing Severity of Diabetic Retinopathy Using Optical Coherence Tomography Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58 (6): 307–15. DOI: 10.1167/iov.17-21787.
 20. Vujosevic S, Bottega E, Casciano M, Pilotto E, Convento E, Midea E. Microperimetry and fundus autofluorescence in diabetic macular edema: subthreshold micropulse diode laser versus modified early treatment diabetic retinopathy study laser photocoagulation. *Retina.* 2010; 30 (6): 908–16. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181c96986.
 21. Boned-Murillo A, Diaz-Barreda MD, Ferreras A, Bartolomé-Sesé I, Orduna-Hospital E, Montes-Rodríguez P, et al. Structural and functional findings in patients with moderate diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021; 259 (12): 3625–35. DOI: 10.1007/s00417-021-05277-y.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА МИГРАЦИИ НА СТАНОВЛЕНИЕ МЕНСТРУАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У ДЕВОЧЕК

О. Ю. Милушкина¹, В. И. Попов², Н. А. Скоблина¹, Н. А. Бокарева¹, Е. В. Асташкевич¹, А. А. Захарова¹, Е. В. Скоблина³ ✉¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия² Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия³ Институт демографических исследований Федерального научно-исследовательского социологического центра Российской академии наук, Москва, Россия

Проблемы миграции приобретают масштабное значение во всем мире оказывают влияние прежде всего на здоровье женщин и детей. Целью исследования было установить влияние фактора миграции на становление менструальной функции у девочек. С помощью анкетирования в период с 2015 по 2020 г. изучали становление менструальной функции и возраст менархе у 1222 студенток 1995–2000 года рождения различной этнической принадлежности, обучающихся на 1–2 курсах университетов г. Москвы. В основную группу вошли 322 студентки-мигрантки, в группу сравнения — 900 москвичек. Средний возраст менархе у мигранток составил $151,35 \pm 1,20$ месяца, у москвичек — $150,88 \pm 1,06$ месяца ($p > 0,05$). У участниц обеих групп возраст наступления менархе составил 11–15 лет, что соответствует норме. В группе мигранток средний возраст менархе не отличался от возраста наступления менархе у москвичек и сопоставим с данными, полученными в разных частях света.

Ключевые слова: менструальная функция, москвички, мигрантки, охрана репродуктивного здоровья**Вклад авторов:** все авторы внесли эквивалентный вклад в исследование и подготовку публикации.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 159 от 21 ноября 2016 г.), все участницы подписали добровольное информированное согласие.✉ **Для корреспонденции:** Наталья Александровна Скоблина
ул. Островитянова, д. 1, 117997, г. Москва, Россия; skoblina_dom@mail.ru**Статья получена:** 24.03.2022 **Статья принята к печати:** 14.04.2022 **Опубликована онлайн:** 24.04.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.017

THE INFLUENCE OF MIGRATION FACTOR ON THE ESTABLISHMENT OF MENSTRUAL FUNCTION IN GIRLS

Milushkina OYu¹, Popov VI², Skoblina NA¹, Bokareva NA¹, Astashkevich EV¹, Zakharova AA¹, Skoblina EV³ ✉¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia³ Institute for Demographic Research of the Federal Research Sociological Center RAS, Moscow, Russia

The problems of migration are becoming increasingly important and have primary impact on women's and children's health. The aim of the study was to evaluate the influence of migration factor on the establishment of menstrual function in girls. The study enrolled 1,222 female undergraduate students of Moscow universities, born in 1995–2000, of diverse ethnicity. The data were collected in 2015–2020 by questionnaire method. The main group included 322 students classified as migrants and the comparison group included 900 students of local origin (Muscovites). Statistical processing of the data was carried out using Statistica 10.0 package (StatSoft; USA). Mean age at menarche constituted 151.35 ± 1.20 months in migrants and 150.88 ± 1.06 months in Muscovites ($p > 0.05$). For all participants, menarcheal age fell within the range of 11–15 years (normal). Other parameters of menstrual function were also similar between the groups and comparable to corresponding data collected in other countries.

Keywords: menstrual function, Muscovites, migrants, reproductive healthcare**Author contribution:** all authors made equal contributions to the study and manuscript preparation.**Compliance with ethical standards:** The study was approved by Local Ethical Board at Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 159 of November 21, 2016). All participants provided informed consent for the study.✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia A. Skoblina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; skoblina_dom@mail.ru**Received:** 24.03.2022 **Accepted:** 14.04.2022 **Published online:** 24.04.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.017

В Российской Федерации (РФ) с 2019 г. реализуется национальный проект «Демография», одной из задач которого является охрана репродуктивного здоровья женщин.

Согласно ВОЗ, репродуктивное здоровье включает в себя способность к зачатию и рождению детей, отсутствие заболеваний, передающихся половым путем, при доступе к средствам планирования семьи, обеспечения охраны и безопасности периода беременности и родов, поддержания здоровья матери и ребенка. Репродуктивное здоровье определяется социально-экономическими, экологическими, гигиеническими, культурными факторами и факторами образа жизни [1].

Процессы миграции связаны с экономической ситуацией. На сегодняшний день сформулирована новая экономическая теория миграции. В РФ произошли

изменения в миграционной политике, связанные с увеличением внешних и внутренних миграционных потоков, что фиксируют данные Федеральной службы государственной статистики [2].

Проблемы миграции приобретают масштабное значение во всем мире и оказывают влияние прежде всего на здоровье женщин и детей, что остро ставит вопрос охраны репродуктивного здоровья девушек-подростков [3–5].

В качестве чувствительного показателя, отражающего воздействие на девочек неблагоприятных экономических, социальных и других факторов, рассматривают возраст менархе у девочек [6]. Так, смена девочкой места жительства способна оказать влияние на показатели физического развития, сроки биологического развития и формирование менструальной функции [7].

На примере миграции женщин на территорию московского региона показано, что «миграция» и «адаптация» сопряжены по многим аспектам: факт смены места проживания требует процесса адаптации к новым условиям, интеграции в новую среду [8].

Для московского региона проблема охраны репродуктивного здоровья девушек-мигранток стоит особенно остро: по официальной статистике, каждый седьмой ребенок рождается у женщин, не являющихся постоянными жительницами Москвы, т. е. у внутрироссийских или международных мигранток [9].

Цель исследования — установить влияние фактора миграции на становление менструальной функции у девочек.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

С помощью анкетирования в период с 2015 по 2020 г. определяли становление менструальной функции и возраст менархе у 1222 студенток 1995–2000 годов рождения различной этнической принадлежности, обучающихся на 1–2 курсах университетов г. Москвы. Средний возраст опрошенных студенток составил $19,4 \pm 0,3$ лет. В основную группу вошли 322 студентки, отнесенные к категории мигранток (внутренних и внешних мигрантов), что, согласно методике К. А. Отдельновой, обеспечивает 95,0% вероятности достоверности результата исследования [10]. Этническая принадлежность мигранток: выходцы с Северного Кавказа и Средней Азии (внешние мигранты), а также граждане РФ — чеченцы, ингуши, дагестанцы, осетины, адыги и некоторые другие (внутренние мигранты). Согласно рекомендациям практического руководства для стран Восточной Европы и Центральной Азии ООН, их можно охарактеризовать как «долгосрочные мигранты», поскольку эти лица переехали на годовой срок и более [11]. В группу сравнения вошли 900 студенток-москвичек. Критерии включения: становление менструальной функции в момент проживания в г. Москве; принадлежность к возрастно-половой группе; обучение в университетах г. Москвы; группа здоровья I-II; отсутствие особенностей образа жизни, связанных с питанием, двигательной активностью и др.; корректность заполнения анкеты. Критерии исключения: отсутствие

добровольного информированного согласия; становление менструальной функции до момента миграции; другие возрастно-половые группы; проживание в других регионах; обучение в других учебных заведениях; группа здоровья III; наличие особенностей образа жизни и в том числе наличие зависимостей; отсутствие корректно заполненной анкеты. По результатам была оформлена «База данных исследования менструальной функции у девушек подростков (1995–2000 г. р.), получено свидетельство о регистрации базы данных 2020622018 от 23.10.2020.

Для обработки полученных данных использовали пакет статистических программ Statistica 10.0 (StatSoft; США). При обработке результатов предварительно оценивали соответствие полученных значений закону нормального распределения вариационных рядов. Описательную статистику проводили с использованием среднего арифметического (M) и среднего квадратического отклонения (σ). Для оценки достоверности различий средних величин использовали t -критерий Стьюдента (различия считали значимыми при $p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст наступления менархе ($M \pm m$) у мигранток составил $151,35 \pm 1,20$ месяца (12 лет 6 месяцев), у москвичек — $150,88 \pm 1,06$ месяцев (12 лет 6 месяцев) ($p > 0,05$). У мигранток менархе должна наступить в диапазоне 11 лет 5 месяцев — 13 лет 7 месяцев, у москвичек 11 лет 5 месяцев — 13 лет 6 месяцев соответственно.

Важно не только среднее значение возраста наступления менархе, но и распределение девочек на группы в зависимости от возраста наступления менархе (рис. 1).

Среди мигранток менархе началась в 11 лет в 5,3% случаев, среди москвичек — в 9,2% случаев соответственно. Но имеются достоверные различия ($p \leq 0,05$): у москвичек становление менструальной функции напоминает кривую нормального распределения и происходит плавно, в 35,8% случаев менархе начинается в 13 лет. У мигранток в 13 лет наблюдается пик (49,9% случаев менархе), а далее сохраняется группа с более поздним началом менархе (20,9%). В целом, менархе в возрасте 12–14 лет наступила и у 73,8% мигранток, и у 73,8% москвичек.

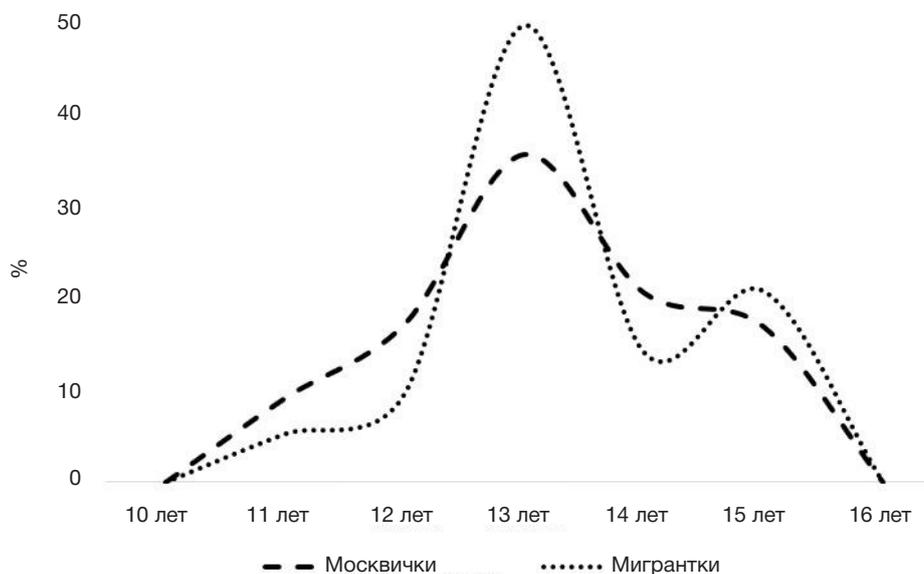


Рис. 1. Распределение девочек в зависимости от возраста наступления менархе

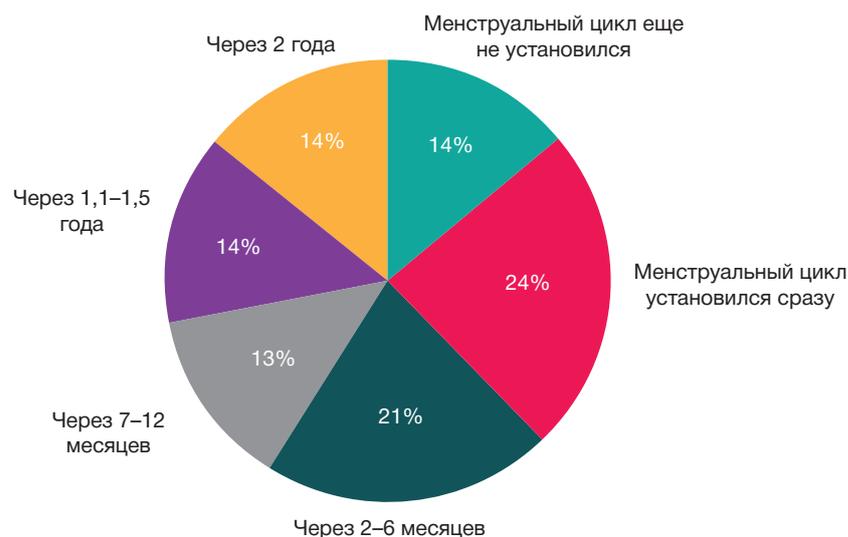


Рис. 2. Распределение девочек в зависимости от сроков становления менструального цикла

На рис. 2 и 3 представлены особенности становления менструального цикла.

Распределение мигранток и москвичек в зависимости от сроков становления менструального цикла и длительности менструального цикла было схожим. Продолжительность цикла менее 21 дня («пройоменорея»), зафиксирована у 2,0%; продолжительность цикла более 35 дней («опсоменорея») — у 7,0%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования оказались сопоставимы и в группе мигранток, и в группе москвичек с данными, полученными в разных частях света.

В результате исследования, охватившего 11 274 женщин, выполненного в Португалии, показано, что в XX в. возраст менархе снижался в среднем на 31,1 дня за каждые 5 лет и составил по последним данным $12,0 \pm 1,25$ лет [12].

Тенденция более раннего периода полового созревания зафиксирована у девочек на Тайване. Средний возраст наступления менархе составлял $11,35 \pm 1,06$ [13].

В Польше в 1985–1986, 2005–2006 и 2015–2016 гг. у 11 671 девочки в возрасте 10–16 лет сравнивали возраст наступления менархе у девочек в группах с разным уровнем образования родителей и числом детей в семье, а также с общим показателем социально-экономического

статуса. Во всех обследованных группах девочек выявили ускорение полового созревания [14].

Средний возраст наступления менархе у 24 380 женщин, родившихся в Мексике, снизился с 13,3 лет среди родившихся до 1940-х гг., до 12,56 лет среди родившихся в 1980-х гг. и позднее. Во всех возрастных когортах у городских женщин он был значительно меньше, чем у их сельских сверстниц. Городские женщины, не принадлежащие к коренным народам, раньше всех достигли менархе, а сельские женщины из числа коренного населения были самыми поздними из всех групп [15].

Полученные данные можно также сопоставить с данными других авторов, полученными для мигранток.

В исследовании, охватившем 814 девочек, удочеренных на международном уровне, сравнивали возраст наступления менархе в когорте из девочек, удочеренных из Китая в Северную Америку, с возрастом наступления менархе девочек в Китае. Средний возраст наступления менархе у приемных китайских девочек составил 12,37 года (95%, ДИ: 11,84–13,00 лет). Расчетная распространенность возраста наступления менархе, равная $\leq 10,0$ лет, для приемных девочек составляет 3%. Таким образом, для девочек, удочеренных из Китая в Европу, возраст наступления менархе и процент девочек с возрастом наступления менархе менее 10 лет были аналогичными в Китае [16].

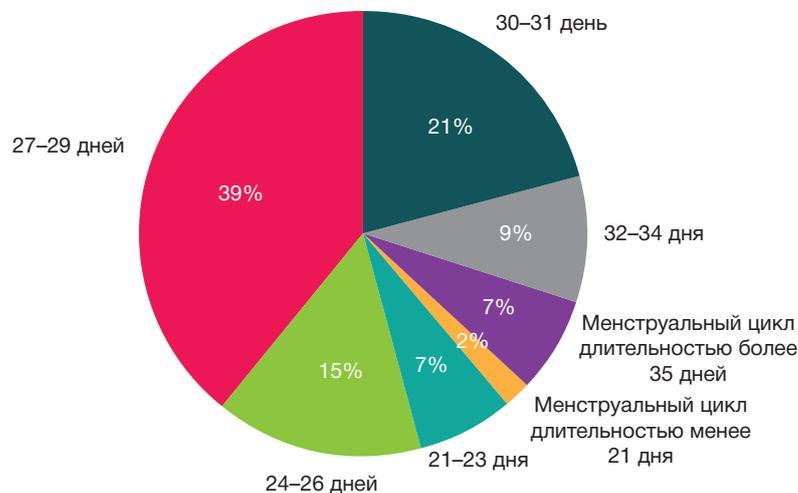


Рис. 3. Распределение девочек по длительности менструального цикла

Авторы из Дании показали, что риск развития преждевременного полового созревания был значительно повышен в 10–20 раз у приемных девочек по сравнению с девочками из Дании. Риск развития преждевременного полового созревания зависел от страны происхождения. У детей, иммигрировавших со своей семьей, риск развития преждевременного полового созревания был лишь незначительно увеличен. Пожилой возраст усыновителей значительно увеличивает риск преждевременного полового созревания у усыновленных независимо от региона происхождения. Авторы считают, что стрессовые психосоциальные факторы в младенчестве и детстве могут привести к более раннему половому созреванию. Как правило, усыновленные пережили несколько травмирующих жизненных событий, и можно предположить, что эти события изменяют предрасположенность к развитию преждевременного полового созревания [17].

Результаты нашего исследования не выявили в группе мигранток девочек с преждевременным половым созреванием, в то же время была выявлена группа девочек (20,9%) с началом менархе в 15 лет.

Миграция, сопровождающаяся сменой климатогеографических условий проживания, вызывает изменения менструального цикла у 3% девочек, выраженные в нарушении продолжительности цикла [18].

В целом исследователи выделяют следующие факторы нарушения репродуктивного здоровья девочек: низкое качество уровня медицинского обеспечения, неблагоприятные социально-экономические условия, низкий уровень достатка семьи, слабый уровень развития системы здравоохранения на государственном уровне и также фактор миграции [19–21].

Зарубежные исследователи констатируют, что миграция оказывает значительное влияние на общее состояние здоровья женщин и исход беременности [22–24]. Так, анализ состояния здоровья беременных мигранток показал большее число осложнений течения беременности и родов, увеличение в 1,3 раза патологии у новорожденных [3].

Выводы

У мигранток и москвичек, участвовавших в исследовании, возраст наступления менархе составил 11–15 лет, что соответствует норме. В группе мигранток средний возраст наступления менархе не отличался от такового у москвичек и сопоставим с данными, полученными в разных частях света. Исследования могут быть продолжены для категории «долгосрочных мигрантов» из стран дальнего зарубежья.

Литература

- World Health Organization. Sexual and reproductive health. Доступно по ссылке (дата обращения 14.02.2022): <https://www.who.int/reproductivehealth/en/>.
- Ионцев В. А., Рязанцев С. В., Ионцева С. В. Новые тенденции и формы эмиграции из России. Экономика региона. 2016; 12 (2): 499–509.
- Артюхов И. П., Ли-Ги-Пу С. Ю., Горбач Н. А., и др. Здоровье беременных мигранток: анализ и возможности управления. Здравоохранение Российской Федерации. 2016; 60 (1): 27–30.
- Fontanelli Sulekova L, Spaziante M, Vita S, et al. The pregnancy outcomes among newly arrived asylum-seekers in Italy: Implications of public health. J Immigr Minor Health. 2021; 23 (2): 232–9.
- Alarcão V, Stefanovska-Petkovska M, Virgolino A, et al. Fertility, migration and acculturation (FEMINA): A research protocol for studying intersectional sexual and reproductive health inequalities. Reprod Health. 2019; 16 (1): 140.
- Сергейко И. В., Люцко В. В. Оценка влияния социально-экономической ситуации на состоянии репродуктивного здоровья населения. Современные проблемы науки и образования. 2014; 1: 164.
- Бокарева Н. А., Милушкина О. Ю., и др. Влияние миграции на физическое развитие детей. Здоровье населения и среда обитания. 2017; 8 (293): 40–43.
- Измеров Н. Ф., Измерова Н. И., Бухтияров И. В., и др. Особенности адаптационных реакций у женщин-мигранток и риски нарушения здоровья при различной длительности пребывания на территории московского региона. Анализ риска здоровью. 2017; 2: 119–127.
- Рязанцев С. В., Каримов М. М. Влияние трудовой миграции на репродуктивное здоровье (на примере таджикских мигрантов в России). Вестник Таджикского государственного университета права, бизнеса и политики. 2013; 2 (54): 40–51.
- Отдельнова К. А. Определение необходимого числа наблюдений в социально-гигиенических исследованиях. Сб. трудов 2-го ММИ. 1980; 150 (6): 18–22.
- Статистика международной миграции. Практическое руководство для стран Восточной Европы и Центральной Азии. Женева: Организация объединенных наций, 2011. Доступно по ссылке (дата обращения 13.04.2022): https://unece.org/fileadmin/DAM/stats/publications/RUS_International_Migration_Statistics_Practical_Guide.pdf.
- Queiroga AC, Silva RS, Santos AC, et al. Secular trend in age at menarche in women in Portugal born between 1920 and 1992: Results from three population-based studies. Am J Human Biol. 2020; 32 (5).
- Chow JC, Chou TY, Tung T, et al. Recent pubertal timing trends in northern taiwanese children: Comparison with skeletal maturity. J Chin Med Assoc. 2020; 83 (9): 870–5.
- Saczuk J, Wasiluk A, Pytasz P. Secular trend and social gradients in the menarcheal age of girls from eastern Poland between 1986 and 2016. Anthropol Rev. 2020; 83 (3): 279–91.
- Marván ML, Castillo-López RL, del-Callejo-Canal DD, et al. Secular trends in age at menarche in 20th century Mexico: Differences by ethnicity, area of residency, and socioeconomic status. Am J Human Biol. 2020; 32 (6).
- Hayes P, Tan TX. Timing of menarche in girls adopted from China: a cohort study. Child Care Health Dev. 2016; 42 (6): 859–62. DOI: 10.1111/cch.12393.
- Teilmann G, Pedersen CB, Skakkebaek NE, et al. Increased risk of precocious puberty in internationally adopted children in Denmark. Pediatrics. 2006 Aug; 118 (2): e391–9. DOI: 10.1542/peds.2005-2939.
- Исакова Ж. К., Мусуралиев М. С. Влияние процесса миграции на менструальную функцию девушек из высокогорных регионов. Web of Scholar. 2018; 2 (4) (22): 26–29.
- Абрамова В. М., Чеботарева А. А., Кривошапова И. И., и др. Сравнительный анализ влияния репродуктивного здоровья женщины на последующее становление менструальной и репродуктивной функции у дочерей. Оригинальные исследования. 2014; 2: 46–50.
- Уварова Е. В., Тарусин Д. И., Кучма В. Р., и др. Профилактика нарушений репродуктивного здоровья детей и подростков. Вопросы школьной и университетской медицины и здоровья. 2018; 2: 45–62.
- Castellucci H, Viviani C, Boccardo G, et al. Gender inequality and sexual height dimorphism in Chile. J Biosoc Sci. 2021; 53 (1): 38–54.

22. Arcos E, Vollrath A, Sánchez X, et al. Motherhood in migrant women in Chile: A qualitative study. *Midwifery*. 2018; 66: 182–6.
23. Banougnin BH, Adekunle AO, Oladokun A, et al. Impact of internal migration on fertility in cotonou, Benin republic. *Etud Popul Afr*. 2018; 32 (2): 4305–18.
24. Rokicki S, Montana L, Fink G. Impact of migration on fertility and abortion: Evidence from the household and welfare study of accra. *Demography*. 2014; 51 (6): 2229–54.

References

- World Health Organization. Sexual and reproductive health. Dostupno po slylke (data obrashheniya 14.02.2022): <https://www.who.int/reproductivehealth/en/>.
- loncev VA, Ryazancev SV, lonceva SV. Novye tendencii i formy ehmigracii iz Rossi. *Ehkonomika regiona*. 2016; 12 (2): 499–509. Russian.
- Artyukhov IP, Li-Gi-Ru SYu, Gorbach NA, i dr. Zdorov'e beremennykh migrantok: analiz i vozmozhnosti upravleniya. *Zdravooxranenie Rossijskoj Federacii*. 2016; 60 (1): 27–30. Russian.
- Fontanelli Sulekova L, Spaziante M, Vita S, et al. The pregnancy outcomes among newly arrived asylum-seekers in Italy: Implications of public health. *J Immigr Minor Health*. 2021; 23 (2): 232–9.
- Alarcão V, Stefanovska-Petkovska M, Virgolino A, et al. Fertility, migration and acculturation (FEMINA): A research protocol for studying intersectional sexual and reproductive health inequalities. *Reprod Health*. 2019; 16 (1): 140.
- Sergeyko IV, Lyutsko VV. Ocenka vliyaniya social'no-ehkonomicheskoy situacii na sostoyanie reproduktivnogo zdorov'ya naseleniya. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 1: 164. Russian.
- Bokareva NA, Milushkina OYu, i dr. Vliyanie migracii na fizicheskoe razvitiye detej. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2017; 8 (293): 40–43. Russian.
- Izmerov NF, Izmerova NI, Bukhtiyarov IV, i dr. Osobennosti adaptacionnykh reakcij u zhenshin-migrantok i riski narusheniya zdorov'ya pri razlichnoj dlitel'nosti prebyvaniya na territorii moskovskogo regiona. *Analiz riska zdorov'yu*. 2017; 2: 119–127. Russian.
- Ryazancev SV, Karimov MM. Vliyanie trudovoj migracii na reproduktivnoe zdorov'e (na primere tadzhikskix migrantov v Rossii). *Vestnik Tadzhikskogo gosudarstvennogo universiteta prava, biznesa i politiki*. 2013; 2 (54): 40–51. Russian.
- Otdelnova K. A. Opredelenie neobxodimogo chisla nablyudenij v social'no-gigienicheskix issledovaniyax. *Sb. trudov 2-go MMI*. 1980; 150 (6): 18–22. Russian.
- Statistika mezhdunarodnoj migracii. *Prakticheskoe rukovodstvo dlya stran Vostochnoj Evropy i Central'noj Azii*. Zheneva: Organizaciya ob"edinennykh nacij, 2011. Dostupno po slylke (data obrashheniya 13.04.2022): https://unece.org/fileadmin/DAM/stats/publications/RUS_International_Migration_Statistics_Practical_Guide.pdf. Russian.
- Queiroga AC, Silva RS, Santos AC, et al. Secular trend in age at menarche in women in portugal born between 1920 and 1992: Results from three population-based studies. *Am J Human Biol*. 2020; 32 (5).
- Chow JC, Chou TY, Tung T, et al. Recent pubertal timing trends in northern taiwanese children: Comparison with skeletal maturity. *J Chin Med Assoc*. 2020; 83 (9): 870–5.
- Saczuk J, Wasiluk A, Pytasz P. Secular trend and social gradients in the menarcheal age of girls from eastern Poland between 1986 and 2016. *Anthropol Rev*. 2020; 83 (3): 279–91.
- Marván ML, Castillo-López RL, del-Callejo-Canal DD, et al. Secular trends in age at menarche in 20th century Mexico: Differences by ethnicity, area of residency, and socioeconomic status. *Am J Human Biol*. 2020; 32 (6).
- Hayes P, Tan TX. Timing of menarche in girls adopted from China: a cohort study. *Child Care Health Dev*. 2016; 42 (6): 859–62. DOI: 10.1111/cch.12393.
- Teilmann G, Pedersen CB, Skakkebaek NE, et al. Increased risk of precocious puberty in internationally adopted children in Denmark. *Pediatrics*. 2006 Aug; 118 (2): e391–9. DOI: 10.1542/peds.2005-2939.
- Isakova ZhK, Musuraliev MS. Vliyanie processa migracii na menstrual'nuyu funkciyu devushek iz vysokogornyx regionov. *Web of Scholar*. 2018; 2 (4) (22): 26–29.
- Abramova VM, Chebotareva AA, Krivosheva II, i dr. Sravnitel'nyj analiz vliyaniya reproduktivnogo zdorov'ya zhenshiny na posleduyushhee stanovlenie menstrual'noj i reproduktivnoj funkcii u docherej. *Original'nye issledovaniya*. 2014; 2: 46–50. Russian.
- Uvarova EV, Tarusin DI, Kuchma VR, i dr. Profilaktika narushenij reproduktivnogo zdorov'ya detej i podrostkov. *Voprosy shkol'noj i universitetskoj mediciny i zdorov'ya*. 2018; 2: 45–62. Russian.
- Castellucci H, Viviani C, Boccardo G, et al. Gender inequality and sexual height dimorphism in Chile. *J Biosoc Sci*. 2021; 53 (1): 38–54.
- Arcos E, Vollrath A, Sánchez X, et al. Motherhood in migrant women in Chile: A qualitative study. *Midwifery*. 2018; 66: 182–6.
- Banougnin BH, Adekunle AO, Oladokun A, et al. Impact of internal migration on fertility in cotonou, Benin republic. *Etud Popul Afr*. 2018; 32 (2): 4305–18.
- Rokicki S, Montana L, Fink G. Impact of migration on fertility and abortion: Evidence from the household and welfare study of accra. *Demography*. 2014; 51 (6): 2229–54.

ЗАСТАРЕЛЫЙ ЗАДНИЙ ПЕРЕЛОМОВЫВИХ ПЛЕЧА

К. А. Егиазарян, Д. С. Ершов, Д. А. Бадриев ✉, Д. Ю. Сошников

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

Задние переломовывихи нередко являются недиагностированным повреждением при первичном обращении за медицинской помощью. Головка плечевой кости во время вывиха заходит за гленоид, на ней образуется зона импрессии, за счет которой она и «фиксируется». На рентгенограммах в стандартной прямой проекции практически невозможно заподозрить данное повреждение. В случае длительного нахождения плечевой кости в фиксированном заднем вывихе, импрессионное повреждение головки плечевой кости быстро прогрессирует, и может достигать 50% площади суставной поверхности. Ассоциированные с данной травмой повреждение суставной губы лопатки, разрыв мышц ротаторной манжеты, появление нестабильности плечевого сустава после устранения вывиха, выраженный болевой синдром требуют серьезного подхода к лечению данной патологии. В представленном клиническом случае у пациента кроме заднего вывиха был срastaющийся со смещением перелом анатомической шейки плечевой кости. Чтобы избежать субакромиального импинджмента вместо исправления положения головки мы отказались от репозиции и произвели остеотомию с перемещением большого бугорка плечевой кости дистально.

Ключевые слова: задний вывих плеча, переломовывих плеча, хирургия плечевого сустава

Вклад авторов: все авторы внесли равнозначный вклад в проведение исследования и подготовку статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 202 от 23 ноября 2020 г.), выполнено в соответствии с этическими стандартами Хельсинской декларации; пациент дал согласие на обработку и публикацию персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Айдарович Бадриев
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; ill1dan@mail.ru

Статья получена: 09.04.2022 **Статья принята к печати:** 15.04.2022 **Опубликована онлайн:** 29.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.022

CHRONIC NON-TREATED POSTERIOR FRACTURE-DISLOCATION OF THE SHOULDER

Egiazaryan KA, Ershov DS, Badriev DA ✉, Soshnikov DY

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Posterior fracture-dislocations often remain undiagnosed at initial medical attendance. In dislocation, the head of the humerus extends beyond the glenoid to form a zone of impaction, which “fixes” it. The injury is almost unidentifiable in standard frontal X-ray images. Meanwhile, continued fixation of the humerus in the state of posterior dislocation leads to a rapid progression of the traumatic impaction over up to 50% of the articular surface area. The associated damage to the articular lip of the scapula, rupture of the rotator cuff muscles, symptoms of shoulder instability after relocation, and severe pain syndrome require advanced treatments for this type of injury. Here we report a clinical case of anatomical neck fracture of the humerus with displaced consolidation, combined to posterior dislocation. To avoid subacromial impingement, instead of correcting the position of the head, we abandoned the reposition and performed an osteotomy with distal displacement of the greater tubercle of the humerus.

Keywords: posterior dislocation of the shoulder, fracture-dislocation of the shoulder, shoulder joint surgery

Author contribution: all authors made equal contributions to the study and preparation of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol No. 202 of November 23, 2020) and carried out in compliance with ethical standards established by the Declaration of Helsinki; the patient provided written informed consent for data processing and publication.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis A. Badriev
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; ill1dan@mail.ru

Received: 09.04.2022 **Accepted:** 15.04.2022 **Published online:** 29.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.022

Задние вывихи плеча достаточно редки и составляют 2–5% от всех случаев вывихов плеча. Задние вывихи, сочетающиеся с переломом проксимального метаэпифиза плечевой кости, встречаются значительно реже и составляют около 0,9% от всех случаев переломовывихов плеча или 0,6 случаев на 100 000 человек [1, 2].

В 60% случаев диагноз «задний вывих плеча» не ставят при первичном обращении к врачу. При нахождении головки плечевой кости в вывихе более 6 недель данное повреждение становится хроническим [3]. Средний интервал между травмой и постановкой окончательного диагноза составляет 8 месяцев [4].

Представленный клинический случай иллюстрирует сложности диагностики и лечения пациента с застарелым задним фиксированным переломовывихом плеча с обратным

повреждением Hill-Sachs более 25% и переломом анатомической шейки плечевой кости с варусным смещением.

Описание клинического случая

К нам в клинику обратился пациент С., 37 лет. За 2 месяца до госпитализации в стационар он получил травму упав с самоката. В первые сутки после получения травмы пациент обратился в районный травмпункт, где провели клинический осмотр и рентгенографию правого плечевого сустава только в прямой проекции (рис. 1). На рентгенограмме был выявлен перелом проксимального отдела плечевой кости с минимальным смещением отломков. Правую верхнюю конечность зафиксировали гипсовой повязкой и рекомендовали продолжать иммобилизацию в течение

3 недели. Пациента отпустили с рекомендацией явиться на следующие сутки к травматологу по месту жительства на вторичный прием. На следующий день после травмы пациент обратился за медицинской помощью по месту жительства в травматологический пункт, но в медицинском учреждении был неприемный день. Пациент вызвал бригаду скорой медицинской помощи, которая доставила его в одну из городских больниц, где повторно выполнили клинический осмотр, рентгенографию правого плечевого сустава в одной прямой проекции. Рентгенографию в боковой проекции, прочих проекциях или мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) не проводили, диагноз заднего переломовывиха плеча тоже не был установлен. Только через 3 недели с момента повреждения один из специалистов травматологического звена рекомендовал пациенту выполнить компьютерную томографию (КТ) плечевого сустава (рис. 2).

После получения результатов инструментального исследования пациент повторно обратился к специалисту, рекомендовавшему МСКТ плечевого сустава. Однако травматологический пункт не был оснащен компьютером, пациенту выдали направление на консультацию в стационар. Через несколько дней пациент смог доехать до больницы, где по данным МСКТ впервые установили задний переломовывих плеча и рекомендовали обратиться через несколько дней, когда к ним приедет специалист из другого учреждения, имеющий опыт лечения подобных ситуаций. Пациент решил самостоятельно проконсультироваться в Городской клинической больнице № 1 имени Н. И. Пирогова, где после клинического осмотра и ознакомления с данными рентгенологических исследований пациенту была предложена экстренная госпитализация для подготовки к оперативному лечению.

На момент обращения в нашу клинику у пациента были значительные ограничения амплитуды движений в правом плечевом суставе: отведение — 25°, наружная ротация — 10°, внутренняя ротация — 70°, сгибание — 65° (рис. 3).



Рис. 1. Рентгенограмма правого плечевого сустава пациента С. в день травмы

Острых нейроциркуляторных нарушений в правой верхней конечности не было.

По данным рентгенографии и МСКТ была проведена оценка переломовывиха: обратное повреждение Hill-Sachs составляло 25% от общей площади суставной поверхности головки плечевой кости; выявлены перелом анатомической шейки плечевой кости с варусным смещением, перелом большого бугорка с проксимальным смещением (бугорок значительно выстоял над суставной поверхностью); обнаружена активная консолидация всех перечисленных переломов, в то время как плечевая кость длительное время находилась в положении фиксированного заднего вывиха.

При подобных повреждениях одним из главных факторов, предрасполагающих к последующим рецидивам вывиха плеча, является площадь вдавленного перелома на суставной поверхности головки плечевой кости [5]. Дефекты размером более 25%, как правило, требуют оперативного лечения для восстановления «стабильности» плечевого сустава [2, 6].

В литературе представлены следующие методы лечения данной патологии: трансфер малого бугорка (операция

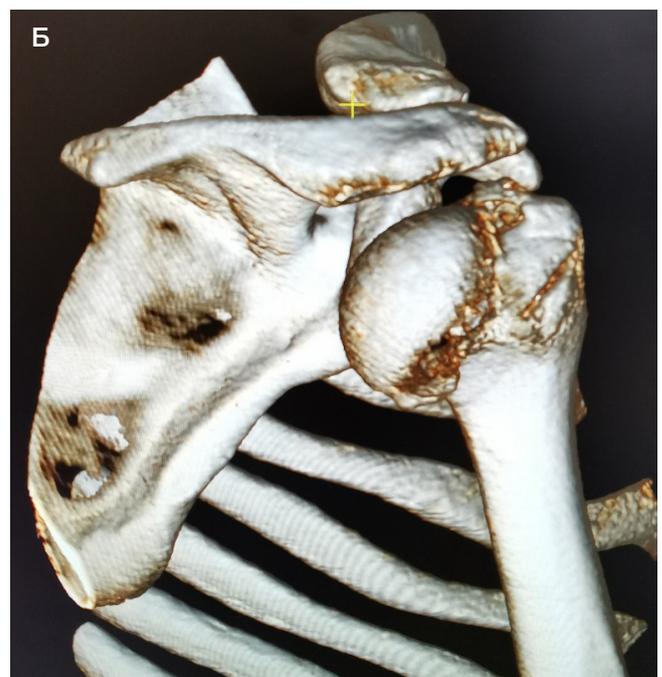
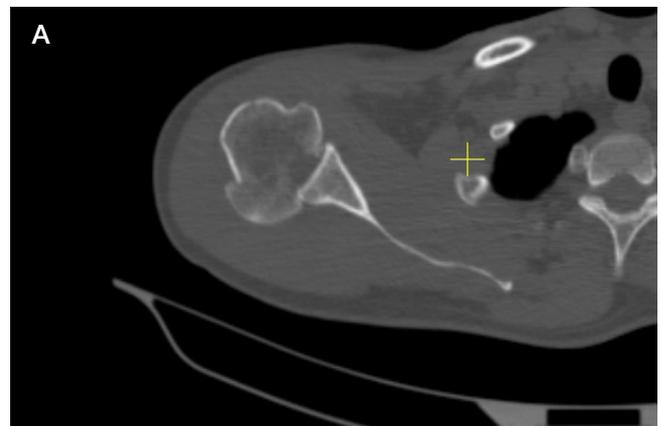


Рис. 2. Аксиальный срез КТ правого плечевого сустава пациента С. через 3 недели с момента травмы (А). Объемная реконструкция проксимального отдела правой плечевой кости пациента С. через 3 недели с момента травмы (Б)

McLaughlin), перенос сухожилия подлопаточной мышцы (Neer's modified method) в область дефекта суставной поверхности головки, субкапитальная ротационная остеотомия (Weber's procedure), эндопротезирование плечевого сустава [3]. За основу лечения данного пациента мы взяли алгоритм, предложенный Paparoidamis P. с соавторами, основанный на систематическом обзоре литературы [7].

У нашего пациента с переломовывихом плечевой кости импрессия суставной поверхности головки плеча достигала 25%, поэтому в соответствии с алгоритмом было принято решение об устранении вывиха и реконструкции проксимального отдела плечевой кости. После предоперационной подготовки под общей анестезией в положении пациента «на пляжном кресле» выполнен стандартный дельтопекторальный доступ к плечевому суставу. Первым этапом осцилярной пилой выполнили остеотомию малого бугорка. Вторым этапом провели отсечение сухожилия длинной головки бицепса от лопатки и его подшивание к большой грудной мышце, удалили рубцы из плечевого сустава, выполнили мягкотканый релиз мышц ротаторной манжеты, произвели открытое устранение вывиха. Третьим этапом с целью профилактики субакромиального импиджмента осуществили косую слайд-остеотомию большого бугорка и его низведение на 10 мм дистальнее. Решение о перемещении бугорка было принято из-за увеличения риска асептического некроза головки плечевой кости вследствие возможного повреждения задней огибающей артерии плеча при попытке устранения варусного смещения головки плечевой кости [8]. Четвертым этапом выполнили фиксацию фрагментов головки плечевой кости и низведенного большого бугорка преформированной пластиной для остеосинтеза проксимального отдела плеча. Пятым этапом провели модификацию операции McLaughlin: малый бугорок переместили и фиксировали винтом на место импрессионного дефекта суставной поверхности головки плеча. Раны послойно ушили. Наложили асептические повязки. Выполнили иммобилизацию правой верхней конечности отводящей шиной в положении наружной ротации.

Послеоперационный период протекал без особенностей. Швы сняли на 14 сутки. Иммобилизация верхней конечности в отводящей шине длилась 4 недели, далее еще 2 недели пациент носил стандартную косыночную повязку. С первого дня после операции пациенту проводили физиотерапевтическое лечение, занятия со специалистом лечебной физкультуры. Особенностью реабилитации была строгая иммобилизация правой верхней конечности в положении отведения до 60° в нейтральной ротации в течение первых 4 недель с момента операции. Через 4 недели в течение 2 недель проводили пассивную разработку движений в правом плечевом суставе на фоне иммобилизации правой верхней конечности в обычной косыночной повязке. Через 6 недель после операции была начата активная разработка движений.

По данным контрольной рентгенографии через 12 недель, 6 месяцев и год произошла консолидация перелома шейки правой плечевой кости, конгруэнтность суставных поверхностей плечевого сустава не нарушена, отсутствовали признаки асептического некроза головки плечевой кости (рис. 4).

Оценку функции плечевого сустава проводили по Constant Shoulder Score: на момент обращения показатели соответствовали 24/100, через год после наблюдения —



Рис. 3. Внешний вид пациента С. до операции



Рис. 4. Рентгенограмма правого плечевого сустава пациента С. через 12 месяцев после операции

88/100, что соответствует отличному результату лечения. По шкалам оценки DASH и ASES через 12 месяцев наблюдения показатели тоже интерпретированы как отличные [9] (рис. 5).

Обсуждение клинического случая

Переломовывих плеча возникает достаточно редко, большую часть случаев не диагностируют клинически

и рентгенологически даже при своевременном обращении пациента за медицинской помощью и выполнении всех рекомендаций. Не установленный своевременно диагноз приводит к неблагоприятным функциональным результатам. В случае длительного нахождения плечевой кости в фиксированном заднем вывихе импрессионное повреждение головки плечевой кости быстро прогрессирует и может достигать 50% площади суставной поверхности. Добоисследование пациента, предоперационное планирование важно проводить тщательно, обязательным является выполнение МСКТ плечевого сустава. Для получения хороших отдаленных функциональных результатов диагностику переломовывиха и его оперативное лечение необходимо проводить в наиболее ранние сроки с момента получения травмы [10, 11].

Наиболее часто с переломовывихом плеча ассоциированы импрессионное повреждение суставной поверхности головки плечевой кости (так называемый обратный перелом Hill-Sachs; 29%), перелом хирургической шейки (18,5%), малого бугорка (14,3%) и большого бугорка (7,8%) плечевой кости [12]. Переломы диафиза плечевой кости, лопатки и ключицы, сочетающиеся с вывихом плечевой кости, встречаются у 6% пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рутинная диагностика в виде рентгенографии плечевого сустава в прямой проекции не позволяет достоверно определить вывих головки плечевой кости. Из-за отсутствия второй проекции возникает предпосылка для неправильной оценки повреждения. Позднее обращение пациентов за медицинской помощью, а также консервативное лечение с неверно поставленным диагнозом значительно ухудшают отдаленный функциональный результат. Данный клинический случай показывает необходимость обязательного выполнения рентгенографии плечевого сустава как минимум в двух проекциях.

Выбор тактики оперативного лечения данной патологии требует тщательного планирования, учитывающего



Рис. 5. Внешний вид пациента С. через 12 месяцев после операции

время, прошедшее с момента вывиха, объемы дефекта суставной поверхности головки плечевой кости, наличие сопутствующих повреждений гленоида и связочно-сухожильного комплекса, а также возраст пациента и его функциональные требования к плечевому суставу. В нашем клиническом примере представлены опции лечения заднего переломовывиха, заключающиеся в сохранении варусного смещения суставной поверхности головки плечевой кости и дистализации большого бугорка. Выбранная тактика лечения привела к отличному функциональному результату у пациента.

Литература

- Robinson CM, Akhtar A, Mitchell M, Beavis C. Complex posterior fracture-dislocation of the shoulder: epidemiology, injury patterns, and results of operative treatment. *J Bone Jt Surg.* 2007; 89 (7): 1454–66.
- Kowalsky MS, Levine WN. Traumatic posterior glenohumeral dislocation: classification, pathoanatomy, diagnosis, and treatment. *Orthop Clin North Am.* 2008; 39 (4): 519–33.
- Schliemann B, Muder D, Gebmann J, Schildhauer TA, Seybold D. Locked posterior shoulder dislocation: treatment options and clinical outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011; 131 (8): 1127–34.
- Hill NA, McLaughlin HL. Locked posterior dislocation simulating a 'frozen shoulder'. *J Trauma.* 1963; 3: 225–34.
- Cicak N. Posterior dislocation of the shoulder. *J Bone Jt Surg.* 2004; 86 (3): 9.
- Sheehan SE, Gaviola G, Gordon R, Sacks A, Shi LL, Smith SE. Traumatic Shoulder Injuries: A force mechanism analysis — glenohumeral dislocation and instability. *Am J Roentgenol.* 2013; 201 (2): 378–93.
- Paparoidamis G, Iliopoulos E, Narvani AA, Levy O, Tsiroidis E, Polyzois I. Posterior shoulder fracture-dislocation: A systematic review of the literature and current aspects of management. *Chin J Traumatol.* 2021; 24 (1): 18–24.
- Егиазарян К. А., Ратьев А. П., Ершов Д. С., Куруч Е. А., Кузнецов В. Н., Овчаренко Н. В. Среднесрочные результаты хирургического лечения пациентов с переломовывихами плечевой кости. *Травматология и ортопедия России.* 2020; 26 (4): 68–79.
- Липина М. М., Лычагин А. В., Архипов С. В., Калинин Е. Б., Алиев Р. И., Явлиева Р. Х. и др. Адаптация основных опросников, применяемых для оценки состояния и функции плечевого сустава при боли в суставе различной этиологии. *Кафедра травматологии и ортопедии.* 2018; 34 (4): 44–50.
- Егиазарян К. А., Лазишвили Г. Д., Ратьев А. П., Данилов М. А., Ответчикова Д. И. Оперативное лечение повреждений вращательной манжеты плечевого сустава. *Кафедра травматологии и ортопедии.* 2017; 22 (2): 15–18.
- Егиазарян К. А., Ратьев А. П., Гордиенко Д. И., Григорьев А. А., Овчаренко Н. В. Среднесрочные результаты лечения переломов проксимального отдела плечевой кости методом внутрикостного остеосинтеза. *Травматология и ортопедия России.* 2018; 24 (4): 81–88.

12. Diklic ID, Ganic ZD, Blagojevic ZD, Nho SJ, Romeo AA. Treatment of locked chronic posterior dislocation of the shoulder by

reconstruction of the defect in the humeral head with an allograft. *J BONE Jt Surg.* 2010; 92 (1): 6.

References

1. Robinson CM, Akhtar A, Mitchell M, Beavis C. Complex posterior fracture-dislocation of the shoulder: epidemiology, injury patterns, and results of operative treatment. *J Bone Jt Surg.* 2007; 89 (7): 1454–66.
2. Kowalsky MS, Levine WN. Traumatic posterior glenohumeral dislocation: classification, pathoanatomy, diagnosis, and treatment. *Orthop Clin North Am.* 2008; 39 (4): 519–33.
3. Schliemann B, Muder D, Gebmann J, Schildhauer TA, Seybold D. Locked posterior shoulder dislocation: treatment options and clinical outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011; 131 (8): 1127–34.
4. Hill NA, McLaughlin HL. Locked posterior dislocation simulating a 'frozen shoulder'. *J Trauma.* 1963; 3: 225–34.
5. Cicak N. Posterior dislocation of the shoulder. *J Bone Jt Surg.* 2004; 86 (3): 9.
6. Sheehan SE, Gaviola G, Gordon R, Sacks A, Shi LL, Smith SE. Traumatic Shoulder Injuries: A force mechanism analysis — glenohumeral dislocation and instability. *Am J Roentgenol.* 2013; 201 (2): 378–93.
7. Papparoidamis G, Iliopoulos E, Narvani AA, Levy O, Tsiridis E, Polyzois I. Posterior shoulder fracture-dislocation: A systematic review of the literature and current aspects of management. *Chin J Traumatol.* 2021; 24 (1): 18–24.
8. Egiazaryan KA, Ratyev AP, Ershov DS, Kuruch EA, Kuznetsov VN, Ovcharenko NV. Srednesrochnye rezul'taty xirurgicheskogo lecheniya pacientov s perelomovyvixami plechevoj kosti. *Travmatologiya i ortopediya Rossii.* 2020; 26 (4): 68–79.
9. Lipina MM, Lychagin AV, Archipov SV, Kalinsky EB, Aliev RI, Yavliya RH et al. Adaptaciya osnovnyx oprosnikov, primenyaemyx dlya ocenki sostoyaniya i funkcii plechevogo sustava pri boli v sustave razlichnoj ehtologii. *Kafedra travmatologii i ortopedii.* 2018; 34 (4): 44–50.
10. Egiazaryan KA, Lazishvili GD, Ratyev AP, Danilov MA, Otvetchikova DI. Operativnoe lechenie povrezhdenij vrashhatel'noj manzhety plechevogo sustava. *Kafedra travmatologii i ortopedii.* 2017; 22 (2): 15–18.
11. Egiazaryan KA, Ratyev AP, Gordienko DI, Grigoriev AV, Ovcharenko NV. Srednesrochnye rezul'taty lecheniya perelomov proksimal'nogo otdela plechevoj kosti metodom vnutrikostnogo osteosinteza. *Travmatologiya i ortopediya Rossii.* 2018; 24 (4): 81–88.
12. Diklic ID, Ganic ZD, Blagojevic ZD, Nho SJ, Romeo AA. Treatment of locked chronic posterior dislocation of the shoulder by reconstruction of the defect in the humeral head with an allograft. *J BONE Jt Surg.* 2010; 92 (1): 6.

ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИЗОБРАЖЕНИЯ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗРИТЕЛЬНЫХ ФИКСАЦИЙ ПРИ РЕШЕНИИ ПРОСТЫХ КОГНИТИВНЫХ ЗАДАЧ

В. Б. Никишина¹, Е. А. Петраш^{1✉}, О. Ф. Природова¹, Р. С. Ахраменко¹, А. В. Данилова², А. А. Кузнецова²

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

² Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Актуальность исследования обусловлена необходимостью организации предъявляемой информации с учетом параметров глазодвигательных реакций при решении простых когнитивных задач, что позволит оптимизировать процессы обучения, в том числе с использованием дистанционных образовательных технологий. Целью работы было изучить параметры глазодвигательных реакций при решении простой когнитивной задачи на узнавание по возрастной группе. Объем выборки составил 97 человек (47 мужчин и 50 женщин) в возрасте 21–36 лет. Нормирование показателей глазодвигательных реакций осуществляли по возрастным группам: 21–26 лет — 34 человека; 27–32 года — 29 человек; 33–36 лет — 34 человека, с использованием разработанной авторской методики и программно-аппаратного комплекса Tobii EyeX (ПО «GazeControl»). Показано, что ориентационные характеристики изображения (угол предъявления) статистически значимо соотносимы с показателями распределения фиксации взгляда. Распределение фиксации взгляда происходит преимущественно в верхней и в левой половинах изображения (первый квадрант) вне зависимости от угла наклона изображения и его характеристики (схематичное монохромное или полноцветное изображение). Выявлены значимая зависимость решения простых когнитивных задач и узнавания от пространственной ориентации предъявляемых стимулов и статистически значимое увеличение числа ошибок с увеличением возраста при узнавании как схематичного монохромного изображения ($p_1 = 0,014$; $p_2 = 0,016$; $p_3 = 0,014$), так и полноцветного изображения ($p_1 = 0,015$; $p_2 = 0,015$; $p_3 = 0,017$). Определены достоверно значимые углы поворота предъявляемых изображений лиц, приводящих к устойчивым ошибкам узнавания.

Ключевые слова: нормирование, глазодвигательные реакции, фиксации взгляда

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 211 от 18 октября 2021 г.), проведено в соответствии с требованиями Основ законодательства «Об охране здоровья граждан»; все участники подписали информированное согласие на обследование.

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

Статья получена: 07.02.2022 **Статья принята к печати:** 28.02.2022 **Опубликована онлайн:** 18.03.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.011

THE IMPACT OF IMAGE ORIENTATION ON DISTRIBUTION OF VISUAL FIXATIONS WHILE SOLVING SIMPLE COGNITIVE PROBLEMS

Nikishina VB¹, Petrash EA^{1✉}, Prirodova OF¹, Akhramenko RS¹, Danilova AV², Kuznetsova AA²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Optimization of the educational process, including distance learning, requires orderly arrangement of the information presented, which translates into the need to factor in oculomotor reactions accompanying the search for solutions to simple cognitive tasks. This need supports the relevance of the present study, which aimed to investigate the age-dependent parameters of the oculomotor reactions occurring in solving a simple cognitive task. The sample included 97 persons, 47 males and 50 females, ages 21 to 36. For the purpose of rating the oculomotor reactions, the sample was divided into age groups: 21–26 years ($n = 34$); 27–32 years ($n = 29$); 33–36 years ($n = 34$). The methodology that governed the rating procedures was developed by the authors of the study and relied on the Tobii EyeX eye tracking hardware and software solution (GazeControl software). The study revealed a significant correlation between orientation of the image (presentation angle) and distribution of the visual fixations: regardless of the image presentation angle and its properties (schematic monochrome or full color image), the fixations tend to fall predominantly into the top and left parts of the image (the first quadrant). Other findings include a) a significant dependence of the capability to solve simple cognitive tasks and recognize the contents of the image on the spatial orientation of the presented stimuli, and b) the number of errors made in image contents recognition increasing with age, this dependence being significant and observed for both the schematic monochrome image ($p_1 = 0,014$; $p_2 = 0,016$; $p_3 = 0,014$) and the full-color image ($p_1 = 0,015$; $p_2 = 0,015$; $p_3 = 0,017$). The researchers have also identified the significant angles of rotation of the presented face images that stably caused recognition errors.

Keywords: rating, oculomotor reactions, visual fixation, gaze fixation

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (minutes #211 of October 18, 2021) and conducted in conformity with the requirements of the Framework Legislation "On the Protection of Health of the Citizens." All participants signed the informed consent form agreeing to undergo examination

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

Received: 07.02.2022 **Accepted:** 28.02.2022 **Published online:** 18.03.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.011

Слежение за глазодвигательными реакциями представляет собой неинвазивную методику изучения широкого спектра когнитивных и регуляторных процессов: внимания, мнемических процессов, процессов категоризации мышления [1–3].

Методика оценки особенностей глазодвигательных реакций эффективна при решении простых когнитивных

задач с целью оптимизации процессов обучения, в том числе с использованием дистанционных образовательных технологий [4–7]. Когнитивная задача включает в себя процесс функционирования первоначальных представлений, уточнения, дополнения, конкретизации, систематизации, дифференцирования и обобщения знаний. В качестве простой когнитивной задачи мы

рассматриваем задачу на узнавание изображений. Объектом узнавания выбрано изображение лица человека как сложного социального стимула восприятия [8–14]. Сложность объекта восприятия обусловлена множественностью детализаций, организованных в единое симметричное пространство с учетом определенности места расположения каждого элемента. Социальность объекта позволяет его идентифицировать в границах вида (человек) и по гендерному основанию.

Библиометрический анализ, проведенный по наукометрическим базам Elibrary (по ключевым словам «глазодвигательные реакции») и Web of Science (по ключевым словам «eye movements») за последние пять лет (2015–2020) позволяет констатировать меньший исследовательский интерес к изучению у отечественных специалистов по сравнению с зарубежными коллегами. Результаты изучения глазодвигательных реакций представлены в нейронауках, психологии, медицинских областях научного знания (офтальмологии и психиатрии), компьютерных науках, инженерии. Доля публикаций в общем объеме научных работ, посвященных изучению глазодвигательных реакций, составляет 29%. Многоаспектность и многоплановость изучения глазодвигательных реакций в зарубежных исследованиях доказывает высокую информативность и универсальность данного метода для изучения когнитивных процессов и решения практических задач, связанных с процессами мышления и зрительным восприятием как таковым.

Отношение к воспринимаемым стимулам и их категоризация находят отражение в изменении параметров глазодвигательных реакций, таким образом окуломоторная активность обеспечивает взаимодействие человека с миром. Движения глаз, приобретая статус операций и действий, формируют целостные окуломоторные структуры. Каждая из формируемых окуломоторных структур связана с определенными мотивами и условиями выполнения конкретной деятельности [8, 9]. Отслеживание движений глаз позволяет также измерять переменные, которые трудно получить с помощью других методов исследования, таких как прямая оценка того, куда конкретно люди смотрят в статических или динамических визуальных стимулах, и мгновенное задействование когнитивных ресурсов в соответствии с требованиями задачи [14].

Нормирование параметров глазодвигательных реакций при зрительном восприятии рассматривается как статистическая процедура распределения изучаемых показателей в рамках одного возрастного периода исключительно в группе с отсутствием соматической и психической патологии (условно здоровых). Организация предъявляемой информации с учетом параметров глазодвигательных реакций при решении простых когнитивных задач позволит оптимизировать процессы обучения, в том числе с использованием дистанционных образовательных технологий.

При изучении влияния числа фиксации взгляда на успешность распознавания изображений лиц установлено, что успешность распознавания изображений знакомых и незнакомых лиц существенно выше при двух фиксациях взгляда, нежели, чем при одной. Кроме того, увеличение числа фиксации не приводит к повышению качества распознавания [15]. Основной вывод авторов исследования был о том, что для узнавания лица человека по его изображению достаточно двух фиксации. В качестве общей тенденции следует отметить также направление

сканирования изображения лица — слева направо. При этом фиксации взгляда на обучающем этапе по своему расположению на изображении лица существенно отличаются от таковых на собственно экспериментальном «идентификационном» этапе.

В отечественных исследованиях глазодвигательных реакций тоже был подтвержден вывод о необходимости двух фиксации взгляда для успешного распознавания изображения лица человека [16].

В качестве факторов, влияющих на параметры глазодвигательных реакций, рассматривают экспериментальную задачу (способную влиять на распределение фиксации взгляда на стимульном изображении), с одной стороны, и формат предъявляемого изображения, с другой. Оценку влияния двух указанных факторов на параметры глазодвигательных реакций осуществляли в рамках схемы, включающей в себя два эксперимента. Оба эксперимента имели одинаковую задачу (на идентификацию изображений лиц) при различиях в формате предъявляемого изображения и с разным углом наклона предъявляемого стимула. Основное внимание исследователей при изучении характеристик глазодвигательных реакций при восприятии изображений лиц сосредоточено на анализе числа фиксации взгляда в содержательных зонах изображения лица — области глаз, рта и носа [11–13]. Пространственно-ориентационные характеристики (в направлениях право-лево, верх-низ, угол наклона изображения) при этом не учитывают. Авторы указывают также на значимость фактора возраста для зрительно-пространственных функций (полей зрительного восприятия, глазомера и др.). Корреляционные отношения между координатными осями зрительного сенсорного поля в период взрослости или совсем не обнаруживаются (в отличие от предшествующих возрастных этапов), или носят избирательный характер. По мере взросления существенно ослабляются функциональные связи между границами поля зрения по отдельным направлениям. В перцептивном зрительном поле, наоборот, периоды усиления структурности совпадают с моментами общего значительного улучшения пространственно-различительной деятельности по мере взросления. Таким образом, проявление структурированности зрительного восприятия в данном случае имеет важное значение для достижения зрелости и сохранения на оптимальном уровне данной зрительно-пространственной функции на протяжении жизни [17].

В поисках ответа на вопрос, какие характеристики (содержательные или ориентационные) оказывают большее влияние на восприятие визуального стимула, мы исходили из предположения о том, что изменение угла наклона будет определять распределение и число фиксации на изображении. В случае преимущественного влияния содержательных характеристик на восприятие изображения лица распределение фиксации взгляда будет оставаться относительно постоянным на определенных областях изображения лица (в области глаз, носа, рта). При преимущественном влиянии ориентационных характеристик основное число фиксации взгляда будет сосредоточено в одном из четырех квадрантов изображения вне зависимости от изменения угла наклона.

Целью исследования было изучение параметров глазодвигательных реакций (число фиксации, необходимое для решения простой когнитивной задачи на узнавание; распределение фиксации по областям изображения) при решении простой когнитивной задачи по возрастной группе.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Общий объем исследовательской выборки составил 97 испытуемых (47 мужчин и 50 женщин) в возрасте 21–36 лет, что соответствует периоду ранней взрослости. Нормирование показателей глазодвигательных реакций осуществляли по возрастным группам: 21–26 лет — 34 человека; 27–32 года — 29 человек; 33–36 лет — 34 человека. 49% испытуемых из общего объема выборки используют средства коррекции зрения (очки или линзы с диоптриями).

В исследовании использовали разработанную авторскую методику и программно-аппаратный комплекс Tobii EyeX (ПО «GazeControl») [18]. Частота записи изображения айтрекером Tobii EyeX Controller составляет 90 Гц. Рабочее расстояние айтрекера — 50–95 см, размеры отслеживаемого пространства — 40–30 см на расстоянии 75 см.

В соответствии с авторской процедурой испытуемым необходимо определить, различаются ли два последовательно показанных изображения лиц (предъявлены изображения лиц двух разных людей) или это изображение одного и того же человека. Ответ фиксировали по каждой предъявляемой паре изображений лиц.

Стимульный материал представлял собой изображения двух типов: схематичные монохромные (рис. 1А) и полноцветные. Каждый тип стимульного материала содержал по 45 пар лиц, разделенных на две группы: 15 пар изображений лиц, в которых угол наклона центральной оси изображения лица составлял 0°; 30 пар лиц, где два стимульных изображения лица различаются между собой углом наклона центральной оси изображения. Шаг угла поворота центральных осей каждого из изображений в паре относительно друг друга вне зависимости от направления составлял 12°. В качестве основания выбора угла поворота изображения в 12° приняты результаты более ранних исследований [19].

Все стимульные изображения имеют разрешение 1600–900 пикселей, формат «.jpg». Монохромное изображение лица содержит черные контуры овала лица, границы волос, ушей, бровей, глаз, носа, рта на белом фоне; полноцветное изображение лица представляет собой фотографию лица мужчины на белом фоне. Каждое изображение (в том числе изображения-интерференции)

предъявлялось в течение 3 с, время предъявления одной пары лиц (включая интерференцию) составляло 15 с, время предъявления одного стимульного ряда — 7 мин 30 с, общее время предъявления монохромного и полноцветного стимульного ряда достигало 15 мин.

Между предъявлениями монохромных и полноцветных изображений испытуемый отдыхал в течение 2 мин, мог свободно рассматривать окружение и говорить.

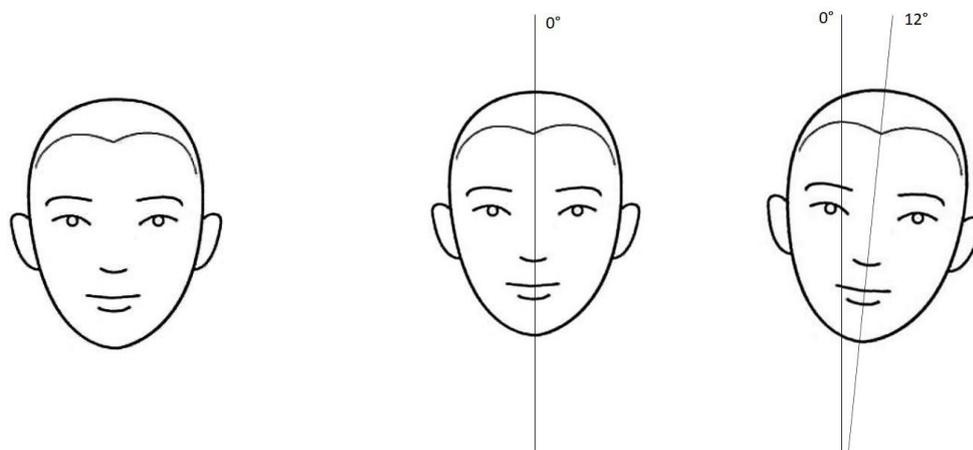
Число допущенных ошибок в суждениях о схожести или различии двух изображений лиц в паре позволяет оценивать особенности процесса зрительного восприятия при изменении угла наклона одного из предъявляемых двух стимульных изображений в паре. Анализ допущенных ошибок распознавания при решении простой когнитивной задачи на узнавание, допускаемых при выполнении экспериментального задания, позволяет определить, при каких углах наклона центральной оси предъявляемого стимульного изображения лица возникают затруднения в узнавании изображений лиц.

По результатам исследования получены тепловые карты распределения взгляда для каждого предъявляемого стимула. Зоны, отмеченные красным цветом на тепловой карте, полученной после прохождения испытуемым авторской методики, обозначаются как фиксации взгляда и подсчитываются. Подсчет числа фиксаций взгляда осуществлялся относительно квадрантов предъявляемого лица.

Статистическую обработку осуществляли с использованием методов сравнительной статистики (непараметрический U -критерий Манна-Уитни с соблюдением ограничений в его использовании; T -критерия Уилкоксона для сопоставления показателей, измеренных в двух разных условиях, на одной и той же выборке испытуемых). Сравнение трех групп участников осуществляли попарно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

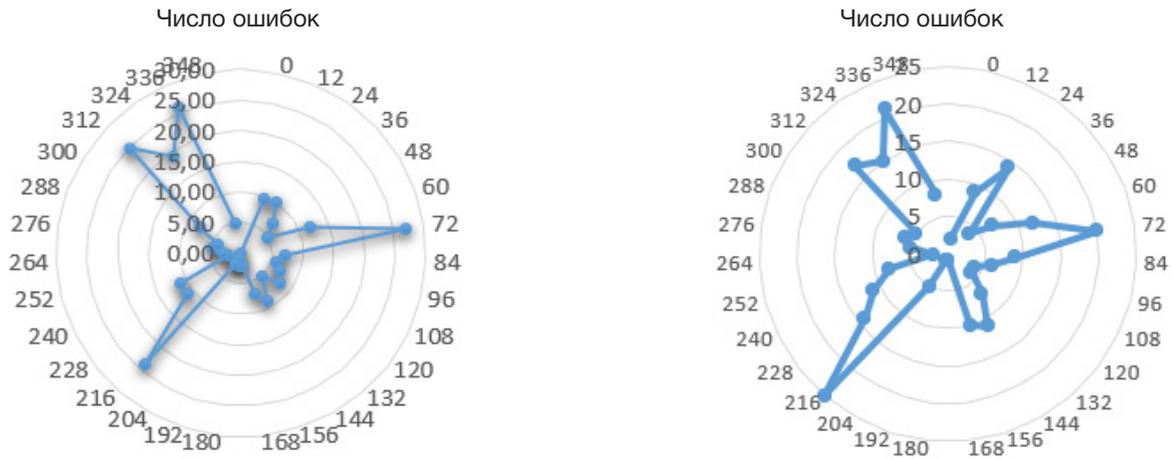
Первым этапом осуществляли анализ числа верно распознанных пар схематичных монохромных и полноцветных лиц по всей выборке испытуемых (без дифференциации по возрастным группам). В результате исследования выявлены следующие тенденции: показатель общего числа верно распознанных лиц у мужчин и женщин при узнавании как схематичных монохромных ($U = 246$;



А. Схематичное монохромное изображение лица

Б. Угол поворота двух последовательно предъявленных стимульных изображений одной пары

Рис. 1. Стимульный материал, предъявляемый испытуемым



А. Схематичные монохромные изображения лица

Б. Полноцветные изображения лица

Рис. 2. Диаграммы распределения числа ошибок по выборке в целом при узнавании монохромных и полноцветных изображений в зависимости от угла поворота изображения

$p = 0,453$), так и полноцветных ($U = 278$; $p = 0,887$) изображений, статистически значимых различий не выявлено. Аналогичные результаты получены также при сравнении групп испытуемых, использующих и не использующих средства коррекции зрения (при восприятии схематичных монохромных изображений $U = 272$; $p = 0,597$; при восприятии полноцветных изображений $U = 264,5$; $p = 0,505$). Полученные результаты позволяют нам сделать вывод о том, что у испытуемых вне зависимости от пола и использования средств коррекции зрения эффективность решения простой когнитивной задачи на узнавание изображения лиц значимо не различается. Следовательно, факторы пола и использования средств коррекции зрения не являются значимыми для эффективности узнавания.

Далее осуществляли анализ эффективности решения простой когнитивной задачи (распознавания лиц) через расчет показателей общего числа ошибок и общего числа фиксации (фиксации распределялись по четырем квадрантам изображения). При восприятии схематичных монохромных и полноцветных изображений в целом по выборке испытуемых установлены углы наклона предъявляемых лиц, при которых фиксировалось наибольшее число ошибок (рис. 2).

Максимальное число ошибок при решении простых когнитивных задач на узнавание изображений лиц

фиксируется при следующих углах наклона центральной оси изображения лица (как схематичных монохромных, так и полноцветных): 72° , 216° , 312° , 324° и 336° . При повороте оси изображения второго лица в предъявляемой паре относительно первого в границах указанных углов частота ошибок узнавания в среднем составляет 57,6% случаев. При этом установлено, что при восприятии полноцветных изображений тоже высокий процент ошибок выявлен при предъявлении изображения под углом 24° (рис. 2Б), что не установлено при восприятии схематичных монохромных изображений (рис. 2А).

В результате сравнительной оценки числа ошибок по трем возрастным группам получены следующие результаты: статистически значимое увеличение числа ошибок при увеличении возраста (p_1 — показатель значимости различий между группами 21–26 лет и 27–32 года; p_2 — показатель значимости различий между группами 27–32 года и 33–36 лет; p_3 — показатель значимости различий между группами 21–26 лет и 33–36 лет) при узнавании как схематичного монохромного изображения ($p_1 = 0,014$; $p_2 = 0,016$; $p_3 = 0,014$), так и полноцветного изображения ($p_1 = 0,015$; $p_2 = 0,015$; $p_3 = 0,017$) (рис. 3).

Увеличение числа ошибок при увеличении возраста может быть связано со стереотипизацией зрительного восприятия и снижением детализации восприятия. На

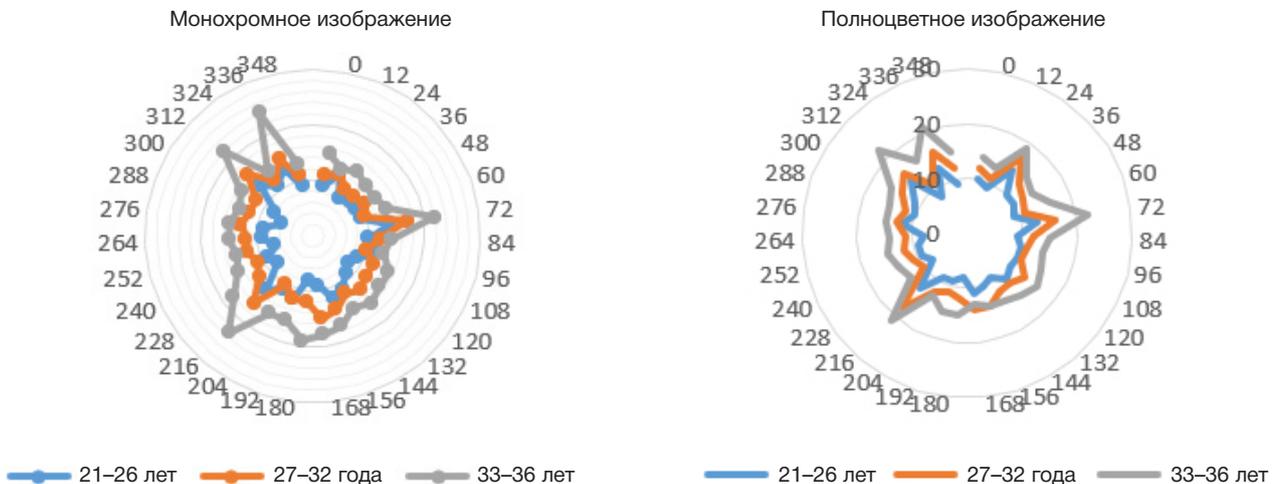


Рис. 3. Диаграммы распределения числа ошибок по группам испытуемых с учетом возраста при решении простой когнитивной задачи на узнавании схематичных монохромных и полноцветных изображений в зависимости от угла поворота изображения

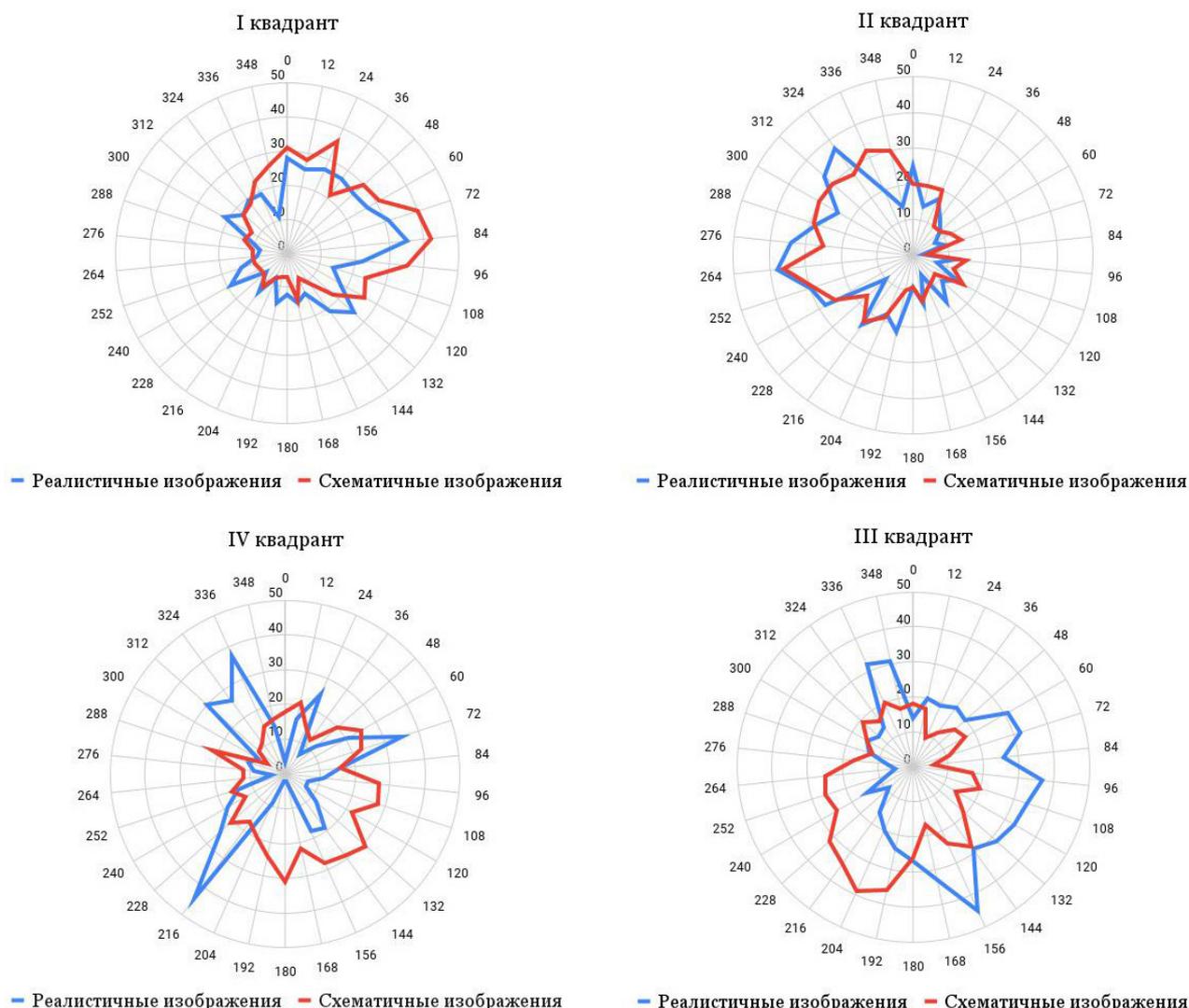


Рис. 4. Диаграммы распределения фиксаций взгляда по квадрантам при предъявлении схематичного монохромного и полноцветного изображений в зависимости от угла поворота изображения

это указывает характер допускаемых испытуемыми ошибок. Испытуемые первой возрастной группы (21–26 лет) при узнавании изображений лиц допускали ошибки, преимущественно связанные с детализацией восприятия: при последовательном предъявлении одного и того же изображения, но с разными углами наклона утверждали, что это изображения разных лиц. Испытуемые возрастной группы 33–36 лет при решении простой когнитивной задачи на узнавание при последовательном предъявлении изображений разных лиц, отличающихся углом наклона центральной оси изображения, утверждали, что предъявляемые изображения — одинаковые, т. е. допускали ошибки, связанные со стереотипизацией восприятия. При этом в возрастной группе 27–32 года испытуемые допускали оба типа ошибок с равной частотой: не узнавали одинаковые изображения лиц, что связано с детализацией восприятия, и не узнавали два изображения одного и того же лица (обозначаются как разные), обозначаемые нами как ошибки стереотипизации восприятия.

В результате оценки значимости различий показателей общего числа фиксаций взгляда по возрастным группам методом попарного сравнения (с использованием U -критерия Манна–Уитни, $p < 0,05$) статистически значимых различий выявлено не было. Данный результат

послужил основанием для объединения испытуемых трех возрастных групп в общую исследовательскую выборку.

При сравнительном анализе показателей числа ошибок при предъявлении схематичных монохромных и полноцветных изображений с использованием критерия Уилкоксона ($p < 0,05$) статистически значимых различий выявлено не было ($T = 605$; $p = 0,763$). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что качество предъявляемого стимульного изображения (схематичное монохромное и полноцветное) не оказывает значимого влияния на эффективность решения простой когнитивной задачи (узнавание изображений лиц). Узнавание происходит по ключевым точкам изображения лица вне зависимости от того, монохромное схематичное оно или полноцветное. Точки фиксации взгляда сосредоточены на линии глаз, носа и рта.

Следующим этапом исследования была оценка числа фиксаций при предъявлении схематичных монохромных и реалистичных полноцветных изображений на всем объеме выборки без дифференциации по возрастным группам с учетом квадрантов. В результате исследования распределения фиксаций взгляда при восприятии схематичного монохромного изображения выявлено следующее распределение максимального числа фиксаций взгляда: в первом квадранте фиксации взгляда

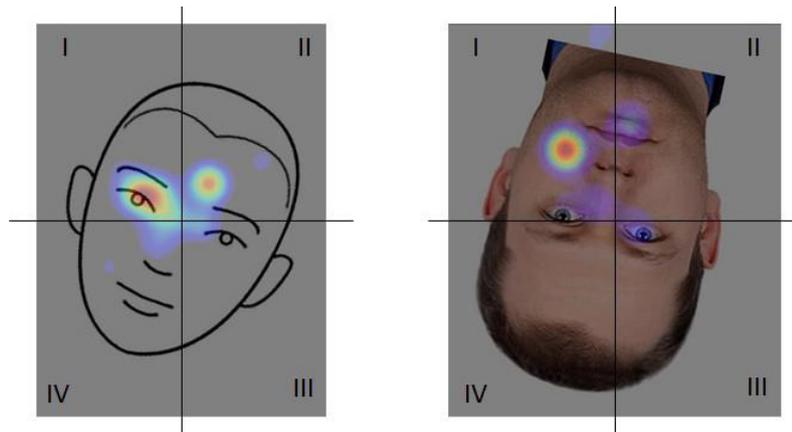


Рис. 5. Тепловые карты фиксации взгляда при предъявлении схематичных монохромных и полноцветных изображений

фокусируются при углах наклона изображения $24\text{--}96^\circ$; во втором квадранте фиксации взгляда преобладают при углах наклона $216\text{--}348^\circ$; в третьем квадранте фиксации взгляда сосредоточены при углах наклона центральной оси изображения $192\text{--}228^\circ$; в четвертом квадранте максимальное число фиксации взгляда отмечено при углах наклона изображения $108\text{--}180^\circ$ (рис. 4).

При оценке распределения фиксации взгляда по квадрантам при предъявлении полноцветных изображений лиц получены аналогичные результаты. В первом квадранте фиксации взгляда сосредоточены при углах наклона центральной оси изображения лица $0\text{--}84^\circ$. Во втором квадранте фиксации взгляда сосредоточены при углах наклона $240\text{--}324^\circ$. В третьем квадранте наибольшее число фиксации взгляда происходит при углах наклона изображения $192\text{--}276^\circ$. В четвертом квадранте фиксации взгляда преобладают при углах $96\text{--}168^\circ$ (рис. 3).

В результате проведенного исследования получено экспериментальное подтверждение значимых различий в распределении фиксации взгляда при решении простой когнитивной задачи при изменении пространственно-ориентационных (угла наклона центральной оси изображения лица) характеристик изображения лица (как схематичного монохромного, так и полноцветного) на распределение фиксации взгляда при решении простой когнитивной задачи. Вне зависимости от угла наклона центральной оси изображения фиксации взгляда сфокусированы преимущественно в верхней левой части изображения лица, что проиллюстрировано на тепловых картах (рис. 5).

В качестве общей тенденции следует еще указать на неравномерность распределения фиксации взгляда по квадрантам, а также множественное повторение траекторий движения. Точки фиксации сосредоточены в области линии глаз изображения лица. При этом взгляд неоднократно возвращался к точкам фиксации. При восприятии как схематичного монохромного изображения лица, так и полноцветного изображения, скопление неоднократно повторяющихся фиксации также отмечено в области левой скуловой части (четвертый квадрант) и области рта справа (третий квадрант) (рис. 6).

Специфической особенностью являются множественные фиксации взгляда в области носа справа (третий квадрант) при восприятии полноцветного изображения. При восприятии схематичного монохромного изображения фиксации в области носа отсутствуют полностью. Данная особенность обусловлена тем, что ориентационные характеристики изображения лица (особенности изображения формы и разреза глаз, формы и размера носа, форма и размер губ и пр.) определяют траекторию движения глаз и области фиксации взгляда при решении простой когнитивной задачи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процедура нормирования предполагает формирование нормативов, среди которых не выявлено половой специфики в параметрах глазодвигательных реакций; фактор использования средств коррекции зрения не оказывает значимого влияния.

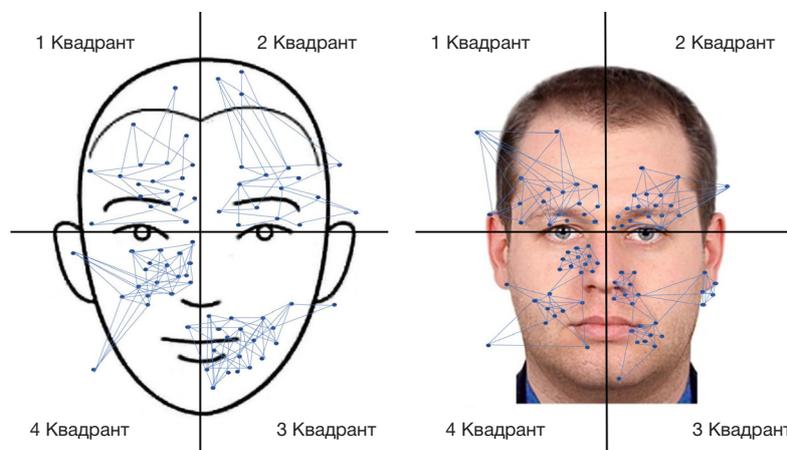


Рис. 6. Пример траектории движения взгляда при предъявлении схематичного монохромного и полноцветного изображения (без дифференциации по возрастным группам). * — точками обозначены фиксации взгляда, линиями — саккады

Таблица. Показатели нормативных значений числа фиксаций взгляда и числа допускаемых ошибок при решении простой когнитивной задачи на узнавание изображений лица

Угол наклона изображения	Число фиксаций взгляда ($x \pm \sigma$)	Число ошибок (33–36 лет)	
		Узнавание схематичных монохромных изображений ($x \pm \sigma$)	Узнавание полноцветных реалистичных изображений ($x \pm \sigma$)
0	19,7 ± 4,66	–	–
12	20,1 ± 4,64	–	–
24	21,0 ± 4,26	–	–
36	15,4 ± 3,82	–	–
48	18,0 ± 5,41	–	–
60	21,4 ± 6,81	–	–
72	24,4 ± 5,86	27,04 ± 5,18	20,12 ± 4,29
84	18,5 ± 3,64	–	–
96	22,0 ± 4,10	–	–
108	18,3 ± 3,92	–	–
120	18,8 ± 3,08	–	–
132	19,6 ± 9,21	–	–
144	20,3 ± 4,98	–	–
156	19,0 ± 3,04	–	–
168	16,3 ± 3,78	–	–
180	15,4 ± 4,91	–	–
192	17,5 ± 3,08	–	–
204	17,6 ± 4,21	–	–
216	23,0 ± 5,02	24,37 ± 3,51	25,44 ± 5,07
228	16,4 ± 4,94	–	–
240	19,1 ± 4,60	–	–
252	18,3 ± 3,86	–	–
264	17,4 ± 3,71	–	–
276	15,3 ± 2,62	–	–
288	17,4 ± 3,73	–	–
300	16,5 ± 4,02	–	–
312	21,1 ± 4,59	25,26 ± 4,87	–
324	21,1 ± 3,59	–	–
336	24,8 ± 4,85	26,17 ± 6,09	21,09 ± 3,15
348	19,9 ± 3,88	–	–

На основании полученных результатов исследования были сформированы диапазоны нормативных значений числа фиксаций взгляда с учетом угла наклона центральной оси предъявляемого изображения лица, а также числа допускаемых ошибок (как показатель среднего числа фиксаций и стандартное отклонение с указанием доверительных интервалов). При этом необходимо отметить, что нормативные значения числа фиксаций представлены по всей выборке в целом без дифференциации на возрастные группы, а также без учета качества стимульного материала — схематичное монохромное или полноцветное реалистичное, так как в результате сравнительного анализа статистически значимых различий по данным параметрам не установлено (см. таблицу).

На основании полученных экспериментальных данных диапазоны нормативных значений представлены только по возрастной группе 33–36 лет, так как только в данной возрастной группе число допущенных ошибок составляет более 75% от общего числа решаемых когнитивных задач (число допущенных ошибок, превышающее 75%, не является случайным, в то время как до 75% ошибок с

большой долей вероятности являются случайными). При этом, нормативным является число ошибок, превышающее 75%, только при определенных углах наклона центральной оси изображения лица.

Таким образом, возрастной фактор становится значимым при решении простой когнитивной задачи на узнавание как схематичных монохромных, так и полноцветных изображений: по мере увеличения возраста респондента снижается показатель успешности распознавания изображения лиц. Сам формат предъявляемого изображения не является значимым при решении простой когнитивной задачи — узнавания изображений лиц. Повторение процедуры исследования не сказывается на получаемых результатах.

Полученные в ходе исследования результаты согласуются с результатами ранее проведенных исследований. Так, доказано, что эффективность узнавания не зависит от числа фиксаций при условии, что их должно быть не менее двух [20], что также подтверждено в нашем исследовании. Также нами подтвержден вывод о том, при изменении пространственно-ориентационных характеристик стимульного изображения (по углу наклона

центральной оси изображения) меняется успешность узнавания, являющегося простой когнитивной задачей.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования достоверно установлено влияние ориентационных характеристик изображения на распределение фиксаций взгляда. Вне зависимости от угла наклона изображения и его характеристики (схематичное монохромное или полноцветное изображение) распределение фиксаций взгляда фокусируется в первом квадранте изображения. Данная особенность обусловлена культурно-историческими традициями чтения и письма в направлении слева направо и сверху вниз. Можно предположить, что у представителей других культурно-исторических традиций распределение фиксаций взгляда будет иным: представители арабских народностей читают в направлении справа налево; следовательно, и распределение фиксаций будет преимущественно в правой верхней части изображения (второй квадрант). При этом формат предъявляемого изображения не влияет на

распределение фиксаций взгляда. Выявлены углы наклона предъявляемого изображения, затрудняющие решение простой когнитивной задачи (сравнение и узнавание двух изображений). Максимальное число ошибок в узнавании изображений (схематичных монохромных и полноцветных) лиц зафиксировано при углах наклона изображения 72°, 216°, 312°, 336°. Узнавание полноцветных изображений также затруднено при угле наклона 24°, чего не наблюдается при узнавании схематичных монохромных изображений. Данная особенность обусловлена более сложной структурой полноцветного изображения в сравнении со схематичным монохромным. При рассматривании фотографий фиксации взгляда помимо линии глаз и губ отмечены также в области носа, лба и ушей. Данные детали изображений на фото являются критериями для сравнения; на схематичных монохромных изображениях данные детали являются недифференцируемыми. Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что фиксация взгляда в верхней левой части изображения позволяет избегать ошибочной трактовки, основанной на интерпретации связи содержательных областей изображения и параметров окулomotorной активности.

Литература

1. Барабанщиков В. А., редактор. Айттрекинг в психологической науке и практике. М.: Когито-Центр, 2015; 410 с.
2. Беляев Р. В., Грачев В. И., Колесов В. В., Меньшикова Г. Я., Попов А. М., Рябенков В. И. Окулomotorные реакции в фиксациях и саккадах при визуальном восприятии информации. Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии. 2020; 12 (2): 263–74. DOI: 10.17725/rensit.2020.12.263.
3. Огнев А. С. Айттрекеры в окулomotorической психодиагностике. М.: Спутник +, 2020; 134 с.
4. Клименских М. В., Лебедева Ю. В., Мальцев А. В., Савельев В. В. Психологические факторы эффективного онлайн-обучения студентов. Перспективы науки и образования. 2019; 6 (42): 312–21.
5. Colliot T, Jamet É. Understanding the effects of a teacher video on learning from a multimedia document: an eye-tracking study. Educational Technology Research and Development. 2018; 66: 1415–33. DOI: 10.1007/s11423-018-9594-x.
6. Hsieh R, Sato H. Evaluation of avatar and voice transform in programming e-learning lectures. J Multimodal User Interfaces. 2021; 15: 121–9. DOI: 10.1007/s12193-020-00349-5.
7. Kaakinen JK. What Can Eye Movements Tell us about Visual Perception Processes in Classroom Contexts? Commentary on a Special Issue. Educational Psychology Review. 2021; 33 (4):169–79. DOI: 10.1007/s10648-020-09573-7.
8. Барабанщиков В. А. Айттрекинг. Методы регистрации движений глаз в психологических исследованиях и практике. М.: Когито-центр, 2014; 128 с.
9. Барабанщиков В. А. Окулomotorные структуры восприятия. М.: Институт психологии РАН, 1997; 380 с.
10. Барабанщиков В. А., Ананьева К. И., Харитонов В. Н. Организация движений глаз при восприятии изображений лица. Экспериментальная психология. 2009; 2 (2): 31–60.
11. Демидов А. А. Особенности окулomotorной активности при оценке индивидуально-психологических особенностей коммуникантов разных этносов по выражению их лица. Экспериментальная психология. 2020; 13 (1): 159–70.
12. Dalton KM. Gaze fixation and the neural circuitry of face processing in autism. Nature neuroscience. 2005; 8 (4): 519–26. DOI: 10.1038/nm1421.
13. Pelphrey KA. Visual scanning of faces in autism. Autism Dev Disord. 2002; 32 (4): 249–61.
14. Tiadi A, Gérard CL, Peyre H, Bui-Quoc E, Bucci MP. Immaturity of Visual Fixations in Dyslexic Children. Front Hum Neurosci. 2016; 10: 58. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00058.
15. Hsiao JW, Cottrell G. Two fixations suffice in face recognition. Psychological Science. 2008; 19 (10): 998–1006.
16. Рожкова Г. И., Васильева Н. Н., Огнивов В. В. Фиксационные движения глаз в естественных условиях зрительного восприятия. Биомеханика глаза. Сб. трудов конференции. М.: МНИИГБ им. Гельмгольца, 2009; с. 18–24
17. Рыбалко Е. Ф. Возрастная и дифференциальная психология. СПб.: Питер, 2001; 224 с.
18. Природова О. Ф., Никишина В. Б., Моргун А. Н., Резник-Орская М. А., Петраш Е. А. Программа для аппаратного комплекса регистрации и оценки глазодвигательной реакции при выполнении профессионально-когнитивных задач (ПАКРОГР). Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2021614304, 23.03.2021. Заявка № 2021610404 от 18.01.2021.
19. Хьюбел Д. Глаз, мозг, зрение. М.: Мир, 1990; 239 с.
20. Hsiao JW, Cottrell G. Two fixations suffice in face recognition. Psychological Science. 2008; 19 (10): 998–1006.

References

1. Barabanshnikov VA, redaktor. Aytreking v psihologicheskoy nauke i praktike. M.: Kogito-Centr, 2015; 410 s. Russian.
2. Belyaev RV, Grachev VI, Kolesov VV, Menshikova GYa, Popov AM, Ryabenkov VI. Okulomotornye reakcii v fiksacijah i sakkadah pri vizual'nom vosprijatii informacii. Radioelektronika. Nanosistemy. Informacionnye tehnologii. 2020; 12 (2): 263–74. DOI: 10.17725/rensit.2020.12.263. Russian.
3. Ognev AS. Aytrekey v okulometrichekoy psihodiagnostike. M.: Sputnik +, 2020; 134 s. Russian.
4. Klimenskih MV, Lebedeva YuV, Malcev AV, Savelev VV. Psihologicheskie faktory jeffektivnogo onlajn-obuchenija studentov. Perspektivy nauki i obrazovanija. 2019; 6 (42): 312–21. Russian.
5. Colliot T, Jamet É. Understanding the effects of a teacher video on learning from a multimedia document: an eye-tracking study.

- Educational Technology Research and Development. 2018; 66: 1415–33. DOI: 10.1007/s11423-018-9594-x.
6. Hsieh R, Sato H. Evaluation of avatar and voice transform in programming e-learning lectures. *J Multimodal User Interfaces*. 2021; 15: 121–9. DOI: 10.1007/s12193-020-00349-5.
 7. Kaakinen JK. What Can Eye Movements Tell us about Visual Perception Processes in Classroom Contexts? Commentary on a Special Issue. *Educational Psychology Review*. 2021; 33 (4):169–79. DOI: 10.1007/s10648-020-09573-7.
 8. Barabanshnikov VA. Ajtreking. Metody registracii dvizhenij glaz v psihologicheskikh issledovanijah i praktike. M.: Kogito-centr, 2014; 128 s. Russian.
 9. Barabanshnikov VA. Okulomotornye struktury vosprijatija. M.: Institut psihologii RAN, 1997; 380 s. Russian.
 10. Barabanshnikov VA, Ananeva KI, Haritonov VN. Organizacija dvizhenij glaz pri vosprijatii izobrazhenij lica. *Jeksperimental'naja psihologija*. 2009; 2 (2): 31–60. Russian.
 11. Demidov AA. Osobennosti okulomotornoj aktivnosti pri ocenke individual'no-psihologicheskikh osobennostej kommunikantov raznyh jetnosov po vyrazheniju ih lica. *Jeksperimental'naja psihologija*. 2020; 13 (1): 159–70. Russian.
 12. Dalton KM. Gaze fixation and the neural circuitry of face processing in autism. *Nature neuroscience*. 2005; 8 (4): 519–26. DOI: 10.1038/nn1421.
 13. Pelphrey KA. Visual scanning of faces in autism. *Autism Dev Disord*. 2002; 32 (4): 249–61.
 14. Tiadi A, Gérard CL, Peyre H, Bui-Quoc E, Bucci MP. Immaturity of Visual Fixations in Dyslexic Children. *Front Hum Neurosci*. 2016; 10: 58. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00058.
 15. Hsiao JW, Cottrell G. Two fixations suffice in face recognition. *Psychological Science*. 2008; 19 (10): 998–1006.
 16. Rozhkova GI, Vasileva NN, Ognivov VV. Fiksacionnye dvizhenija glaz v estestvennyh uslovijah zritel'nogo vosprijatija. *Biomehanika glaza. Sb. trudov konferencii*. M.: MNIIGB im. Gelmgolca, 2009; s. 18–24. Russian.
 17. Rybalko EF. *Vozrastnaja i differencial'naja psihologija*. SPb.: Piter, 2001; 224 s. Russian.
 18. Prirodova OF, Nikishina VB, Morgun AN, Reznik-Orskaja MA, Petrash EA. Programma dlja apparatnogo kompleksa registracii i ocenki glazodvigatel'noj reakcii pri vypolnenii professional'no-kognitivnyh zadach (PAKROGR). *Svidetel'stvo o registracii programmy dlja JeVM 2021614304, 23.03.2021. Zajavka # 2021610404 ot 18.01.2021*. Russian.
 19. Hjubel D. *Glaz, mozg, zrenie*. M.: Mir, 1990; 239 s. Russian.
 20. Hsiao JW, Cottrell G. Two fixations suffice in face recognition. *Psychological Science*. 2008; 19 (10): 998–1006.