

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

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
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.2022-05

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

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

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



Подписано в печать 31.10.2022
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc, professor

EDITORS Valentina Geidebrekht, Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

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

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2021: 0.5

Scopus®

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

SJR
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

WEB OF SCIENCE™

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Five-year h-index is 8

**Google
scholar**

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2022-05

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

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

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



Approved for print 31.10.2022
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5

Своеобразие поморов Онежского полуострова и Зимнего берега в генетическом контексте севера Европы

В. С. Окованцев, Г. Ю. Пономарев, А. Т. Агджоян, А. Т. Агджоян, В. Ю. Пылёв, Е. В. Балановская

Peculiarity of Pomors of Onega Peninsula and Winter Coast in the genetic context of Northern Europe

Okovantsev VS, Ponomarev GY, Agdzhoyan AT, Agdzhoyan AT, Pylev VY, Balanovska EV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

15

Особенности генотипической резистентности к фторхинолонам у *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Российской Федерации

С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова, Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева, А. Эргешов

The nature of genotypic resistance to fluoroquinolones in *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Russian Federation

Andreevskaya SN, Smirnova TG, Chernousova LN, Larionova EE, Kiseleva EA, Ergeshov A

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

23

Комбинированное воздействие бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков на клинические изоляты *Staphylococcus aureus*

Н. К. Абдраймова, М. А. Корниенко, Д. А. Беспярых, Н. С. Купцов, Р. Б. Городничев, Е. А. Шитиков

Combined effects of bacteriophage vB_SauM-515A1 and antibiotics on the *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Abdraimova NK, Kornienko MA, Bespiatykh DA, Kuptsov NS, Gorodnichev RB, Shitikov EA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

31

Геногеография в России и мире SNP-маркеров гена *LZTFL1*, ассоциированных с тяжелым течением COVID-19

Е. В. Балановская, И. О. Горин, В. С. Петрушенко, Д. К. Черневский, С. М. Кошель, И. И. Темирбулатов, В. Ю. Пылёв, А. Т. Агджоян

Geographic distribution of the *LZTFL1* SNP markers associated with severe COVID-19 in Russia and worldwide

Balanovska EV, Gorin IO, Petrushenko VS, Chernevsky DK, Koshel SM, Temirbulatov II, Pylev VYu, Agdzhoyan AT

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

41

Антифосфолипидные антитела и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с COVID-19 в анамнезе

Д. М. Ермакова, Н. В. Долгушина, И. В. Менжинская, Н. А. Ломова, В. В. Вторушина

Antiphospholipid antibodies and outcomes of assisted reproductive technology programs in patients with a history of COVID-19

Erakova DM, Dolgushina NV, Menzhinskaya IV, Lomova NA, Vtorushina VV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

48

Влияние гормонального статуса на сексуальную активность женщин репродуктивного возраста с бесплодием

А. А. Гависова, Н. Н. Стеньяева, Ж. Р. Гарданова, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина

Changes in sexual functioning in women of reproductive age with infertility and diminished ovarian reserve

Gavisova AA, Stenyaeva NN, Gardanova ZR, Nazarenko TA, Dolgushina NV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

53

Сравнительная оценка RMI-IV и RMI-V при дооперационном прогнозировании характера опухолей яичников у беременных

А. А. Герасимова, Ю. В. Шевченко, П. А. Клименко, Л. А. Ашрафян

Comparative assessment of RMI-IV and RMI-V in preoperative prediction of ovarian tumor type in pregnant women

Gerasimova AA, Chevchenko UV, Klimenko PA, Asyrafyan LA

МЕТОД

60

Методика определения метаболомного профиля опухолеассоциированных макрофагов и моноцитов при онкологических заболеваниях

В. Е. Франкевич, А. В. Новоселова, Н. Л. Стародубцева, М. Р. Патышева, И. В. Ларионова, М. А. Ракина, О. Д. Брагина, Ю. Г. Кжышковска

Methodology of determining the metabolomic profile of tumor-associated macrophages and monocytes in oncological diseases

Frankovich VE, Novoselova AV, Starodubtseva NL, Patysheva MR, Larionova IV, Rakina MA, Bragina OD, Kzhyshkowska JG

Частая ассоциация витилиго с эндокринными аутоиммунными заболеваниями: первичные данные в российской когорте взрослых пациентов

Н. Ф. Нуралиева, М. Ю. Юкина, Е. А. Трошина, О. В. Жукова, В. А. Петров, В. А. Волнухин

Frequent association of vitiligo with autoimmune endocrine diseases: primary data of the Russian cohort of adult patients

Nuralieva NF, Yukina MYu, Troshina EA, Zhukova OV, Petrov VA, Volnukhin VA

Тромбоз вен нижних конечностей и его последствия в восстановительном периоде инсульта

Е. В. Орлова, А. Б. Бердалин, В. Г. Лелюк

Lower extremity vein thrombosis and its consequences in stroke recovery period

Orlova EV, Berdalin AB, Lelyuk VG

Влияние нейропсихологического статуса на особенности схемы тела при нарушении пищевого поведения

И. В. Запесоцкая, М. В. Сокольская, Т. Н. Разуваева, С. Л. Борисова

Influence of neuropsychological status on body schema in eating disorders

Zapesotskaya IV, Sokolyskaya MV, Razuvaeva TN, Borisova SL

СВОЕОБРАЗИЕ ПОМОРОВ ОНЕЖСКОГО ПОЛУОСТРОВА И ЗИМНЕГО БЕРЕГА В ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОНТЕКСТЕ СЕВЕРА ЕВРОПЫ

В. С. Окованцев¹✉, Г. Ю. Пономарев¹, А. Т. Агджоян¹, А. Т. Агджоян¹, В. Ю. Пылёв^{1,2}, Е. В. Балановская^{1,2}¹ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия² Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

Своеобразие генофонда Русского Севера, давно став научным фактом, так и не получило содержательного объяснения. Резкие генетические отличия северных русских популяций не только от южных, но и друг от друга, нельзя объяснить лишь дрейфом генов. Расширение спектра изученных генофондов Русского Севера и их соседей может дать ключ к разгадке этого феномена. Целью работы было субтотальное исследование генофонда поморов Архангельской области (Онежского берега, Летнего берега, западного фрагмента Зимнего берега; $n = 130$) по панели 60 SNP-маркеров Y-хромосомы методами многомерного шкалирования и картографирования генетических расстояний. Популяции поморов резко различаются по частотам 14 выявленных гаплогрупп: каждая из гаплогрупп I1, R1a, N3 составляет по четверти общего генофонда поморов, по 8% I2-P37.2 и R1b, остальные гаплогруппы редки. Поморы Онежского берега оказались генетически схожими с широким кругом финноязычных народов Северо-Восточной Европы и тех русских популяций, у которых есть мощный дославянский субстрат. Поморы Летнего берега близки к генофондам Скандинавии. Поморы Зимнего берега схожи лишь с единичными популяциями финнов и шведов. Ни одна из популяций поморов не имеет генетического сходства с населением Новгородчины, с которым традиционно связывают происхождение поморов. Генетические расстояния между популяциями поморов настолько велики, что сопоставимы с общим размахом изменчивости между восточными славянами, балтами и финно-уграми региона. Причиной столь ярко выраженного своеобразия популяций поморов наряду с дрейфом генов предположительно можно назвать разный дославянский субстрат, лежащий в основе генофонда каждой популяции, а также более поздние потоки генов.

Ключевые слова: генофонд, геногеография, Y-хромосома, Y-SNP, Русский Север, поморы, Фенноскандия

Финансирование: исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ №20-09-00479_а (экспедиционное обследование, статистический анализ, генотипирование), РНФ №21-14-00363 (экспедиционное обследование, пробоподготовка, написание статьи), Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. академика Н. П. Бочкова (картографический анализ, интерпретация результатов).

Благодарности: авторы благодарят всех участников экспедиционного обследования (доноров образцов), Администрацию и Министерство здравоохранения Архангельской области — за организационную поддержку и содействие в проведении экспедиционного обследования, АНО «Биобанк Северной Евразии» — за предоставление коллекций ДНК.

Вклад авторов: Е. В. Балановская — руководство, остальные авторы — участники экспедиционного обследования поморов; Г. Ю. Пономарев, В. Ю. Пылёв — генотипирование Y-SNP маркеров; Анастасия Т. Агджоян, В. С. Окованцев, Анна Т. Агджоян — статистический и картографический анализ; Е. В. Балановская, Анастасия Т. Агджоян и В. С. Окованцев — дизайн исследования и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра имени Н. П. Бочкова (протокол № 1 от 29 июня 2020 г.).

✉ Для корреспонденции: Владимир Сергеевич Окованцев
ул. Москорецье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; vovaokov@yandex.ru

Статья получена: 11.09.2022 Статья принята к печати: 25.09.2022 Опубликовано онлайн: 30.09.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.046

PECULIARITY OF POMORS OF ONEGA PENINSULA AND WINTER COAST IN THE GENETIC CONTEXT OF NORTHERN EUROPE

Okovantsev VS¹✉, Ponomarev GY¹, Agdzhoyan AT¹, Agdzhoyan AT¹, Pylev VY^{1,2}, Balanovska EV^{1,2}¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia² Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

The peculiarity of the Russian North gene pool has long become scientific fact, but has yet to receive informative explanation. Genetic drift cannot be the only contributing factor in the striking genetic differences between not only northern Russian populations and the southern ones, but among individual northern populations as well. Studying Russian North gene pools previously underrepresented in scientific literature may help understand this phenomenon. The work aimed to perform a subtotal study of the gene pool of the Arkhangelsk Oblast Pomors (Onega Coast, Summer Coast, the western fragment of the Winter Coast; $n = 130$) using a panel of 60 Y-chromosome SNP markers through multidimensional scaling and mapping of genetic distances. The frequencies of 14 identified haplogroups differ drastically in Pomor populations: haplogroups I1, R1a, and N3 each comprise a quarter of the total Pomor gene pool, I2-P37.2, and R1b each comprise about 8%, and the rest of the haplogroups are rare. The Onega Coast Pomors showed genetic similarity to a wide range of North-Eastern Europe Finnic-speaking populations, as well as to Russian populations with a strong pre-Slavic substratum. The Summer Coast Pomors are close to the Scandinavian gene pools, and the Winter Coast Pomors are similar only to specific Finn and Swede populations. None of the Pomor populations demonstrate genetic similarity with the Novgorod Oblast Russian populations, with which the origin of the Pomors is traditionally associated. The genetic distances between Pomor populations are so great, they are comparable to the general range of variability between the Eastern Slavic, Baltic, and Finno-Ugric peoples of the region. The reasons for such pronounced originality of Pomor populations presumably include, along with genetic drift, the gene pool of each population being underlied by a different pre-Slavic substrate, with later gene flows as an additional factor.

Keywords: gene pool, gene geography, Y-chromosome, Y-SNP, Russian North, Pomors, Fennoscandia

Funding: The study was supported by grants from the Russian Foundation for Basic Research № 20-09-00479_а (field survey, statistical analysis, genotyping), Russian Science Foundation № 21-14-00363 (field survey, sample preparation, article writing), State task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics (cartographic analysis, result interpretation).

Acknowledgements: the authors thank all participants of the expedition survey (sample donors), the Administration and the Ministry of Health of the Arkhangelsk Oblast for organizational support and assistance in conducting the expedition survey, and the Biobank of North Eurasia for the access to DNA collections.

Author contribution: Balanovska EV — leadership of the expedition survey of Pomors; Okovantsev VS, Ponomarev GY, Agdzhoyan Anastasia T, Agdzhoyan Anna T, Pylev VY — expedition survey of Pomors; Ponomarev GY, Pylev VY — genotyping of Y-SNP markers; Agdzhoyan Anastasia T, Okovantsev VS, Agdzhoyan Anna T — statistical analysis, cartographic analysis; Balanovska EV, Agdzhoyan Anastasia T, Okovantsev VS — study design, article writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical review board of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Centre for Medical Genetics» (protocol № 1 of 29 June 2020).

✉ Correspondence should be addressed: Vladimir S. Okovantsev
Moskvorechye, 1, 115522, Moscow, Russia; vovaokov@yandex.ru

Received: 11.09.2022 Accepted: 25.09.2022 Published online: 30.09.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.046

Изучение генетической истории русского народа охватывает все более широкий круг как русских популяций, так и их соседей [1–18]. На возникающей панораме ярко выделяется «белое пятно» — самые северные русские популяции Беломорья, поморы. Их изучение важно не только в качестве модели эволюции популяций на самой периферии этнического ареала. Дело в том, что Беломорская периферия крайне своеобразна: вся жизнь поморов, связанная с морем, формировала не только особый быт, но и особые пути взаимодействия с населением Северной и Северо-Восточной Европы.

Беломорскими поморами называли русских побережья Белого моря, которые промышляли охотой на морского зверя, рыболовством в открытом море, морской торговлей, отличались многими особенностями быта и сохранением черт древнерусской культуры [19]. С новгородской (верховой) колонизацией связаны первые упоминания о постоянных русских поселениях на беломорском побережье в конце XIII — начале XIV в. [20–22]. Согласно летописям, переселенцы встретили на этих землях финноязычное население — племена чуди заволочской, часто ассоциирующейся с вепсами. Но заселение региона началось в мезолите, т. е. около 8 тыс. лет назад. В неолите фиксируют следы двух близких археологических культур — каргопольской и беломорской. Новую волну пришлого населения в эпоху бронзы (4–3 тыс. лет назад) связывают с финно-угорским населением (прежде всего, с саамским [23–28]), а последнюю славянскую волну мигрантов — с Новгородской колонизацией северных пределов.

Жизнь на северной периферии ареала русского народа (где в топонимике прочно сохранились следы дославянского населения), своеобразие культуры и особый тип хозяйства поморов позволяют предполагать, что они имели и своеобразный генофонд. Лишь небольшая выборка поморов ($n = 28$) была изучена ранее по крайне узким панелям маркеров Y-хромосомы и мтДНК [1, 2]. Исследователи рассматривали поморов в составе популяции «северных русских» в широком контексте населения Северной Евразии [1]. Особенности их генофонда объяснены возможной ассимиляцией урало- или балтоязычного населения славянским [2]. На сходство с финноязычным населением (причем больше с финно-пермским, чем с финно-волжским) указывают данные об аутосомном геноме поморов Мезенского района Архангельской области ($n = 96$) [3].

Более широкий круг популяций, а именно генофонд Русского Севера, охарактеризован по четырем системам маркеров (Y-хромосомы, мтДНК, аутосомных ДНК-маркеров и частот фамилий). В анализ включены популяции Пинежского, Лешуконского, Красноборского и Ленского районов Архангельской области [4], масштаб генетического своеобразие которых показан ранее [5]. По мтДНК и аутосомным ДНК-маркерам эти популяции сближаются с населением Северной Европы. Разнообразие «отцовских» линий выявляет сходство генофонда Русского Севера с населением обширной территории от Прибалтики до Печоры и обусловлено наследием древнейшего палеоевропейского населения. Геномные данные об этих популяциях были привлечены для анализа генетической истории балто-славянских народов. На картах генетических расстояний популяции Русского Севера формируют один из основных паттернов генофонда Европы [7]. Поиск генетических следов новгородской колонизации в генофонде Русского Севера, проведенный по широкогеномной панели аутосомного

генома [8], показал отсутствие «новгородской» предковой компоненты на севере Архангельской области, а на ее юге (Красноборский и Ленский районы) вклад «новгородской» компоненты составил не более трети генофонда.

Даже столь краткий обзор изученности генофонда Русского Севера выявляет серьезную нехватку данных о его самой северной периферии: описаны либо «материковые» популяции Архангельской области, либо маленькая выборка поморов по столь узкой панели, которая несопоставима с современным спектром ДНК-маркеров.

Новые данные о генофонде популяций поморов, изученном по обширной панели маркеров, могут дать ключ к пониманию огромного генетического разнообразия и своеобразие популяций Русского Севера [4, 5, 7]. С учетом традиции патрилокальности у поморов [23] и высокой эффективности изучения «отцовских линий» [1, 9–11], целью данной работы было рассмотреть полиморфизм маркеров Y-хромосомы для решения двух задач: создания «генетических портретов» трех впервые изученных популяций поморов и поиска в их генофонде генетических следов новгородской колонизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Коренное население побережья Белого моря детально изучено по современной панели маркеров Y-хромосомы (рис. 1). В ходе экспедиции 2021 г. субтотально обследованы населенные пункты Онежского полуострова (Онежский берег и Летний берег) и западного (Онежского) фрагмента Зимнего берега (рис. 1) (далее для краткости все популяции условно именуются «онежскими поморами»). Обследование проводили субтотально: образцы крови брали в селениях с компактным проживанием поморов практически у всех мужчин, соответствующих критериям включения в исследование: в выборку включали только тех неродственных между собой индивидов, чьи предки до третьего поколения принадлежали к данной популяции и считали себя русскими (или поморами). Для сравнения с популяциями коренного населения севера Европы привлечены литературная информация и неопубликованные данные АНО «Биобанк Северной Евразии».

Генотипирование

Тотальную ДНК выделяли из образцов венозной крови методом магнитных частиц на автоматизированной установке QIAAsymphony (QIAGEN; Нидерланды). Генотипирование проводили по панели 60 Y-SNP маркеров методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов и технологии OpenArray на амплификаторе QuantStudio 12 Flex (Thermo Fisher Scientific; США): D-M174, E-M35, E-M78, C-M217, C-F3791, C-F5481, C-F3918, C-M48, C-SK1066, C-M407, G-M201, G1-M285, G2-P15, G2-FGC595, G2-M406, G2-P303, H-M69, I-M170, I-M253, I-P37.2, I-M223, J1-M267, J1-P58, J2-M172, J2-M12, J2-M67, J2-M9, L-M20, L-M317, T-M70, N-M231, N-M128, N-Y3205, N-M178, N-B211, N-M2118, N-CST10760, N-Z1936, N-F4205, N-B202, N-B479, O-P186, O-M119, O-P31, O-M122, O-P201, O-M134, Q-M242, R1a-M198, R1a-PF6202, R1a-Y2395, R1a-CTS1211, R1a-Z92, R1a-Z93, R1b-M343, R1b-Y13887, R1b-M269, R1b-L51, R1b-Z2105, R2-M124.

А



Б

Популяция	Объем выборки N	Населенные пункты	Район Архангельской области
Зимний берег ★	38	Верхняя Золотица, Нижняя Золотица, Патракеевка	Приморский район
Летний берег ★	45	Луда, Уна, Пертоминск, Яреньга, Лопшеньга, Летняя Золотица	Приморский район
Онежский берег ★	47	Лямца, Пурнема, Нижмозеро, Кянда, Тамица, Покровское, Пушлахта	Онежский, Приморский районы
Общая выборка	130	16 населенных пунктов	2 района

Рис. 1. Расположение изученных групп в системе популяций поморов. **А.** Традиционные поселения поморов на берегах Белого моря и места рождения предков по отцовской линии участников обследования. **Б.** Населенные пункты Архангельской области, где проводили обследование. (Источник карты на рис. А: <http://lexicon.dobrohot.org/images/c5/00133909.jpg>)

Статистический и картографический анализ

По данным о частотах 14 гаплогрупп Y-хромосомы, выявленных в трех популяциях поморов, рассчитывали матрицу попарных генетических расстояний М. Нея (в оригинальной программе DJ [5]), на основе которых построен график многомерного шкалирования в пакете Statistica 7.0. (StatSoft; CША). Картографический анализ проводили с помощью оригинального программного пакета GeneGeo [29] по расширенному спектру 26 гаплогрупп Y-хромосомы, характерных для региона. Карты распространения 26 гаплогрупп строили по частотам из базы данных «Y-base» (разработанной под руководством О. П. Балановского) методом средневзвешенной интерполяции с радиусом влияния 800 км и третьей степенью весовой функции [29]. Алгоритм построения каждой карты генетических расстояний включал два этапа. На первом этапе для каждой из 26 гаплогрупп строили карту генетических расстояний от данной популяции поморов до интерполированных значений в каждой точке карты. На втором этапе по совокупности этих 26 карт рассчитывали средние генетические расстояния от данной популяции поморов до каждой точки карты. В результате для каждой популяции онежских поморов была создана карта, где показана степень генетического сходства изученной популяции поморов с каждой из популяций сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектр гаплогрупп Y-хромосомы

В генофондах трех популяций онежских поморов обнаружено 14 гаплогрупп Y-хромосомы (рис. 2): E-M78, I1-M253, I2-P37.2, I2-M223, J2-M92, J2-M67, N2a-Y3205, N3a3-CST10760, N3a4-Z1936, R1a-PF6202, R1a-CTS1211, R1a-Z92, R1b-L51, T1a-M70 (далее указаны краткие названия этих гаплогрупп). Самыми частыми оказались гаплогруппы I1, N3 и R1a, каждая из которых составляет около четверти общего генофонда онежских поморов (рис. 2). Гаплогруппа R1a представлена тремя ветвями (PF6202, CTS1211, Z92), гаплогруппа N3 — двумя (CST10760, Z1936). Следующими по убыванию частоты следуют гаплогруппы I2-P37.2 и R1b (по 8% генофонда в целом), остальные редки.

Вопреки географической близости трех популяций поморов (80–170 км; таблица), их генетические портреты заметно различаются, причем по четырем гаплогруппам (I2, N3a4, R1a, R1b) эти различия достоверны. Хотя у каждой из трех популяций поморов присутствуют не менее девяти гаплогрупп их «общего портрета», спектр гаплогрупп каждой популяции очень своеобразен. У поморов Зимнего берега снижена частота гаплогруппы N3a4 и повышена частота I2; в популяции Летнего берега не обнаружена гаплогруппа R1a-PF6202, характерная

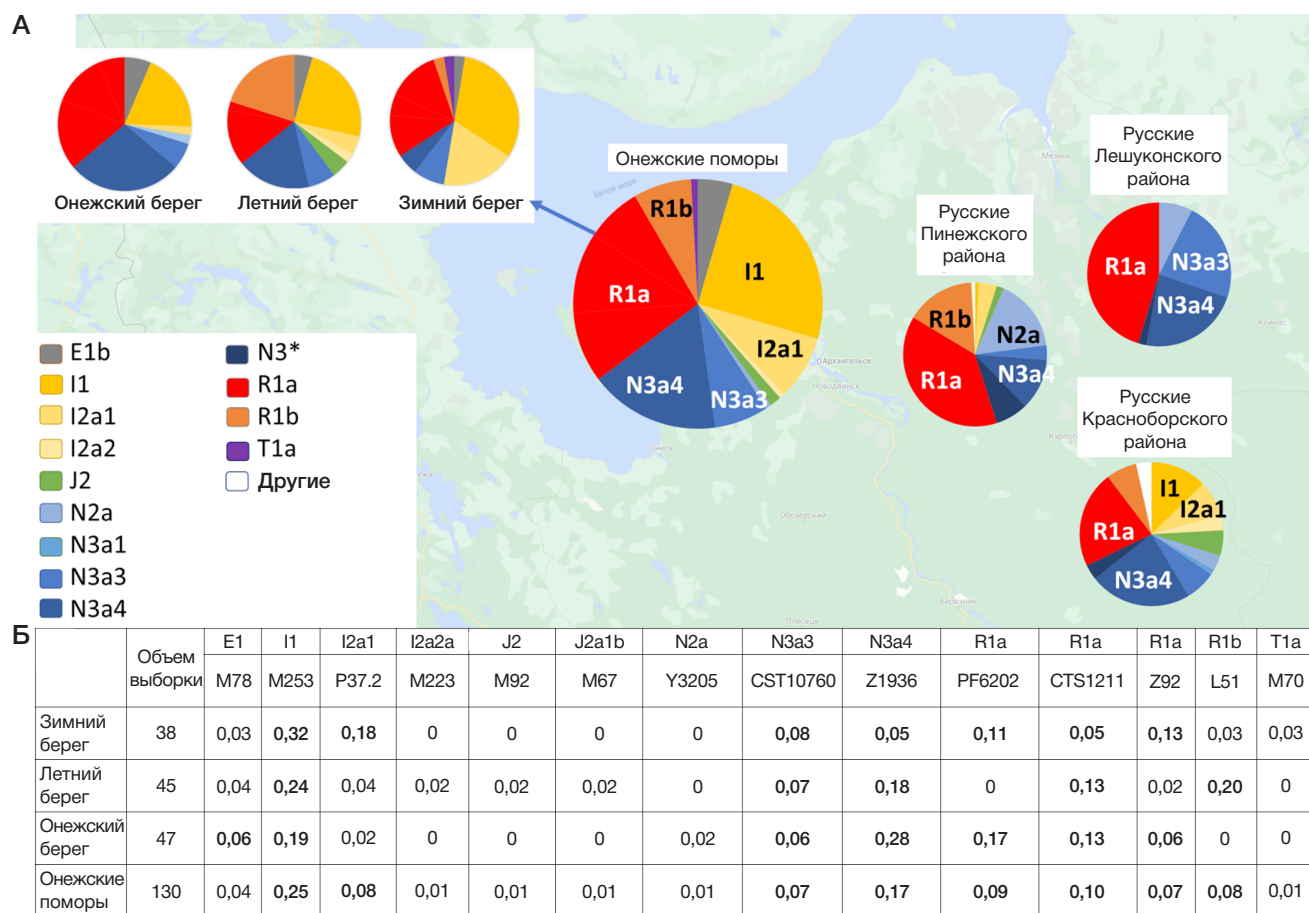


Рис. 2. Спектр гаплогрупп Y-хромосомы в изученных популяциях Архангельской области. **А.** Доли основных гаплогрупп в генофонде Русского Севера. В выборку из Красноборского района ($n = 81$) включены также образцы из соседнего Ленского района ($n = 8$), поскольку ранее была показана близость их генофондов [5]. **Б.** Частоты гаплогрупп Y-хромосомы (с подразделением основных на ветви) в популяциях онежских поморов. В верхней строке таблицы приведены краткие названия гаплогрупп Y-хромосомы, во второй строке — соответствующих SNP-маркеров. Частоты гаплогрупп, выделенные жирным шрифтом, соответствуют критерию 5% уровня полиморфизма

для двух других популяций, но повышена частота R1b; в популяции Онежского берега высока частота N3a4, но низка I2 (рис. 2).

Прослеживаются убывание доли гаплогрупп I1 и I2a с востока (Зимний берег) на запад (Онежский берег) и противоположный тренд у гаплогрупп N3a3 и N3a4. Но такой «долготный» тренд отсутствует у гаплогрупп R1a (частота повышена в популяциях Зимнего и Онежского берегов) и R1b (максимум на Летнем берегу). Частота гаплогруппы R1a не только высока в генофондах Зимнего (29%) и Онежского берегов (36%), но и все три ветви R1a здесь встречены с частотой $\geq 5\%$. Однако на Летнем берегу частота R1a в два раза ниже и обнаружены только ветви R1a-CTS1211 (13%) и R1a-Z92 (2%). Снижение частоты гаплогруппы R1a и резкое возрастание частоты R1b (20%) только в популяции Летнего берега могут быть результатом дрейфа генов, и их миграционного потока. Высока частота R1b и у русских Пинежского района Архангельской области (рис. 2), но там распространена иная ветвь R1b. У поморов обнаружена ветвь L51, более характерная для народов Северо-Западной, чем Северо-Восточной Европы, и для установления ее источника (миграция или сохранение древнейшего генетического ландшафта региона) необходимо использование филогенетических подходов.

С другими русскими популяциями Архангельской области онежские поморы наиболее схожи по заметной роли гаплогрупп R1a и N3a4 (хотя в популяции Зимнего берега N3a4 редка). Резкое отличие «прибрежных»

поморов от «материковых» популяций Архангельской области проявляется по частоте гаплогруппы I1: у онежских поморов она составляет в среднем четверть генофонда (25%), но для других северных русских не характерна (в Красноборской популяции — 12%, в Пинежской — 1%, в Лешуконской не обнаружена).

Положение онежских поморов в генетическом пространстве Северной Европы

При анализе степени генетического сходства (таблица) прежде всего удивляет, сколь велики генетические расстояния между популяциями поморов ($d = 0,28$) вопреки их географической близости и культурной общности. Более того, расстояние от онежских поморов до других русских популяций почти в три раза больше ($d = 0,76$), но есть и очень выразительные исключения (таблица). Наиболее близкой к генофонду онежских поморов ($d = 0,29$) оказалась географически удаленная популяция (около 500 км) русских Красноборского и Ленского районов Архангельской области. При этом она чрезвычайно близка лишь к поморам Онежского берега ($d = 0,15$), но генетически далека от Летнего ($d = 0,33$) и Зимнего ($d = 0,38$) берегов.

Из других русских популяций относительное генетическое сходство с поморами обнаруживают лишь русские Костромской области ($d = 0,50$) и популяция Мологи Ярославской области ($d = 0,63$). При этом к генофонду Мологи близки только поморы Онежского берега ($d = 0,17$),

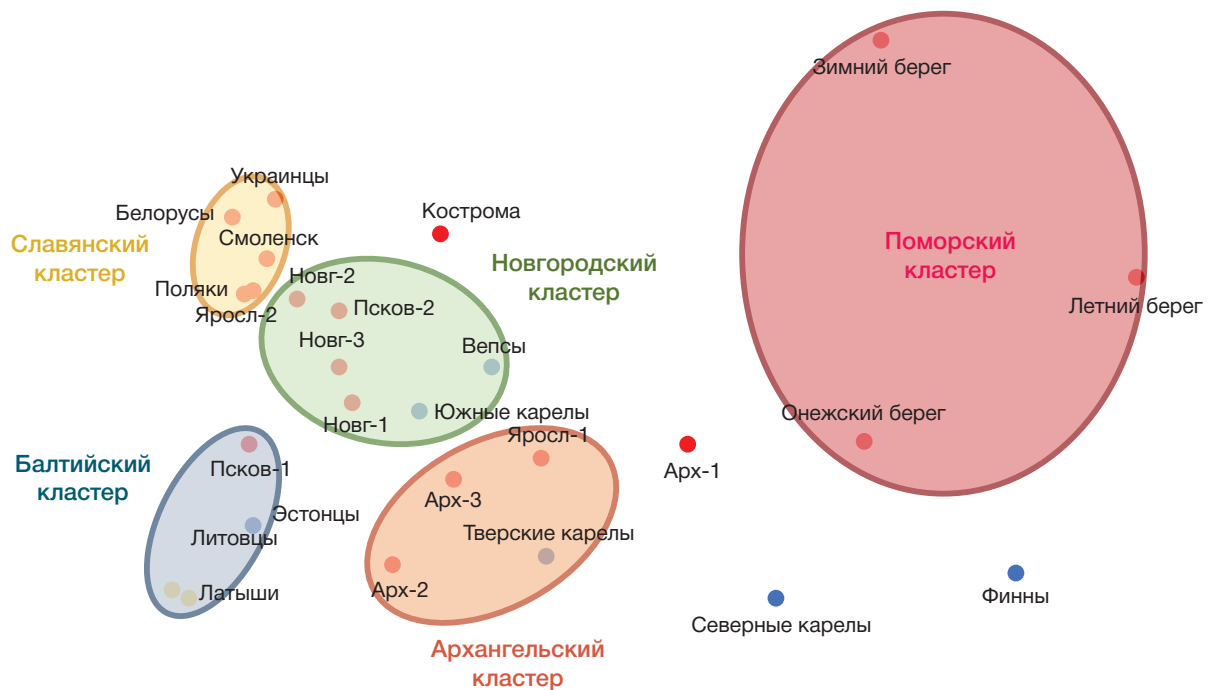


Рис. 3. Положение генофонда поморов в генетическом пространстве Северо-Восточной Европы. График многомерного шкалирования построен по частотам 15 гаплогрупп Y-хромосомы, показатель алиенации — 0,13; показатель стресса — 0,11. Цвета популяций указывают на их языковую принадлежность: славянские народы (красный), балтийские народы (желтый), финноугорские народы (синий). Названия русских популяций расшифрованы в таблице

в то время как генофонды Летнего и Зимнего от нее крайне далеки ($d = 0,85$). Ранее было показано, что среди ярославских популяций именно Молога сохранила явный генетический след дославянского населения (предположительно мери) [9].

Среди иных народов России к онежским поморам наиболее генетически близки вепсы ($d = 0,43$) и северные карелы ($d = 0,46$), причем вновь лишь за счет поморов Онежского берега ($d = 0,23$ и $d = 0,12$ соответственно). Оказывается, что поморы Онежского берега генетически ближе к финноязычным соседям, чем к другим популяциям поморов ($d = 0,28$). А вот представители восточного крыла финноязычных народов — удмурты — оказались самыми генетически далекими от поморов ($d = 2,50$), что противоречит выводу [3] о сходстве генофонда поморов и финно-пермских народов.

Однако наибольшее генетическое сходство онежские поморы обнаруживают с народами зарубежной Северной Европы (таблица): генетическое расстояние от поморов до шведов и финнов ($d = 0,28$) такое же, как среднее расстояние между популяциями поморов ($d = 0,28$), а расстояние до генофонда саамов в два раза меньше ($d = 0,14$). Причем прослеживается любопытный тренд: расстояние до генофондов финнов и саамов уменьшается в четыре раза по мере движения на запад — от Зимнего берега к Онежскому. Но генетические расстояния до скандинавов (датчан, норвежцев, шведов) следуют противоположному тренду: расстояние до Онежского берега в два раза больше, чем до Летнего и Зимнего, которые одинаково близки к скандинавам. При этом, если поморы Зимнего берега близки лишь к скандинавам из всего пула рассмотренных популяций, то поморы Летнего берега обнаруживают определенное генетическое сходство также и с широким кругом европейских популяций — от немцев ($d = 0,36$) до ирландцев ($d = 0,65$).

В генетическом пространстве многомерного шкалирования (рис. 3) (график построен по 14 «поморским» гаплогруппам Y-хромосомы) выделяются пять кластеров

(им даны весьма условные названия); для каждого рассчитаны средние расстояния между популяциями (\bar{d}). «Славянский» кластер ($\bar{d} = 0,05$) включил белорусов, украинцев, поляков и русских Смоленской и Ярославской областей. К нему близок «Новгородский» кластер ($\bar{d} = 0,06$), объединивший все три популяции Новгородской области и Порхов Псковской области, который входил в Новгородские земли. К ним присоединились также финноязычные популяции — вепсы и южные карелы. «Прибалтийский» кластер ($\bar{d} = 0,04$) включил всех прибалтов: латышей, литовцев и эстонцев, а также популяцию Псковской области (Остров). «Архангельский» кластер ($\bar{d} = 0,09$) объединил популяции Пинежского и Лешуконского районов Архангельской области с Мологой Ярославской области и тверскими карелами.

Поморы образовали свой собственный обширный кластер — расстояния между популяциями поморов ($\bar{d} = 0,28$) почти в пять раз больше, чем среднее расстояние в пределах других кластеров ($\bar{d} = 0,06$), а площадь «Поморского» кластера лишь немногим меньше суммы всех четырех кластеров групп сравнения, включивших финноязычные, балтоязычные и славянские популяции. Но подчеркнем, что при столь огромных различиях между поморскими популяциями все они заняли свое собственное «поморское» место в генетическом пространстве Северо-Восточной Европы.

Более точно определить регионы, с которыми схожи генофонды поморов, и значительно расширить круг популяций сравнения помогают карты генетических расстояний (рис. 4), рассчитанные по 26 гаплогруппам Y-хромосомы, характерным для всего региона.

Суммарный генофонд поморов (рис. 4А) генетически близок к южной части Финляндии, а не более северной, представленной саамами.

Генофонд Онежского берега (рис. 4Б) выявляет обширную область генетического сходства: она охватывает почти всю Финляндию на западе, с востока четко очерчена Северной Двиной и Сухоной, на юге и юго-западе России

Таблица. Генетические и географические расстояния между онежскими поморами и популяциями сравнения

Популяция	Онежские поморы			
	Среднее	Зимний берег	Летний берег	Онежский берег
Онежские поморы суммарно	0,09	0,09	0,08	0,1
Поморы Зимнего берега	0,19	0	0,25	0,32
Поморы Летнего берега	0,17	0,25	0	0,27
Поморы Онежского берега	0,20	0,32	0,27	0
Русские Архангельской области № 1. Красноборский и Ленский районы	0,29	0,38	0,35	0,15
Русские Архангельской области № 2. Лешуконский район	0,97	1,1	1,36	0,44
Русские Архангельской области № 3. Пинежский район	0,86	1,07	1,02	0,49
Русские Новгородской области № 1. Анциферово	0,73	0,72	1,06	0,4
Русские Новгородской области № 2. Кабожа	0,88	0,88	1,15	0,61
Русские Новгородской области № 3. Любытино	0,72	0,65	1,08	0,42
Русские Псковской области № 1. Остров	0,90	0,71	1,36	0,64
Русские Псковской области № 2. Порхов	0,82	0,74	1,26	0,47
Русские Ярославской области № 1. Молога	0,63	0,86	0,85	0,17
Русские Ярославской области № 2. Разные районы	1,02	0,82	1,63	0,61
Русские Костромской области	0,50	0,47	0,64	0,4
Русские Смоленской области	0,84	0,72	1,18	0,62
Карелы северные	0,46	0,72	0,53	0,12
Карелы южные	0,80	0,92	1,16	0,33
Карелы тверские	0,64	0,86	0,88	0,17
Вепсы	0,43	0,41	0,65	0,23
Эстонцы	0,71	0,57	1	0,56
Латыши	0,99	0,89	1,25	0,82
Литовцы	1,06	0,89	1,47	0,82
Удмурты северные	1,71	1,73	2,01	1,38
Удмурты центральные	2,93	3,23	2,42	3,14
Удмурты южные	2,88	3,06	2,93	2,65
Белорусы	1,07	0,76	1,64	0,8
Украинцы	0,93	0,65	1,35	0,78
Поляки	1,05	0,85	1,53	0,76
Финны	0,28	0,45	0,25	0,14
Саамы	0,17	0,19	0,19	0,13
Шведы*	0,28	0,20	0,19	0,45
Норвежцы*	0,50	0,40	0,39	0,71
Датчане	0,52	0,46	0,23	0,86
Немцы*	0,75	0,77	0,36	1,13
Англичане	1,30	1,37	0,47	2,05
Ирландцы	1,63	1,73	0,58	2,57
Французы	1,45	1,65	0,58	2,11
Географические расстояния между популяциями (км)		Зимний берег	Летний берег	Онежский берег
Поморы Зимнего берега	–	0	120	170
Поморы Летнего берега	–	120	0	80
Поморы Онежского берега	–	170	80	0

Примечание: зеленые тона указывают на максимальную генетическую близость, красные — на генетическое несходство популяций; номера (№) популяций соответствуют № на графике многомерного шкалирования; * — расстояние до популяций измерялось по частотам 11 гаплогрупп.

доходит до Ярославской и Ленинградской областей. В эту область схождения входят и финноязычные народы (вепсы, ижора, ингерманландцы, карелы, финны), и те русские популяции, в генофонде которых прослеживается существенный вклад дославянского населения.

Генофонд Летнего берега (рис. 4В) обнаружил наибольшее сходство с далекими шведами и норвежцами,

слабее оно выражено с саамами, представляющими самый север Скандинавии.

Генофонд Зимнего берега (рис. 4Г) относительно генетически близок лишь к нескольким популяциям финнов и шведов. Это единственная популяция поморов, для которой можно допустить, что ее генетический портрет в значительной степени сформирован дрейфом генов.

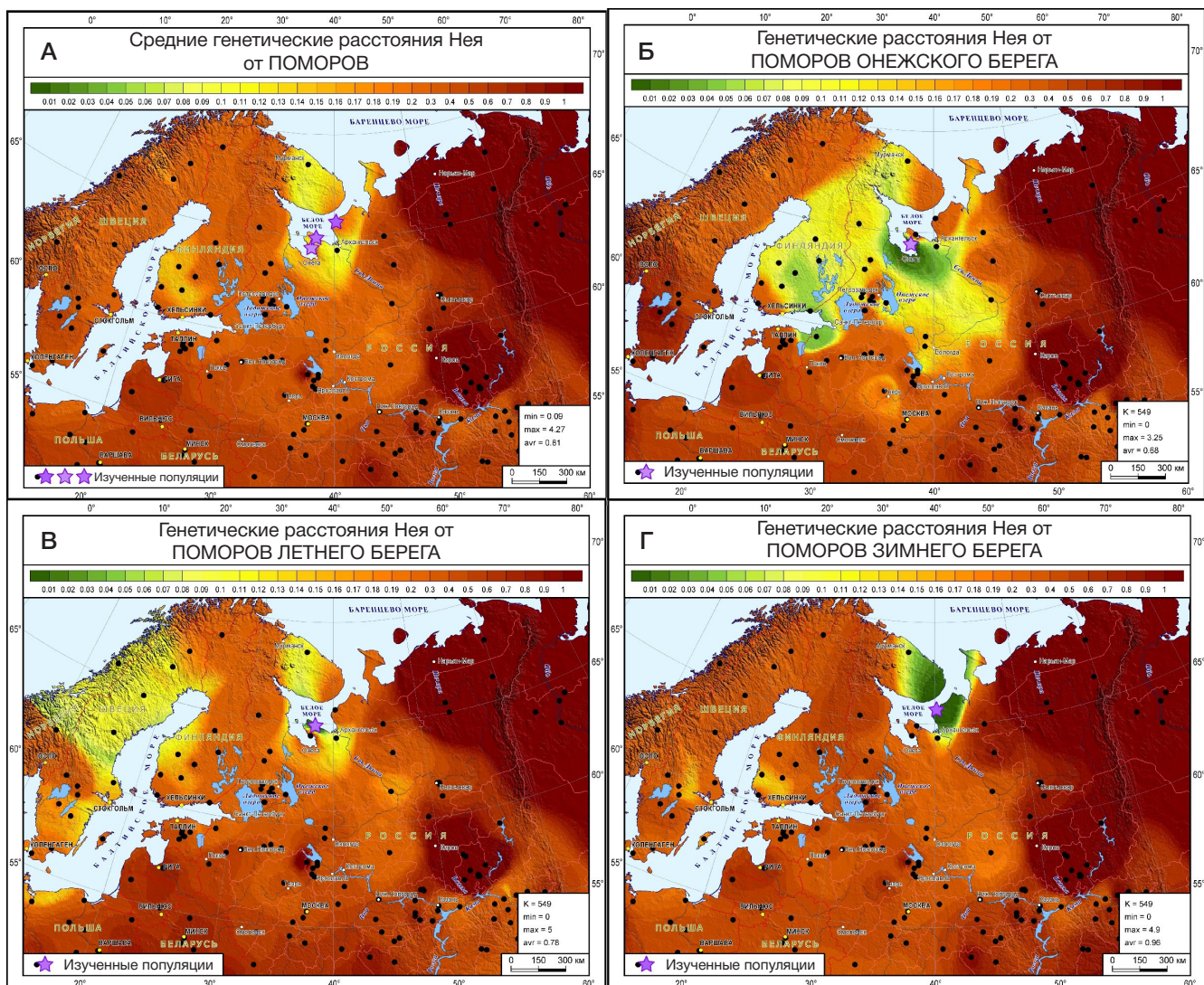


Рис. 4. Карты генетических расстояний Невы от трех популяций онежских поморов. **А.** Общая (средняя трех карт отдельных популяций). **Б.** Онежский берег. **В.** Летний берег. **Г.** Зимний берег. Популяция, от которой рассчитываются расстояния, отмечена звездочкой. Зеленые и желтые тона отражают минимальные расстояния до популяции, красно-коричневые — максимальные

Однако популяция Зимнего берега пока представлена лишь ее «прионежской» частью (рис. 1). Сейчас ведется изучение генофонда всего Зимнего берега, что позволит вскоре дать обоснованное заключение о его генетической истории.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Все три рассмотренные популяции поморов не только географически близки (рис. 1): их хозяйственно-культурный тип, в отличие от оседлых земледельцев, предполагает передвижения по морю на большие расстояния. Поэтому разумно было предполагать, что различия между их генофондами будут крайне невелики. При экспедиционном обследовании ставилась задача сформировать субтотальную выборку, чтобы уловить даже незначительные генетические различия между тремя поморскими берегами: были обследованы все поселения с компактным проживанием онежских поморов (рис. 1). И хотя анализируемые выборки невелики (37–48 человек), они надежны, так как репрезентативно представляют генеральную совокупность благодаря субтотальности обследования и отражают реальность, а не выборочную ошибку. Даже при столь небольших выборках различия по

четырем гаплогруппам (I2, N3a4, R1a, R1b) из 14 выявленных оказались достоверны, хотя этот вид анализа основан на предположении, что выборки сделаны из бесконечной генеральной совокупности индивидов. Поэтому анализ достоверности различий неприменим к субтотальным исследованиям малых популяций: именно субтотальные выборки дают наиболее точный портрет популяции и не требуют дополнительной оценки достоверности различий.

Вопреки изложенным выше ожиданиям оказалось, что каждая из трех поморских популяций имеет ярко выраженный уникальный генетический портрет. Поморы Онежского берега генетически близки и к финноязычным народам России и Финляндии, и к русским популяциям Архангельской области. Более того, они генетически ближе к финноязычным соседям, чем к другим онежским поморам. У поморов Летнего берега обнаружено генетическое сходство только с населением Скандинавии. Наконец, у поморов Зимнего берега практически нет схожих генофондов, за исключением некоторой близости к финнам и шведам. Различия между тремя популяциями поморов столь велики, что лишь немногим уступают всей совокупности различий между рассмотренными популяциями (рис. 3) западных и восточных славян, балтов и финноязычных народов. И при этом все три популяции

поморов занимают свое собственное «поморское» место в генетическом пространстве столь широкого круга популяций.

Связать столь уникальное своеобразие генофондов поморов с действием лишь дрейфа генов невозможно. Дрейф генов независимо действует на разные гаплогруппы. Поэтому «дрейфующая» популяция по одному из маркеров может стать схожей с одной из сравниваемых популяций, но по другой гаплогруппе она окажется близка к совсем другой популяции, по третьей гаплогруппе — к третьей популяции и т. д. Поэтому, когда мы проводим анализ генетических расстояний суммарно по всей совокупности генетических маркеров, такая «дрейфующая» популяция вне зависимости от ее реального происхождения оказывается непохожей ни на одну из групп сравнения.

Данная модель в какой-то мере может объяснять своеобразие генофонда поморов Зимнего берега. Но окончательный вывод о ней можно будет сделать лишь после анализа генетических портретов других популяций обширного Зимнего берега (рис. 1). Несомненно, что дрейф генов был важным фактором в генетической истории всех популяций поморов, которые в течение последних поколений становились все менее многочисленными. Однако дрейфу генов не удалось стереть генетическую память о том, что в основе их генофондов имелся различный субстрат. Для поморов Онежского берега он общий с широким кругом западного ствола финноязычного населения севера Европы, тогда как поморы Летнего берега схожи только с населением Скандинавии. Полногеномные исследования позволят верифицировать гипотезы их разного происхождения, давних миграционных потоков генов, сформировавших их генофонды. Однако результаты изучения полиморфизма Y-хромосомы (наиболее стабильной части генофонда вследствие патриликальности поморов) прямо указывают, что причина генетического своеобразия популяций онежских поморов кроется в различном генетическом субстрате, в различном происхождении, хотя эти различия и были перекрыты мощным дрейфом генов.

Второй важный вопрос — о генетическом сходстве поморов и новгородцев. Среднее генетическое расстояние между этими популяциями ($d = 0,77$) оказалось таким же ($d = 0,76$), как и расстояние между генофондами поморов и остальных рассмотренных русских популяций (таблица). Генетические отличия новгородцев велики даже от поморов Онежского берега ($d = 0,48$), но от популяций других поморов они вообще огромны (от Зимнего берега $d = 0,75$, от Летнего берега $d = 1,09$). Ранее нами был сделан вывод об отличиях аутосомного генома новгородцев от русских севера Архангельской области [8]. Теперь мы видим выраженные различия между генофондами новгородцев и поморов и по маркерам Y-хромосомы. Оба результата противоречат мнению, что генофонд Русского Севера был сформирован новгородской экспансией. Однако это далеко не единственный случай в мировой культуре,

когда внутренняя колонизация выражалась в расширении власти и экономического влияния, но не приводила к решительному изменению генофонда.

Эти и другие результаты изучения коренного населения Европы [4–5, 8–12, 30] убедительно показывают, что многие представления об его истории, сложившиеся на базе данных гуманитарных наук, далеко не всегда могут быть интерполированы на генофонд.

ВЫВОДЫ

1. Изучен полиморфизм Y-хромосомы в трех популяциях поморов Белого моря: Онежского, Летнего и Зимнего берегов. Анализ субтотальных выборок неродственных индивидов из всех пунктов с компактным проживанием поморов позволил создать надежные генетические портреты трех популяций поморов.
2. Исследование генофонда поморов по широкой панели маркеров Y-хромосомы выявило 14 гаплогрупп, из которых по четырем (I2, N3a4, R1a, R1b) обнаружены достоверные различия, несмотря на небольшие объемы выборок (37–48 человек). Различия генетических портретов поморов складываются за счет своеобразия генофонда каждой из популяций: у поморов Зимнего берега снижена частота гаплогруппы N3a4 и повышена частота I2; в популяции Летнего берега не обнаружены ветви гаплогруппы R1a, характерные для двух других популяций, но повышена частота R1b; в популяции Онежского берега высока частота N3a4, но низка I2. Особенности спектра и частот гаплогрупп создают уникальность генетического портрета каждой популяции поморов.
3. Каждой из трех популяций поморов присущ собственный спектр генетически близких популяций. Поморы Онежского берега генетически схожи с широким кругом финноязычных народов севера Европы и с некоторыми русскими популяциями, в генофонде которых выражен вклад дославянского населения. Поморы Летнего берега обнаружили сходство только с населением Скандинавии, что можно объяснить общим палеоевропейским субстратом или более поздними взаимодействиями скандинавов и поморов. Для поморов Зимнего берега зафиксирована некоторая генетическая близость лишь к двум популяциям Финляндии и Швеции.
4. Генетические расстояния между популяциями поморов оказались сопоставимы с общим размахом изменчивости между восточными славянами, балтами и финно-уграми региона. Причиной этого может быть (в совокупности с дрейфом генов) разный субстрат, лежащий в основе генофонда каждой популяции, поскольку трудно предположить столь разные миграционные связи у столь географически, этнически и культурно близких популяций.
5. Ни одна из трех популяций онежских поморов не проявляет заметного генетического сходства с коренным населением Новгородчины, что указывает на отсутствие генетических следов демической экспансии при новгородской колонизации Русского Севера.

Литература

1. Wells RS, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Underhill PA, Evseeva I, Blue-Smith J et al. The Eurasian Heartland: A continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (18): 10244–9.
2. Malyarchuk BA. Differentiation of the Mitochondrial Subhaplogroup

- U4 in the Populations of Eastern Europe, Ural, and Western Siberia: Implication to the Genetic History of the Uralic Populations. *Russian Journal of Genetics*. 2004; 40 (11): 1281–7.
3. Khrunin AV, Khokhrin DV, Filippova IN, Esko T, Nelis M, Bebyakova NA, et al. A Genome-Wide Analysis of Populations from European

- Russia Reveals a New Pole of Genetic Diversity in Northern Europe. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e58552.
4. Балановская Е. В., Пежемский Д. В., Романов А. Г., Баранова Е. Е., Ромашкина М. В., Агджоян А. Т. и др. Генофонд Русского Севера: славяне? Финны? Палеоевропейцы? Вестник Московского университета. 2011; (3): 27–58.
 5. Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I et al. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; 82 (1): 236–50.
 6. Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova EK, Kumar GPA, Akhmetova V, et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genetics*. 2017; 18 (1): 110.
 7. Балановский О. П. Генофонд Европы. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2015; 354 с. [цитируется по 21 май 2022 г.]. Доступно по ссылке: http://генофонд.рф/wp-content/uploads/Balanovskiy_2015-.pdf.
 8. Балановская Е. В., Черневский Д. К., Балановский О. П. Своеобразие Новгородского генофонда в контексте народонаселения европейской части России. Вестник НовГУ. 2021; 124 (3): 51–7.
 9. Chukhryaeva M, Pavlova E, Napolskich V, Garin E, Klopov A, Temnyatkin S, et al. Is there a Finno-Ugric component in the gene pool of Russians from Yaroslavl oblast? Evidence from Y-chromosome. *Russian Journal of Genetics*. 2017; 53: 388–99.
 10. Fechner A, Quinque D, Rychkov S, Morozowa I, Naumova O, Schneider Y, et al. Boundaries and clines in the West Eurasian Y-chromosome landscape: insights from the European part of Russia. *Am J Phys Anthropol*. 2008; 137 (1): 41–7.
 11. Malyarchuk B, Derenko M, Grzybowski T, Lunkina A, Czamy J, Rychkov S, et al. Differentiation of mitochondrial DNA and Y chromosomes in Russian populations. *Hum Biol*. 2004; 76 (6): 877–900.
 12. Балановская Е. В., Балановский О. П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007; 412 с.
 13. Булыгина Е. А., Соловьев В. Д. Генетическое и лингвистическое разнообразие четырнадцати популяций Евразии. Ученые записки Казанского университета. 2012; 154 (4): 175–87.
 14. Губина М. А., Бабенко В. Н., Дамба Л. Д., Пономарева М. Н., Коновалова Н. А., Воевода М. И. Полиморфизм митохондриальной ДНК у староверов Сибири. Генетика. 2014; 50 (6): 729–44. [цитируется по 6 сентябрь 2022 г.]. Доступно по ссылке: <http://naukarus.com/polimorfizm-mitochondrialnoy-dnk-u-staroverov-sibiri>.
 15. Rubinstein S, Dulik MC, Gokcumen O, Zhadanov S, Osipova L, Cocco M, et al. Russian Old Believers: genetic consequences of their persecution and exile, as shown by mitochondrial DNA evidence. *Hum Biol*. 2008; 80 (3): 203–37.
 16. Belyaeva O, Bermisheva M, Khrunin A, Slominsky P, Bebyakova N, Khusnutdinova E, et al. Mitochondrial DNA variations in Russian and Belorussian populations. *Hum Biol*. 2003; 75 (5): 647–60.
 17. Zhernakova DV, Brukhin V, Malov S, Oleksyk TK, Koepfli KP, Zhuk A, et al. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia. *Genomics*. 2020; 112 (1): 442–58.
 18. Лимборская С. А., Вербенко Д. А., Хрунин А. В., Сломинский П. А., Бебякова Н. А. Этническая геномика: анализ геномного полиморфизма популяций Архангельской области. Вестник Московского университета Серия 23 Антропология. 2011; (3): 100–19.
 19. Власова И. В., Александров В. А., Полищук Н. С., редакторы. Русские. М.: Наука, 1999; 827 с.
 20. Макаров Н. А. Колонизация северных окраин Древней Руси в XI–XIII вв: По материалам археол. памятников на волоках Белозерья и Поонежья. М.: Науч.-изд. центр «Скрипторий», 1997; 368 с.
 21. Макаров Н. А. Археологическое изучение Северо-Восточной Руси: колонизация и культурные традиции. Вестник Российской Академии Наук. 2009; 79 (12): 1068–79.
 22. Makarov N. Rural Settlement and Landscape Transformations in Northern Russia, A.D. 900–1300. In: Hines J, Lane A, Redknap M, editors. *Land, Sea and Home: Settlement in the Viking Period*. London: Routledge, 2004; 55–74 p.
 23. Бернштам Т. А. Народная культура Поморья в XIX–начале XX в: этнографические очерки. Ленинград: Наука. Ленинградское отделение, 1983; 233 с.
 24. Бернштам Т. А. Поморы: Формирование группы и система хозяй-ва. Ленинград: Наука Ленинградское отделение, 1978; 176 с.
 25. Перевозчиков И. В., Маурер А. М., Бацевич В. А., Локк К. Э. Обобщенный фотопортрет поморов (в связи с трехсотлетним юбилеем со дня рождения М. В. Ломоносова). Вестник Московского университета. Серия 23 Антропология. 2011; (3): 59–67.
 26. Пермиловская А. Б. Русский Север — хранитель «генофонда» русской этнокультурной традиции. В книге: Фурсова Е. Ф., Пермиловская А. Б., Черных А. В., Зуев А. С., Люцидарская А. А., Майничева А. Ю., и др. *Сибирь и Русский Север*. Новосибирск: Институт археологии и этнографии Сибирского отделения Российской академии наук, 2014; с. 7–42.
 27. Макаров Н. А. Русский Север: таинственное средневековье. М., 1993; 190 с.
 28. Пыжова А. Н. Этническая идентичность поморов Архангельской области через призму основных антропологических подходов. Арктика и Север. 2012; (7): 37–44.
 29. Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геногеографии. В книге: И. К. Лурье, В. И. Кравцова, редакторы. Современная географическая картография. М.: Дата+, 2012; с. 158–66.
 30. Völgyi A, Zalán A, Szvetnik E, Pamjav H. Hungarian population data for 11 Y-STR and 49 Y-SNP markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2009; 3 (2): e27–28.

References

1. Wells RS, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Underhill PA, Evseeva I, Blue-Smith J et al. The Eurasian Heartland: A continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (18): 10244–9.
2. Malyarchuk BA. Differentiation of the Mitochondrial Subhaplogroup U4 in the Populations of Eastern Europe, Ural, and Western Siberia: Implication to the Genetic History of the Uralic Populations. *Russian Journal of Genetics*. 2004; 40 (11): 1281–7.
3. Khrunin AV, Khokhrin DV, Filippova IN, Esko T, Nelis M, Bebyakova NA, et al. A Genome-Wide Analysis of Populations from European Russia Reveals a New Pole of Genetic Diversity in Northern Europe. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e58552.
4. Balanovska EV, Pezhemskiy DV, Romanov AG, Baranova EE, Romashkina MV, Agdzhojan AT, et al. Genofond Russkogo Severa: slavyane? Finny? Paleoevropejcy? Vestnik Moskovskogo universiteta. 2011; (3): 27–58. Russian.
5. Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I et al. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; 82 (1): 236–50.
6. Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova EK, Kumar GPA, Akhmetova V, et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genetics*. 2017; 18 (1): 110.
7. Balanovsky OP. Genofond Evropy. M.: Tovarishestvo nauchnyx izdanij KMK, 2015; 354 s. [citiruyetsya po 21 maj 2022 g.]. Dostupno po ssylke: http://genofond.rf/wp-content/uploads/Balanovskiy_2015-.pdf. Russian.
8. Balanovska EV, Chernevskij DK, Balanovskij OP. Svoeobrazie Novgorodskogo genofonda v kontekste narodonaseleniya evropejskoj chasti Rossii. Vestnik NovGU. 2021; 124 (3): 51–7. Russian.
9. Chukhryaeva M, Pavlova E, Napolskich V, Garin E, Klopov A, Temnyatkin S, et al. Is there a Finno-Ugric component in the gene pool of Russians from Yaroslavl oblast? Evidence from Y-chromosome. *Russian Journal of Genetics*. 2017; 53: 388–99.

10. Fechner A, Quinque D, Rychkov S, Morozova I, Naumova O, Schneider Y, et al. Boundaries and clines in the West Eurasian Y-chromosome landscape: insights from the European part of Russia. *Am J Phys Anthropol.* 2008; 137 (1): 41–7.
11. Malyarchuk B, Derenko M, Grzybowski T, Lunkina A, Czarny J, Rychkov S, et al. Differentiation of mitochondrial DNA and Y chromosomes in Russian populations. *Hum Biol.* 2004; 76 (6): 877–900.
12. Balanovska EV, Balanovsky OP. *Russkij genofond na Russkij ravnine.* M.: Luch, 2007; 412 s. Russian.
13. Bulygina EA, Solovov VD. *Geneticheskoe i lingvisticheskoe raznoobrazie chetyrnadcati populyacij Evrazii. Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta.* 2012; 154 (4): 175–87. Russian.
14. Gubina MA, Babenko VN, Damba LD, Ponomareva MN, Konovalova NA, Voevoda MI. Polimorfizm mitohondrial'noj DNK u staroverov Sibiri. *Genetika.* 2014; 50 (6): 729–44. [citiruet'sya po 6 sentyabr' 2022 g.]. Dostupno po ssylke: <http://naukarus.com/polimorfizm-mitohondrialnoy-dnk-u-staroverov-sibiri>. Russian.
15. Rubinstein S, Dulik MC, Gokcumen O, Zhadanov S, Osipova L, Cocca M, et al. Russian Old Believers: genetic consequences of their persecution and exile, as shown by mitochondrial DNA evidence. *Hum Biol.* 2008; 80 (3): 203–37.
16. Belyaeva O, Bermisheva M, Khrunin A, Slominsky P, Bebyakova N, Khusnutdinova E, et al. Mitochondrial DNA variations in Russian and Belorussian populations. *Hum Biol.* 2003; 75 (5): 647–60.
17. Zhernakova DV, Brukhin V, Malov S, Oleksyk TK, Koepfli KP, Zhuk A, et al. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia. *Genomics.* 2020; 112 (1): 442–58.
18. Limborskaya SA, Verbenko DA, Xrunin AV, Slominskij PA, Bebyakova NA. Ehtnicheskaya genomika: analiz genomnogo polimorfizma populyacij Arxangel'skoj oblasti. *Vestnik Moskovskogo universiteta Seriya 23 Antropologiya.* 2011; (3): 100–19. Russian.
19. Vlasova IV, Aleksandrov VA, Polishuk NS, redaktory. *Russkie.* M.: Nauka, 1999; 827 s. Russian.
20. Makarov NA. Kolonizaciya severnyx okrain Drevnej Rusi v XI–XIII vv: Po materialam arxeol. pamyatnikov na volokax Beloz'er'ya i Poonezh'ya. M.: Nauch.-izd. centr «Skriptorij», 1997; 368 s. Russian.
21. Makarov NA. Arxeologicheskoe izuchenie Severo-Vostochnoj Rusi: kolonizaciya i kul'turnye tradicii. *Vestnik Rossijskoj Akademii Nauk.* 2009; 79 (12): 1068–79. Russian.
22. Makarov N. Rural Settlement and Landscape Transformations in Northern Russia, A.D. 900–1300. In: Hines J, Lane A, Redknap M, editors. *Land, Sea and Home: Settlement in the Viking Period.* London: Routledge, 2004; 55–74 p.
23. Bernshtam TA. *Narodnaya kul'tura Pomor'ya v XIX–nachale XX v: ehtnograficheskie ocherki.* Leningrad: Nauka. Leningradskoe otdelenie, 1983; 233 s. Russian.
24. Bernshtam TA. Pomory: Formirovanie gruppy i sistema xoz-va. Leningrad: Nauka Leningradskoe otdelenie, 1978; 176 s. Russian.
25. Perevozchikov IV, Maurer AM, Bacevich VA, Lokk K. Eh. Obobshhennyj fotoportret pomorov (v svyazi s trexstotletnim yubileem so dnya rozhdeniya M. V. Lomonosova). *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23 Antropologiya.* 2011; (3): 59–67. Russian.
26. Permilovskaya AB. *Russkij Sever — xranitel' «genofonda» russkoj ehtnokul'turnoj tradicii.* V knige: Fursova EF, Permilovskaya AB, Chernyx AV, Zuev AS, Lyucidarskaya AA, Majnicheva AY, i dr. *Sibir' i Russkij Sever.* Novosibirsk: Institut arxeologii i ehtnografii Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii nauk, 2014; s. 7–42. Russian.
27. Makarov NA. *Russkij Sever: tainstvennoe srednevekov'e.* M., 1993; 190 s. Russian.
28. Pyzhova AN. Ehtnicheskaya identichnost' pomorov Arxangel'skoj oblasti cherez prizmu osnovnyx antropologicheskix podxodov. *Arktika i Sever.* 2012; (7): 37–44. Russian.
29. Koshel SM. Geoinformacionnye texnologii v genogeografii. V knige: IK Lure, VI Kravcova, redaktory. *Sovremennaya geograficheskaya kartografiya.* M.: Data+, 2012; s. 158–66. Russian.
30. Völgyi A, Zalán A, Szvetnik E, Pamjav H. Hungarian population data for 11 Y-STR and 49 Y-SNP markers. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3 (2): e27–28.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ У *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИС. Н. Андреевская , Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова, Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева, А. Эргешов

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Фторхинолоны — основная группа препаратов, применяемых для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Целью исследования было оценить разнообразие мутаций в гене *gyrA*, а также установить ассоциацию мутаций в *gyrA* с фенотипической устойчивостью к левофлоксацину и общим профилем лекарственной устойчивости возбудителя. Исследование проведено на диагностическом материале от 2836 больных туберкулезом легких. Для определения мутаций в *gyrA* использовали наборы «ТБ-БИОЧИП-2» или «Амплитуб-ФQ-РВ». Фенотипическую лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* (МБТ) определяли в системе BACTEC MGIT 960. Показано, что у МБТ доминировали мутации D94G (41,63%; 95%ДИ: 38,03–45,32%) и A90V (21,32%; 95%ДИ: 18,44–24,50%), причем изоляты с этими мутациями были получены в том числе и от впервые выявленных больных туберкулезом легких. Установлено, что мутация D94A не являлась строго ассоциированной с фенотипической устойчивостью к фторхинолонам. Устойчивость к фторхинолонам, как правило, была ассоциирована с множественной лекарственной устойчивостью (93,52%; 95%ДИ 91,43–95,12%). В 2,31% (95%ДИ 1,78–3,00%) случаев выявлена генотипическая гетерорезистентность к фторхинолонам: смешанные популяции включали 2–4 пула МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*. На основании полученных результатов можно заключить, что в современной популяции МБТ происходит формирование устойчивости к фторхинолонам, как правило, на фоне уже имеющейся МЛУ. Наиболее перспективными в эволюционном плане представляются МБТ с мутациями в *gyrA* D94G и A90V.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, фторхинолоны, устойчивость, *gyrA*, мутации, преШЛУ туберкулез

Финансирование: исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ «ЦНИИТ» № 122041100246-3 «Межвидовой и внутривидовой полиморфизм микобактерий у больных туберкулезом и микобактериозом на фоне специфической терапии».

Вклад авторов: А. Эргешов, Л. Н. Черноусова — разработка дизайна исследования; Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева — получение данных для анализа; Т. Г. Смирнова — анализ полученных данных; С. Н. Андреевская — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; все авторы участвовали в обсуждении результатов

 **Для корреспонденции:** Софья Николаевна Андреевская
Яузская аллея, д. 2, стр. 1А, г. Москва, 107564, Россия; andsofia@mail.ru

Статья получена: 10.10.2022 **Статья принята к печати:** 24.10.2022 **Опубликована онлайн:** 31.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.054

THE NATURE OF GENOTYPIC RESISTANCE TO FLUOROQUINOLONES IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CIRCULATING IN RUSSIAN FEDERATIONAndreevskaya SN , Smirnova TG, Chernousova LN, Larionova EE, Kiseleva EA, Ergeshov A

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

Fluoroquinolones are the main group of drugs used for treatment of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). The study was aimed to assess the diversity of mutation in the *gyrA* gene and to evaluate the association of *gyrA* mutations with the phenotypic resistance to levofloxacin and the general drug resistance profile of the pathogen. The study involved assessment of diagnostic materials obtained from 2836 patients with pulmonary tuberculosis. TB-BIOCHIP-2 and Amplitube-FQ-RV kits were used for identification of the *gyrA* mutations. Phenotypic drug susceptibility of *M. tuberculosis* (MTB) was defined using the BACTEC MGIT 960 test system. It was shown that mutations D94G (41.63%; 95% CI: 38.03–45.32%) and A90V (21.32%; 95% CI: 18.44–24.50%) prevailed in MTB, although some isolates carrying these mutations were obtained from the newly diagnosed patients with pulmonary tuberculosis. It was found that mutation D94A was not strongly associated with the phenotypic resistance to fluoroquinolones. Fluoroquinolone resistance was usually associated with multiple drug resistance (93.52%; 95% CI 91.43–95.12%). In 2.31% (95% CI 1.78–3.00%) of cases, genotypic heteroresistance to fluoroquinolones was detected: mixed populations included 2–4 MTB pools with various structure of the *gyrA* QRDR. The results obtained lead to the conclusion that resistance to fluoroquinolones that is usually associated with the existing MDR arises in the modern MTB population. MTB carrying *gyrA* mutations D94G and A90V seems to be the most promising in evolutionary terms.

Keywords: *M. tuberculosis*, fluoroquinolones, resistance, *gyrA*, mutations, preXDR tuberculosis

Funding: the study was conducted as part of the State Assignment № 122041100246-3 for the Central Tuberculosis Research Institute, “Intra- and Inter- species Polymorphism of Mycobacteria in Patients with Tuberculosis and Mycobacteriosis Who Receive Specific Therapy”.

Author contribution: Ergeshov A, Chernousova LN — study design; Larionova EE, Kiseleva EA — data acquisition; Smirnova TG — data analysis; Andreevskaya SN — manuscript writing, literature review; all authors contributed to the discussion.

 **Correspondence should be addressed:** Sofia N. Andreevskaya
Yauzskaya Alleya, 2, str. 1A, Moscow, 107564, Russia; andsofia@mail.ru

Received: 10.10.2022 **Accepted:** 24.10.2022 **Published online:** 31.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.054

Распространение туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя является серьезной проблемой общественного здравоохранения. Особую озабоченность вызывает широкое распространение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ), т. е. устойчивого одновременно к двум наиболее эффективным противотуберкулезным

препаратам рифампицину и изониазиду. Эффективность терапии МЛУ-ТБ, по данным ВОЗ, составляет лишь 59% [1]. Россия входит в число стран с высоким бременем МЛУ-ТБ и, несмотря на то, что распространенность МЛУ-ТБ в стране в последние годы начала снижаться (с 20,6 на 100 000 населения в 2020 г. до 18,1 на 100 000 населения в 2021 г.), этот показатель по-прежнему остается высоким [1, 2].

В схему терапии МЛУ-ТБ обязательно включают препараты фторхинолонового ряда (препараты группы А по классификации ВОЗ, отражающей приоритетность включения препаратов в схему терапии) [3]. Мишенью фторхинолонов служит фермент ДНК-гираза, который необходим для осуществления процессов репликации и транскрипции в клетке *M. tuberculosis* (МБТ) [4, 5]. Устойчивость к фторхинолонам в 60–90% случаев связана с мутациями в области QRDR (quinolone resistance-determining region) гена *gyrA*, кодирующего α -субъединицу ДНК-гиразы [6, 7]. В базе данных TBDRDB (<http://www.tbdrdb.com>) описано 17 вариантов мутаций в QRDR, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, из которых 10 вариантов высокодостоверны для формирования устойчивости к этой группе препаратов [8].

Развитие дополнительной устойчивости к фторхинолонам у МБТ с МЛУ приводит к развитию туберкулеза с предширокой лекарственной устойчивостью возбудителя (преШЛУ-ТБ), для лечения которого требуется длительный и дорогостоящий курс химиотерапии. По оценкам ВОЗ, в 105 странах до 20% случаев туберкулеза относится к этой категории. Для повышения эффективности лечения преШЛУ-ТБ необходима как можно более ранняя коррекция курса химиотерапии, основанная на определении чувствительности к фторхинолонам молекулярно-генетическими методами. Однако, по данным ВОЗ, глобальный охват тестированием на чувствительность к фторхинолонам остается низким и составляет около 50% от числа выявленных случаев туберкулеза в мире [1]. В России для ускоренного определения чувствительности МБТ к фторхинолонам используют две отечественные тест-системы. Одна из них — ТБ-БИОЧИП-2 (ИМБ-Биочип; Россия) представляет собой биочипы, которые выявляют 10 вариантов точечных мутаций в QRDR, вторая — «Амплитуб-FQ-PB» (Синтол; Россия), основана на аллель-специфичной ПЦР и выявляет шесть мутаций в QRDR *gyrA*.

Целью исследования было оценить разнообразие мутаций в гене *gyrA*, а также установить ассоциацию мутаций в *gyrA* с фенотипической устойчивостью к левофлоксацину и с общим профилем лекарственной устойчивости возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследовали диагностический материал от пациентов всех возрастных групп, поступивших в диагностическое и клиническое отделения ФГБНУ «ЦНИИТ» с 2011 по 2019 гг.

Дизайн исследования

Проведен ретроспективный анализ данных по изучению мутаций в QRDR *gyrA* и фенотипической лекарственной устойчивости МБТ, выделенных за 9-летний период (2011–2019 гг.) от больных туберкулезом легких, проходивших лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ». Диагностический материал исследовали по стандартному алгоритму, принятому в отделе микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»: каждый образец диагностического материала параллельно исследовали культуральными и молекулярно-генетическими методами. Диагностический материал подвергали стандартной деконтаминирующей обработке и проводили посев в пробирки MGIT для культивирования в системе

ВАСТЕС MGIT 960 [9]. Из оставшейся после посева порции диагностического материала выделяли ДНК и проводили ПЦР-исследование на наличие ДНК МБТ. При получении положительного результата ПЦР определяли мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, на биочипах или аллель-специфической ПЦР. При получении культуры МБТ определяли лекарственную чувствительность к восьми противотуберкулезным препаратам.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из диагностического материала набором реагентов «Амплитуб-PB» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 1 («Синтол»; Россия), согласно инструкции к набору.

Выявление ДНК МБТ

ПЦР на выявление ДНК МБТ проводили с использованием набора реагентов «Амплитуб-PB» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 2 («Синтол»; Россия), согласно инструкции к набору. Амплификацию проводили в термоциклере с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad; США).

Генотипическая устойчивость к рифампицину и изониазиду

Определение проводили или с использованием микрочиповой технологии с набором «ТБ-БИОЧИП-1» («БИОЧИП-ИМБ»; Россия), или с использованием набора «Амплитуб-МЛУ-PB» («Синтол»; Россия). Обе процедуры осуществляли согласно инструкциям производителей.

Генотипическая устойчивость к фторхинолонам

Определение проводили с использованием микрочиповой технологии с набором «ТБ-БИОЧИП-2» («БИОЧИП-ИМ»; Россия) — для образцов, полученных в период 2011–2015 гг., или с использованием набора «Амплитуб-FQ-PB» («Синтол»; Россия) — для образцов, полученных в период 2015–2019 гг. Обе процедуры осуществляли согласно инструкциям производителей. Если от одного и того же пациента были получены анализы на разные сроки терапии или были исследованы разные виды диагностического материала от одного больного (например, мокрота и хирургический материал), результат определения мутаций в *gyrA*, полученный для каждого из таких образцов, сравнивали между собой.

Культуральная диагностика

Выявление МБТ проводили на жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе ВАСТЕС MGIT 960 (BD; США) согласно стандартному протоколу производителя [9].

Фенотипическая лекарственная чувствительность

Определение проводили модифицированным методом пропорций в системе ВАСТЕС MGIT 960 (BD; США) к восьми противотуберкулезным препаратам (рифампицину,

Таблица 1. Частота встречаемости единичных мутаций в гене *gyrA* от числа всех изолятов МБТ с мутациями в *gyrA* ($n = 699$)

Кодон QRDR <i>gyrA</i>	Аминокислотная замена	Частота встречаемости, абс. (%)	95% ДИ
88	G → C	1 (0,14)	0,03–0,81
90	A → V	149 (21,32)	18,44–24,50
91	S → P	53 (7,58)	5,84–9,78
94	D → A	102 (14,59)	12,17–17,40
	D → N	54 (7,73)	5,97–9,94
	D → G	291 (41,63)	38,03–45,32
	D → H	11 (1,57)	0,88–2,80
	D → Y	38 (5,44)	3,99–7,37

изониазиду, этамбутолу, пипразинамиду, этионамиду, амикацину, капреомицину и левофлоксацину) согласно рекомендациям производителя [9, 10].

Методы статистического анализа

При оценке результатов исследования использовали описательную статистику: учитывали число наблюдений, частоту, долю (в процентах), 95%-й доверительный интервал (95%ДИ). Для сравнения различий между группами использовали χ^2 -критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Весь анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего за период 2011–2019 гг. была проведена микробиологическая диагностика туберкулеза для 4451 больного. В исследование был включен материал от 2836 пациентов с положительными результатами ПЦР на наличие ДНК МБТ. Из них в 2082 случаях (73,41%, 95% ДИ: 71,76–75,01%) мутации в *gyrA* применяемыми молекулярно-генетическими методами выявлены не были (далее *gyrA* дикого типа).

От 699 пациентов (24,65%, 95% ДИ: 23,10–26,27%) были выделены МБТ с единичными мутациями в *gyrA*. У МБТ, выделенных от 55 (2,31%, 95% ДИ: 1,78–3,00%) больных, результаты определения генотипической устойчивости к фторхинолонам различались в динамике или в зависимости от вида диагностического материала. Эти случаи были обозначены нами как «гетерорезистентность» и подробно будут описаны ниже.

Таблица 2. Фенотипически устойчивые к левофлоксацину изоляты МБТ с разной структурой QRDR *gyrA* ($n = 1326$)

Мутация в QRDR <i>gyrA</i>	Фенотипически устойчивые к левофлоксацину изоляты	
	абс. (%)	95% ДИ
G88C ($n = 1$)	1 (100)	20,65–100,00
A90V ($n = 97$)	95 (97,94)	92,79–99,43
S91P ($n = 33$)	32 (96,97)	84,68–99,46
D94A ($n = 73$)	49 (67,12)	55,73–76,81
D94N ($n = 39$)	39 (100)	91,03–100,00
D94G ($n = 204$)	200 (98,04)	95,07–99,23
D94H ($n = 6$)	6 (100)	60,97–100,00
D94Y ($n = 27$)	26 (96,30)	81,72–99,34
Всего с мутациями ($n = 480$)*	448 (93,33)	90,74–95,24
WT ($n = 846$)	32 (3,78)	2,69–5,29

Примечание: WT — дикий тип *gyrA*; * — учитывали только изоляты МБТ с известной фенотипической устойчивостью к фторхинолонам.

Частота встречаемости единичных мутаций в QRDR *gyrA*

Выявленные в QRDR *gyrA* единичные мутации локализовались в кодонах 88, 90, 91 или 94 (табл. 1). Наиболее часто мутации обнаруживали в 94-ом кодоне гена (496/699, 70,96%; 95% ДИ: 67,49–74,20%) и были представлены пятью вариантами однонуклеотидных полиморфизмов, среди которых наиболее часто встречалась замена D94G (291/496, 58,67%; 95% ДИ: 54,29–62,92% среди мутаций в кодоне 94 и 291/699, 41,63%; 95% ДИ: 38,03–45,32% среди МБТ с единичными мутациями в гене *gyrA*). Второй по частоте встречаемости была замена A90V (149/699, 21,32%; 95% ДИ: 18,44–24,50%). Суммарно МБТ с мутациями D94G и A90V составляли более половины случаев от числа всех МБТ с единичными мутациями в *gyrA* — 440/699 (62,95%; 95% ДИ: 59,31–66,45%).

Фенотипическая чувствительность к левофлоксацину

Фенотипическая чувствительность к левофлоксацину была определена для МБТ, выделенных культуральным методом из диагностического материала 1326 пациентов. Определение мутаций в *gyrA* этих изолятов МБТ показало, что в 846 случаях были выявлены МБТ с *gyrA* дикого типа, в 480 случаях — с единичными мутациями в *gyrA*. МБТ с *gyrA* дикого типа преимущественно были чувствительны к левофлоксацину (814/846, 96,22%, 95% ДИ: 94,71–97,31%), а МБТ с мутациями, как правило, были устойчивы к левофлоксацину (448/480, 93,33%, 95% ДИ: 90,74–95,24%) (табл. 2).

Таблица 3. Представленность мутантных по *gyrA* вариантов МБТ в группах впервые выявленных и ранее леченых больных туберкулезом

Категория больных	Число изолятов с мутацией, абс. (%)							
	G88C	A90V	S91P	D94A	D94N	D94G	D94H	D94Y
ВВ (<i>n</i> = 239)	0 (0,00)	60 (25,10)	12 (5,02)	30 (12,55)	21 (8,79)	110 (46,03)	0 (0,00)	6 (2,51)
РЛ (<i>n</i> = 264)	1 (0,38)	44 (16,67)	25 (9,47)	41 (15,53)	16 (6,06)	117 (44,32)	6 (2,27)	14 (5,30)
<i>P</i> -value	0,341	0,038	0,066	0,375	0,26	0,776	0,02	0,117

Примечание: ВВ — впервые выявленные; РЛ — ранее леченые.

Полиморфизм мутантных по *gyrA* вариантов МБТ, выделенных от впервые выявленных и ранее леченых больных туберкулезом

Из 2836 больных туберкулезом легких, диагностический материал от которых был включен в исследование, 1253 пациента относились к категории впервые выявленных больных, 767 — к категории ранее леченых, а для 816 пациентов информации о статусе не было.

МБТ с диким типом *gyrA* чаще были выделены от впервые выявленных больных, чем от ранее леченых: из 1475 изолятов МБТ с *gyrA* дикого типа, выделенных от больных с известным статусом, 1012 (68,61%) были от впервые выявленных больных туберкулезом, а 463 (31,39%) — от ранее леченых пациентов (*p*-value ≤ 0,001). Мутантный вариант *gyrA* A90V достоверно чаще встречался в группе МБТ, выделенных от впервые выявленных больных; для остальных мутантных вариантов значимых различий выявлено не было (табл. 3).

Мутации в гене *gyrA* у МБТ с разным характером резистентности

По характеру резистентности изоляты МБТ с известной генотипической чувствительностью к фторхинолонам (в анализ не вошли случаи гетерорезистентности) были разделены на пять категорий: первая — МБТ с МЛУ, вторая — полирезистентные МБТ (устойчивые к любым сочетаниям противотуберкулезных препаратов, кроме одновременной к изониазиду и рифампицину), третья — монорезистентные к фторхинолонам, четвертая — монорезистентные к другим противотуберкулезным препаратам, кроме фторхинолонов, и пятая — чувствительные ко всем противотуберкулезным препаратам (табл. 4). МБТ с мутациями в *gyrA*, как правило, были с МЛУ или полирезистентными (суммарно 689/694,

99,28%, 95% ДИ: 98,32–99,69%). Моноустойчивость к фторхинолонам встречалась очень редко (5/694, 0,72%, 95% ДИ: 0,31–1,68); в четырех случаях такие МБТ имели мутацию в *gyrA* D94A и в одном случае — D94G. МБТ с *gyrA* дикого типа приблизительно в равных долях входили в категорию МБТ с МЛУ и в категорию МБТ, чувствительных ко всем противотуберкулезным препаратам.

Гетерорезистентность и множественные мутации

Описанные выше изоляты МБТ имели одинаковую структуру QRDR *gyrA* (дикий тип или единичная мутация) во всех образцах, полученных от одного и того же пациента в динамике. Однако у 55 пациентов данные по структуре QRDR *gyrA* при проведении динамического наблюдения различались (табл. 5).

Так, от 35 больных при исследовании диагностического материала в процессе химиотерапии выделены МБТ с различной структурой QRDR *gyrA*. Из них в 22 случаях в разных образцах, выделенных от больного, были выявлены МБТ как с *gyrA* дикого типа, так и с мутациями. У МБТ, выделенных от 15 пациентов, был обнаружен *gyrA* дикого типа и с единичными мутациями, преимущественно D94G (табл. 5, п.1.1.1). От семи больных были выделены МБТ с *gyrA* дикого типа и с множественными мутациями (табл. 5, п.1.1.2). В трех из этих семи случаев было доказано сосуществование двух разных пулов МБТ с единичными мутациями, а не одного пула со сдвоенной мутацией в *gyrA*, так как в динамике выделялись образцы и с единичной мутацией. В четырех из семи случаев наличие двух пулов с единичными мутациями или одного со сдвоенной мутацией в *gyrA* доказано не было.

От 13 больных на разные сроки были получены образцы, из которых выделялись МБТ с разными

Таблица 4. Изоляты МБТ с различным профилем резистентности с различной структурой *gyrA**

Характер резистентности/Мутация	Частота встречаемости у МБТ с мутацией в <i>gyrA</i> , абс. (%; 95% ДИ)				
	МЛУ	Поли	Моно к ФХ	Моно к др. ПТП	sens
G88C (<i>n</i> = 1)	1 (100; 20,65–100)	–	–	–	–
A90V (<i>n</i> = 149)	140 (93,96; 88,92–96,79)	9 (6,04; 3,21–11,08)	–	–	–
S91P (<i>n</i> = 53)	52 (98,11; 90,06–99,67)	1 (1,89; 0,33–9,94)	–	–	–
D94A (<i>n</i> = 102)	92 (90,20; 82,89–94,59)	6 (5,88; 2,72–12,24)	4 (3,92; 1,54–9,65)	–	–
D94N (<i>n</i> = 54)	49 (90,74; 80,09–95,98)	5 (9,26; 4,02–19,91)	–	–	–
D94G (<i>n</i> = 287)	270 (94,08; 90,72–96,27)	16 (5,57; 3,46–8,86)	1 (0,35; 0,06–1,95)	–	–
D94H (<i>n</i> = 10)	10 (100,00; 72,25–100)	–	–	–	–
D94Y (<i>n</i> = 38)	35 (92,11; 79,20–97,28)	3 (7,89; 2,72–20,80)	–	–	–
Всего с единичной мутацией (<i>n</i> = 694)	649 (93,52; 91,43–95,12)	40 (5,76; 4,26–7,75)	5 (0,72; 0,31–1,68)	–	–
WT (<i>n</i> = 1412)	779 (55,17; 52,57–57,75)	–	–	54 (3,82; 2,94–4,96)	579 (41,01; 38,47–43,59)
Всего (<i>n</i> = 2106)	1428 (67,81; 65,78–69,77)	40 (1,90; 1,40–2,58)	5 (0,24; 0,10–0,55)	54 (2,56; 1,97–3,33)	579 (27,49; 25,63–29,44)

Примечание: МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; Поли — полирезистентность; Моно — монорезистентность; ФХ — фторхинолоны; ПТП — противотуберкулезные препараты; sens — чувствительные к ПТП; WT — дикий тип *gyrA*; * — при анализе учитывали только образцы с известным характером резистентности.

Таблица 5. Гетерорезистентность к фторхинолонам

Описание	Число (абс.)	Категория больных			Характер устойчивости к ПТП			
		ВВ	РЛ	Неизв.	МЛУ	Поли	Моно ФХ	н/д
1. Разная структура QRDR <i>gyrA</i> в разных образцах от одного больного, из них:	35	1	27	7	31	1	2	1
1.1 Последовательное выделение из разных образцов МБТ с WT <i>gyrA</i> и <i>gyrA</i> мутациями, включая	22	1	18	3	18	1	2	1
1.1.1 WT + единичные мутации (2 пула):	15	1	11	3	12	1	1	1
WT + D94G	9	–	8	1	7	1	–	1
WT + A90V	4	1	2	1	3	–	1	–
WT + D94N	1	–	–	1	1	–	–	–
WT + D94Y	1	–	1	–	1	–	–	–
1.1.2 WT + множественные мутации	7	–	7	–	6	–	1	–
1.1.2.1 (3 пула)	5	–	5	–	4	–	1	–
WT + D94G + S91P	1	–	1	–	–	–	1	–
WT + D94G + A90V	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94G + D94N, потом только D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94G + D94N, потом только D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94G + A90V потом только D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
1.1.2.2 (4 пула)	2	–	2	–	2	–	–	–
WT + A90V + S91P + D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + A90V + D94G + D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
1.2 Последовательное выделение из разных образцов МБТ с разными мутациями в <i>gyrA</i>	13	–	9	4	13	–	–	–
1.2.1 Разные единичные мутации (2 пула)	8	–	6	2	8	–	–	–
A90V или D94G	4	–	2	2	4	–	–	–
A90V или D94A	1	–	1	–	1	–	–	–
D94H или D94Y	1	–	1	–	1	–	–	–
D94G или D94N	1	–	1	–	1	–	–	–
D94G или D94H	1	–	1	–	1	–	–	–
1.2.2 Чередувание двоянной и единичной	5	–	3	2	5	–	–	–
1.2.2.1 (2 пула)	4	–	2	2	4	–	–	–
D94G + A90V или A90V	1	–	1	–	1	–	–	–
D94G + A90V или D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
A90V + S91P или A90V	1	–	–	1	1	–	–	–
D94N + D94G или D94G	1	–	–	1	1	–	–	–
1.2.2.2 (3 пула)	1	–	1	–	1	–	–	–
A90V + D94N + D94Y или A90V	1	–	1	–	1	–	–	–
2 Разные варианты QRDR в одном образце	5	1	4	–	3	1	1	–
2.1 (2 пула)	4	1	3	–	2	1	1	–
WT + D94G	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + A90V	1	–	1	–	–	1	–	–
WT + S91P	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94N	1	1	–	–	–	–	1	–
2.2 (3 пула)	1	–	1	–	1	–	–	–
WT + D94Y + A90V + (A90V и D94Y)	1	–	1	–	1	–	–	–
3. Сдвоенная мутация	15	–	9	6	11	4	–	–
A90V + D94N	3	–	–	2	2	–	–	–
S91P + D94A	5	–	4	1	3	2	–	–
S91P + D94G	1	–	–	1	1	–	–	–
A90V + D94A	2	–	1	1	2	–	–	–
A90V + D94H	3	–	3	–	1	2	–	–
A90V + D94G	1	–	–	1	1	–	–	–
S91P + D94N	–	–	1	–	1	–	–	–
Всего	55	2	40	13	45	6	3	1
Из них:	–	–	–	–	–	–	–	–
2 пула*	46	2	31	13	37	6	2	1
3 пула	7	–	7	–	6	–	1	–
4 пула	2	–	2	–	2	–	–	–

Примечание: ВВ — впервые выявленные; РЛ — ранее леченые; ПТП — противотуберкулезные препараты; ФХ — фторхинолоны; МЛУ — множественная лекарственная устойчивость; Поли — полirezистентность; Моно — монорезистентность; н/д — нет данных; WT — дикий тип *gyrA*; * — включены случаи выявления двойной мутации в *gyrA*.

единичными мутациями (восемь из 13) или чередовались образцы со сдвоенными мутациями и с единичной мутацией (пять из 13), что могло свидетельствовать о нахождении в организме нескольких пулов МБТ, мутантных по *gyrA* (табл. 5, п. 1.2).

В пяти случаях гетерорезистентность была выявлена при проверке случаев несовпадения результатов фенотипической и генотипической устойчивости: в диагностическом образце выявляли ДНК МБТ с мутациями в *gyrA*, а полученная из образца культура МБТ была фенотипически чувствительной к левофлоксацину, и наоборот. В этом случае повторно многократно (до восьми раз) определяли мутации в *gyrA* в имеющихся образцах ДНК, а также заново выделяли ДНК из диагностического образца и проводили анализ на наличие мутаций в *gyrA*. Для каждого из этих пяти случаев в серии определения мутаций в *gyrA* были получены результаты, как совпадающие с полученным изначально, так и отличающиеся от него, что могло служить доказательством наличия в одном диагностическом образце смешанной популяции МБТ (табл. 5, п. 2).

Еще в 15 случаях в одном образце (для исследования был доступен единственный образец от каждого больного) нами были зафиксированы двойные мутации (табл. 5, п. 3). Как правило, это была одна из двух наиболее часто встречающихся мутаций (D94G или A90V) в комбинации с одной из редких мутаций (девять из 15 случаев), или, в пяти из 15 случаев, одновременно обнаруживали две редкие мутации, причем только сочетание S91P + D94A. МБТ с двумя наиболее распространенными мутациями (D94G или A90V) были выделены только от одного больного. Во всех 15 случаях при повторных постановках ПЦР с ДНК, выделенной из диагностического образца, наличие двух мутаций повторялось. Это свидетельствовало о том, что от одного больного или выделялся один пул МБТ, в геноме которых была сдвоенная мутация в *gyrA*, или в равном соотношении выделялось два пула МБТ, каждый со своей единичной мутацией в *gyrA*. Так как диагностический материал от пациентов в этих случаях был получен однократно, динамические наблюдения, позволяющие уточнить полученные данные, проведены не были.

Таким образом, нами было показано, что в организме одного пациента могло быть от двух до четырех пулов МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*. Чаще всего смешанные популяции были представлены двумя пулами МБТ (46/55, 83,64%, если включать в анализ 15 случаев со сдвоенными мутациями с недоказанной принадлежностью к двум разным пулам). Из них в 19 случаях популяция состояла из пула МБТ с *gyrA* дикого типа и пула МБТ с единичными мутациями в *gyrA*. В остальных случаях (27, если включать 15 случаев со сдвоенными мутациями, для которых не получены данные в динамике) популяция МБТ была представлена двумя пулами МБТ с разными мутациями в *gyrA*.

В семи случаях популяция МБТ в одном пациенте была представлена тремя пулами с разной структурой *gyrA*. В шести случаях один из пулов МБТ был с *gyrA* дикого типа и два — с различающимися мутациями в *gyrA*, а в одном случае — все три пула МБТ имели различающиеся мутации в *gyrA*. Сосуществование в пациенте трех пулов МБТ с разной структурой *gyrA* в пяти из семи случаев было доказано наблюдениями в динамике.

У двух пациентов можно было предположить наличие четырех пулов МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*, когда из двух образцов диагностического материала были выделены в одном случае чувствительные МБТ,

в другом случае выявлены три мутации в *gyrA*. Так как сложно предположить, что в результате независимых последовательных процессов спонтанного мутагенеза возникнет сразу три мутации в одном участке гена, логично предположить существование трех независимых пулов МБТ с разными мутациями.

Как правило, смешанные популяции МБТ выделяли от ранее леченых больных (40/55, 72,73%, 95% ДИ: 59,77–82,72), в основном это были МБТ с МЛУ (45/55, 81,82%, 95% ДИ: 69,67–89,81). Но в 2/55 случаях смешанные популяции МБТ были выделены от впервые выявленных больных и характеризовались монорезистентностью к левофлоксацину.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для изучения разнообразия мутаций в QRDR гена *gyrA* МБТ было проведено ретроспективное исследование, охватывающее значительное число случаев туберкулеза за период 2011–2019 гг.

Из восьми выявленных мутантных вариантов семь относились к высоко достоверным для формирования устойчивости к фторхинолонам [8]. Преобладающими были мутации D94G и A90V, что характерно для мировой популяции в целом [6, 7]. Установленная нами частота встречаемости этих мутаций (40,42% для D94G и 21,26% для A90V) была несколько выше, чем в общемировой популяции (21–32% и 13–20% соответственно) [6].

В представленном исследовании показано, что наличие мутаций в QRDR *gyrA* в большинстве случаев было ассоциировано с фенотипической устойчивостью к фторхинолонам, однако в единичных случаях при выявлении мутаций в *gyrA* МБТ устойчивость к фторхинолонам культуральным методом не установлена, что при проведении дополнительных исследований было объяснено гетерорезистентностью популяции МБТ. Известно, что, если при определении фенотипической и генотипической чувствительности к фторхинолонам доля одного из штаммов в смеси составляет менее 5%, его генотип и фенотип не определяется и результат исследования отражает характеристику доминирующего в смеси штамма [11]. Это важно учитывать при интерпретации несовпадения результатов определения чувствительности к фторхинолонам культуральным и молекулярно-генетическими методами, так как нельзя исключить или изначально низкое содержание в смеси клеток МБТ одного из генотипов, или вероятность неравномерного распределения клеток МБТ с разным генотипом между пробами, взятыми для молекулярно-генетических и культуральных исследований.

При выявлении мутации в *gyrA* D94A в 24-х из 73-х случаев (32,88%) МБТ были фенотипически чувствительны к левофлоксацину. Такой высокий процент сложно объяснить невыявленной гетерорезистентностью и ошибками культурального или генотипического тестирования. Кроме того, в других исследованиях тоже были описаны случаи, когда генотип *gyrA*_D94A соответствовал чувствительному фенотипу: в зависимости от исследованной популяции, фенотипическая чувствительность к фторхинолонам была отмечена у одного из семи и у четырех из 12 штаммов МБТ с этой мутацией [12, 13]. Следовательно, можно заключить, что мутация D94A, несмотря на то, что относится к высокодостоверным для формирования резистентности, не строго ассоциирована с устойчивостью к фторхинолонам.

Существует мнение, что широкое применение препаратов фторхинолонового ряда для терапии инфекций нетуберкулезной этиологии может приводить к возникновению устойчивости к фторхинолонам у больных с невыявленным туберкулезом [14]. В этом аспекте важно было оценить характер резистентности МБТ, устойчивых к фторхинолонам: ассоциация этого параметра с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя может служить индикатором того, что устойчивость к фторхинолонам развивается при терапии МЛУ-ТБ, а выявление случаев моноустойчивости к фторхинолонам, особенно у впервые выявленных больных, — индикатором формирования устойчивости МБТ к фторхинолонам при терапии других инфекционных заболеваний. Нами было показано, что генотипическая устойчивость МБТ к фторхинолонам в подавляющем большинстве случаев была ассоциирована с МЛУ: 649 из 694 (93,52%) изолятов с единичными мутациями в *gyrA* и 45 из 55 (81,00%) случаев смешанных популяций относились к категории МЛУ.

Полученные результаты доказывают, что формирование устойчивости к фторхинолонам у МБТ происходит в рамках терапии МЛУ-ТБ. Однако мы не можем исключить развитие устойчивости к фторхинолонам на фоне лечения нетуберкулезных заболеваний, так как МБТ с монорезистентностью к фторхинолонам тоже были выявлены. К сожалению, у нас отсутствуют данные, подтверждающие, что эти больные ранее получали терапию препаратами фторхинолонового ряда.

Изучение структуры геномов МБТ, циркулирующих в Самарской области, проведенное с использованием полногеномного секвенирования, позволило авторам заключить, что устойчивость к фторхинолонам МБТ скорее приобретают в процессе терапии, а случаи заражения человека устойчивыми к фторхинолонам клонами МБТ — редки. На основании этого наблюдения было сделано предположение, что развитие устойчивости к фторхинолонам приводит к снижению фитнеса МБТ [13]. В популяционном исследовании распространения первичной устойчивости МБТ к фторхинолонам на территории Новосибирской области также было показано, что формирование устойчивости к фторхинолонам происходит в большей степени в результате использования препаратов этой группы в химиотерапии МЛУ-ТБ [15].

Представленные здесь данные подтверждают также, что резистентность к фторхинолонам чаще возникает в процессе терапии: МБТ с мутациями в *gyrA* чаще выделяли от ранее леченых больных туберкулезом, чем от впервые выявленных. Однако нами было установлено, что и от впервые выявленных больных туберкулезом могут быть выделены устойчивые к фторхинолонам МБТ. В этом случае преобладающими мутациями в *gyrA* были D94G и A90V, причем частота встречаемости мутации A90V у МБТ, выделенных от впервые выявленных больных, была достоверно выше, чем среди ранее леченых, из чего можно заключить, что МБТ с этой мутацией достаточно активно передаются от человека к человеку.

Показанная нами возможность существования в одном пациенте нескольких популяций МБТ, различающихся мутациями в *gyrA*, указывает на процесс формирования в популяции устойчивости к фторхинолонам. В ряде исследований также было показано, что в одном диагностическом образце может присутствовать несколько клонов МБТ, различающихся структурой *gyrA*; частота встречаемости таких образцов составляла 1—3% от общего числа, что согласуется с полученными нами результатами [16–18].

Таким образом, нами было показано, что в популяции МБТ, циркулирующих в РФ, в настоящий момент формируется устойчивость к фторхинолонам, как правило, на фоне уже существующей МЛУ. Развитие устойчивости МБТ к фторхинолонам имеет хорошие эволюционные перспективы, так как формируется на благоприятном генетическом фоне в рамках терапии туберкулеза с МЛУ возбудителя, которая обусловлена комбинацией мутаций, не снижающих фитнес МБТ [19]. Тот факт, что МБТ с мутациями в *gyrA* D94G и A90V с достаточно высокой частотой встречались и у впервые выявленных больных туберкулезом, позволяет заключить, что именно эти мутанты будут играть основную роль в распространении преШЛУ-туберкулеза на территории РФ.

ВЫВОДЫ

Ретроспективный анализ спектра мутаций в QRDR *gyrA* МБТ, выделенных в 2011–2019 гг. годах показал, что генотипическая устойчивость к фторхинолонам была выявлена у 26,96% клинических изолятов МБТ, включая случаи гетерорезистентности. Преобладали мутации D94G и A90V, частота встречаемости которых суммарно составила 62,95% от числа МБТ с единичной мутацией в гене *gyrA*. Было также показано, что эти две мутации с достаточно высокой частотой встречались у МБТ, выделенных от впервые выявленных больных (D94G — у 46,03% и A90V — у 25,10% МБТ этой группы), что подтверждает успешное распространение этих мутантных вариантов МБТ в современной популяции. Наличие мутаций в *gyrA*, как правило, было ассоциировано с фенотипической устойчивостью к левофлоксацину, кроме мутации D94A, которая сопровождалась фенотипической устойчивостью к левофлоксацину только в 67% случаев. Мутации в *gyrA* встречались в основном у МБТ с МЛУ — 93,52% штаммов с мутацией в *gyrA* также были устойчивы к рифампицину и изониазиду. Полученный результат доказывает, что устойчивость к фторхинолонам возникает в процессе лечения МЛУ-ТБ. Кроме того, в 2,31% случаев были выявлены гетерорезистентные популяции МБТ, в состав которых входило два–четыре пула МБТ с разной структурой QRDR *gyrA*. Наличие гетерорезистентности к фторхинолонам свидетельствует об активном формировании устойчивости к этой группе препаратов в современных условиях.

Литература

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization, 2022.
2. Васильева И. А., Тестов В. В., Стерликов С. А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020–2021 гг. Туберкулез и болезни легких. 2022; 100 (3): 6–12.
3. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2020.

4. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol*. 2020; 128 (6): 1547–67.
5. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*. 2018; 23 (12): 1098–1113.
6. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0120470.
7. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67 (4): 819–31.
8. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009; 6 (2): e2.
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB System. 2006.
10. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2018.
11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
12. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59 (5): 866–73.
13. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
14. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3 (7): 432–42.
15. Батыршина Я. Р., Петренко Т. И., Филимонов П. Н. Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области: результаты популяционного исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15 (1): 56–65.
16. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1767–72.
17. Duong DA, Nguyen TH, Nguyen TN, Dai VH, Dang TM, Vo SK et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (11): 4835–9.
18. van Doorn HR, An DD, de Jong MD, Lan NT, Hoa DV, Quy HT, et al. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12 (7): 736–42.
19. Эргешов А., Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Черноусова Л. Н. Спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* отражает трансмиссивность мутантных клонов. *Молекулярная биология*. 2017; 51 (4): 595–602.

References

1. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization, 2022.
2. Vasilyeva IA, Testov VV, Sterlikov SA. Tuberculosis Situation in the Years of the COVID-19 Pandemic – 2020-2021. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2022; 100 (3): 6–12. Russian.
3. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2020.
4. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol*. 2020; 128 (6): 1547–67.
5. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*. 2018; 23 (12): 1098–1113.
6. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0120470.
7. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67 (4): 819–31.
8. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009; 6 (2): e2.
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB System. 2006.
10. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization. 2018.
11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
12. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59 (5): 866–73.
13. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
14. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3 (7): 432–42.
15. Батыршина ЯР, Петренко ТИ, Филимонов ПН. Лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области: результаты популяционного исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15 (1): 56–65. Russian.
16. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 1767–72.
17. Duong DA, Nguyen TH, Nguyen TN, Dai VH, Dang TM, Vo SK et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53 (11): 4835–9.
18. van Doorn HR, An DD, de Jong MD, Lan NT, Hoa DV, Quy HT et al. Fluoroquinolone resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* with locked nucleic acid probe real-time PCR. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12 (7): 736–42.
19. Эргешов А, Андреевская СН, Ларионова ЕЕ, Смирнова ТГ, Черноусова ЛН. The Spectrum of Mutations in Genes Associated with Resistance to Rifampicin, Isoniazid, and Fluoroquinolones in the Clinical Strains of *M. tuberculosis* Reflects the Transmissibility of Mutant Clones. *Mol Biol (Mosk)*. 2017; 51 (4): 595–602. Russian.

КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОФАГА VB_SAUM-515A1 И АНТИБИОТИКОВ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ИЗОЛЯТЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*Н. К. Абдраймова, М. А. Корниенко , Д. А. Беспятых, Н. С. Купцов, Р. Б. Горodничев, Е. А. Шитиков

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

Поиск новых вариантов терапии инфекционных заболеваний, вызванных *Staphylococcus aureus* с множественной лекарственной устойчивостью, на сегодняшний день является приоритетной задачей. В качестве одной из перспективных альтернатив классической антибиотикотерапии может быть рассмотрена комбинация антибиотиков с вирулентными (литическими) бактериофагами. Целью работы было оценить результат совместного воздействия литического бактериофага vB_SauM-515A1 семейства *Herelleviridae* и антибиотиков различных классов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*. Штаммы ($n = 4$) относятся к клинически значимым сиквенс-типам ST1, ST8, ST121 и характеризуются множественной лекарственной устойчивостью. Эффективность комбинированного воздействия двух антибактериальных агентов оценивали при сравнении значений оптической плотности опытных и контрольных образцов после 24 ч инкубации. Наличие взаимодополняющих эффектов было показано при совместном использовании бактериофага с оксациллином, тетрациклином и линезолидом, по сравнению с использованием каждого из агентов по отдельности. Эффективность повышалась в основном в рамках подобранных оптимальных значений множественности инфекции. Антагонистические эффекты комбинации фага и антибиотиков не были выявлены. Таким образом, вирулентный бактериофаг vB_SauM-515A1 можно рассматривать в качестве возможного вспомогательного терапевтического агента против устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: бактериофаговая терапия, *Staphylococcus aureus*, *Herelleviridae*, комбинированное воздействие, гентамицин, тетрациклин, ванкомицин, оксациллин, линезолид, левофлоксацин

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.

Благодарности: авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за помощь в секвенировании бактериальных генов для мультилокусного секвенирования-типирования штаммов.

Вклад авторов: Н. К. Абдраймова, М. А. Корниенко — план исследования, набор и обработка данных, написание статьи; Д. А. Беспятых — обработка данных, Н. С. Купцов — набор данных; Р. Б. Горodничев — план исследования и обработка данных; Е. А. Шитиков — обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

 **Для корреспонденции:** Мария Андреевна Корниенко
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; kornienkomariya@gmail.com

Статья получена: 23.09.2022 **Статья принята к печати:** 18.10.2022 **Опубликована онлайн:** 26.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.052

COMBINED EFFECTS OF BACTERIOPHAGE VB_SAUM-515A1 AND ANTIBIOTICS ON THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CLINICAL ISOLATESAbdraimova NK, Kornienko MA , Bespiatykh DA, Kuptsov NS, Gorodnichev RB, Shitikov EA

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

Currently, the search for new therapy options for infectious diseases caused by multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* is a priority. Combining antibiotics with virulent (lytic) bacteriophages may be considered a viable alternative to conventional antibiotic therapy. The study was aimed to assess the combined effects of the lytic bacteriophage vB_SauM-515A1 of *Herelleviridae* family and antibiotics of various classes on the *Staphylococcus aureus* clinical strains. Strains ($n = 4$) belong to the clinically significant sequence types ST1, ST8, ST121 and are characterized by multidrug resistance. Efficiency of the combination use of two antibacterial agents was assessed by comparison of optical densities of the test samples and controls after 24 hrs. of incubation. Mutually enhancing activities of bacteriophage used in combination with oxacillin, tetracycline and linezolid were revealed, in contrast to the separate use of each agent. Efficiency generally increased with the selected optimum multiplicity of infection values. No antagonism was revealed when combining the phage with antibiotics. Thus, virulent bacteriophage vB_SauM-515A1 can be considered as a possible auxiliary therapeutic agent for antimicrobial-resistant strains of *Staphylococcus aureus*.


Keywords: bacteriophage therapy, *Staphylococcus aureus*, *Herelleviridae*, combined effects, gentamicin, tetracycline, vancomycin, oxacillin, linezolid, levofloxacin

Funding: the study was funded by the Russian Science Foundation, project number 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Russian Federal Medical Biological Agency, for bacterial gene sequencing required for multilocus sequence typing of the strains.

Author contribution: Abdraimova NK, Kornienko MA — study plan, data acquisition and processing, manuscript writing; Bespiatykh DA — data processing, Kuptsov NS — data acquisition; Gorodnichev RB — study plan, data processing; Shitikov EA — data processing, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the sanitary and hygienic guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; sanitary and hygienic guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments № 1 to the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; sanitary and hygienic guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPiN 2.1.7.2790-10); Federal Clinical Guidelines "Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice".

 **Correspondence should be addressed:** Maria A. Kornienko
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; kornienkomariya@gmail.com

Received: 23.09.2022 **Accepted:** 18.10.2022 **Published online:** 26.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.052

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) — патогенный микроорганизм, вызывающий серьезные инфекционные заболевания кожи и мягких тканей, а также инвазивные инфекции, такие как пневмония, эндокардит, остеомиелит и другие [1]. Терапия подобных заболеваний затруднена в связи с широким распространением штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), среди которых наиболее клинически значим метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA, от англ. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*). В 2019 г. из-за проблемы антибиотикоустойчивости умерло около 4,95 млн человек; одной из ведущих причин летальных исходов были стафилококковые инфекции, причем на метициллин-устойчивые штаммы пришлось более 100 000 смертей [2]. В России на 2020 г. доля бактерий рода *Staphylococcus*, устойчивых к таким антибиотикам, как тетрациклин, гентамицин, эритромицин и оксациллин, составила 15–25%, а к левофлоксацину и ципрофлоксацину подавляющее большинство штаммов проявляли промежуточный уровень устойчивости [3]. В последнее время зафиксированы отдельные случаи возникновения устойчивости к ванкомицину и линезолиду, являющихся препаратами выбора в терапии MRSA-инфекций [4, 5]. Подобная статистика подчеркивает необходимость поиска альтернативных антимикробных агентов, в качестве которых могут быть рассмотрены препараты бактериофагов [6, 7].

Бактериофаги (фаги) — вирусы, естественным путем заражающие клетки прокариот. В качестве терапевтических агентов используют только вирулентные (литические) фаги, что необходимо для исключения возможной передачи детерминант антибиотикоустойчивости, а также генов бактериальных токсинов посредством горизонтального переноса [8]. Фаговые препараты имеют ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками. Так, вирулентные бактериофаги способны вызывать лизис бактерий вне зависимости от их чувствительности к антибиотикам, что делает фаги мощным средством борьбы с устойчивыми штаммами. Другое преимущество — в отсутствии побочных эффектов на организм пациента, что позволяет безопасно применять препараты на основе вирулентных бактериофагов даже в сложных клинических случаях [9].

В настоящее время использование бактериофагов является одним из многообещающих подходов в лечении стафилококковых инфекций, вызванных штаммами с МЛУ [10]. Успешность их применения подтверждена клиническими экспериментами как на животных моделях [11], так и на человеке [12]. Отдельно стоит отметить эффективность использования препаратов бактериофагов против биопленок, образуемых золотистыми стафилококками [10].

Наиболее перспективной стратегией терапии заболеваний, вызванных штаммами с лекарственной устойчивостью, представляется комбинированное использование бактериофагов и антибиотиков [13, 14]. В ряде публикаций для различных патогенов показано, что совместное применение полулетальных доз антибиотиков и бактериофагов эффективнее, чем их отдельное использование [13, 15]. Впервые положительный эффект такой комбинации был описан в 2007 г. [13]. В настоящее время показано, что совместное использование бактериофага и антибиотика может также приводить к нейтральным и отрицательным эффектам [16, 17].

Повышение эффективности при совместном использовании (взаимодополняющее влияние) антибактериальных агентов можно объяснить наличием

одного из эффектов — аддитивного или синергетического. При аддитивном эффекте более активное подавление роста клеток достигается за счет суммирования антибактериального действия агентов. При синергизме эффективность комбинации значительно выше, чем при использовании каждого компонента индивидуально и их суммы. В случае нейтрального эффекта результат совместного использования препаратов значимо не отличается от результата действия хотя бы одного из антимикробных агентов. При антагонизме действие одного агента может подавлять действие другого. Надо отметить, что антагонистическое взаимное воздействие бактериофагов и антибиотиков показано лишь в единичных случаях [17].

На сегодняшний день описываемые эффекты обнаружены при комбинированном применении бактериофагов и некоторых антибиотиков (ванкомицина, даптомицина, оксациллина) против *S. aureus* [12, 17]. Однако, учитывая генетическую и фенотипическую гетерогенность патогена и даже лабораторных штаммов, для выявления закономерностей возникновения того или иного результирующего эффекта важно проверять пригодность потенциальных пар фаг-антибиотик на большом наборе бактериальных изолятов.

Целью настоящей работы было оценить эффект комбинированного воздействия литического бактериофага семейства *Herelleviridae* и антибиотиков различных классов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* с МЛУ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы

В исследовании использовали штаммы *S. aureus* (SA64, SA413, SA1050 и SA515/1) из коллекции лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России. Культивирование бактерий проводили в течение 18–24 ч на питательной среде LB (от англ. *lysogeny broth*) (Oxoid; Великобритания) при температуре 37 °С. Типирование штаммов проводили методом мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) с использованием стандартной схемы [14]. Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков проводили методом серийных разведений в соответствии с стандартами CLSI [18]. МИК определяли для шести антибиотиков: оксациллина, ванкомицина, гентамицина, тетрациклина, левофлоксацина, линезолида (Sigma-Aldrich; США).

Бактериофаг

Бактериофаг vB_SauM-515A1 (семейство *Herelleviridae*) был ранее выделен из коммерческого комплексного фагового препарата «Бактериофаг стафилококковый» серии P332 («Микроген»; Россия) на штамме-хозяине *S. aureus* SA515. Детальная характеристика бактериофага представлена ранее [19, 20].

Определение титра исследуемого бактериофага на тестируемых штаммах

Титр определяли методом титрования по Грация, как описано ранее [21]. Для этого аликвоты (5 мкл) десятикратных последовательных разведений препарата

бактериофага (сток 2×10^9 бляшкообразующих единиц/мл, или БОЕ/мл) наносили на поверхность чашек с полужидким LB-агаром (0,6% агара), содержащих 0,1 мл ночной культуры тестируемого штамма (10^6 колониеобразующих единиц/мл, или КОЕ/мл), и инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. Для тестируемых штаммов оценивали концентрацию фаговых частиц в БОЕ/мл. Эффективность лизиса бактериофагом исследуемых штаммов оценивали на основании расчета эффективности посева (EOP, от англ. *efficiency of plating*) [19]. EOP представляет собой отношение титра бактериофага на исследуемом штамме к титру бактериофага на штамме-хозяине (SA515/1), выраженное в процентах. Оценку эффективности посева проводили в трех повторностях.

Изучение комбинированного воздействия антибиотиков и бактериофага

Совместное воздействие антибиотиков и бактериофагов изучали как описано ранее [17]. Эксперименты проводили в плоскостонных 96-луночных планшетах (Thermo Scientific; США) в объеме 200 мкл в среде LB. Инокулировали бактериальными клетками в экспоненциальной фазе роста ($OD_{620} = 0,2$; 5×10^8 КОЕ/мл) до конечной концентрации 10^4 клеток в лунке. Бактерии инфицировали отдельно фагом в четырех различных значениях множественности инфекции (MOI, от англ. *multiplicity of infection*) (0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001), воздействовали отдельно антибиотиками, а также комбинацией двух антибактериальных агентов в различных концентрациях. Препараты антибиотиков использовали в концентрациях 1/8 МИК, 1/4 МИК, 1/2 МИК. В качестве положительного контроля использовали инокулированную питательную среду без добавления антибактериальных агентов; в качестве отрицательного — чистую среду. Динамику воздействия фагов и антибиотиков на бактерии определяли с помощью измерений оптической плотности непрерывно в течение 10 ч и после 24 ч инкубации при 37 °C с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo electron corporation; Финляндия) при 620 нм. На основании значений оптических плотностей построены кривые роста штаммов *S. aureus*, инфицированных бактериофагом при различных значениях MOI. Наличие взаимодополняющего эффекта в отдельных случаях подтверждали на основании сравнения конечных значений OD в последней точке (24 ч), как было описано ранее [15].

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Graph Pad Prism версии 8.0.1 (GraphPad Software Inc.; США) на основании данных *t*-теста. В ходе анализа сравнивали значения оптической плотности, полученные через 24 ч инкубации для проб, обработанных только одним из антимикробных агентов (антибиотик/бактериофаг) с

аналогичными значениями для проб, обработанных одновременно обоими агентами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы были охарактеризованы по сиквенс-типам (ST, от англ. *sequence type*), проверены на чувствительность к бактериофагу и антибиотикам (табл. 1). По результатам МЛСТ было показано, что штаммы *S. aureus* принадлежали к сиквенс-типам ST1, ST8 и ST121. Все образцы характеризовались МЛУ, среди них были выявлены штаммы, устойчивые к оксациллину (SA515/1), гентамицину (SA64, SA413, SA515/1), левофлоксацину (SA64, SA413) и линезолиду (SA413). К тетрациклину были устойчивы все исследуемые бактерии. Для трех штаммов выявлен промежуточный уровень устойчивости к ванкомицину и линезолиду (SA64, SA1050, SA515/1). Бактериофаг vB_SauM-515A1 вызывал лизис всех исследуемых бактерий. Наибольшая эффективность лизиса, превышающая значения для штамма-хозяина (SA515/1) более чем в 2,5 раза, показана для штаммов SA64 (267%) и SA413 (283%). Менее активно бактериофаг лизировал штамм SA1050 (72%).

Для изучения комбинированного воздействия антимикробных агентов были определены оптимальные значения MOI при помощи кривых роста бактериальных культур, инфицированных бактериофагом (рис. 1). Для штамма хозяина SA515/1 наблюдали снижение оптической плотности по сравнению с неинфицированным контролем при значении MOI, равном 0,01 и 0,001, при этом соотношение бактериофага и клеток, соответствующее MOI 0,01, к 24 ч вызывало полное подавление роста. Таким образом, наиболее интересными для исследования взаимного влияния бактериофага и антибиотика на культуру клеток штамма SA515/1 являются эксперименты с использованием MOI 0,001. Эффективность лизиса штамма SA1050 бактериофагом vB_SauM-515A1 была ниже, чем у штамма-хозяина, в связи с чем при MOI = 0,01 и MOI = 0,001 происходит лишь частичное подавление роста клеток: к 24 ч по сравнению с неинфицированным контролем оптическая плотность падает с 0,6 до 0,44 и 0,4 соответственно. Для штаммов SA413 и SA64 показана большая эффективность лизиса, чем для штамма хозяина, оптимальным соотношением vB_SauM-515A1 и клеток SA413 является MOI 0,001, а для штамма SA64 — 0,0001 и 0,00001.

Эффективность влияния комбинированного воздействия антибиотика (оксациллина, ванкомицина, тетрациклина, гентамицина, левофлоксацина и линезолида) с бактериофагом vB_SauM-515A1 оценивали для штаммов, устойчивых к выбранному антибиотику или проявляющих промежуточный уровень устойчивости. Взаимодополняющие эффекты оксациллина и бактериофага vB_SauM-515A1 рассматривали на примере единственного устойчивого

Таблица 1. Характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*

Штамм	ST	EOP	Чувствительность к антибиотикам, мкг/мл					
			Оксациллин	Ванкомицин	Гентамицин	Тетрациклин	Левофлоксацин	Линезолид
SA64	1	267%	< 0,125 (S)	8 (I)	128 (R)	64 (R)	8 (R)	4 (I)
SA413	8	283%	< 0,125 (S)	0,5 (S)	128 (R)	32 (R)	4 (R)	8 (R)
SA1050	121	72%	< 0,125 (S)	8 (I)	< 0,125 (S)	64 (R)	< 0,125 (S)	4 (I)
SA515/1	8	100%	4 (R)	8 (I)	128 (R)	32 (R)	< 0,125 (S)	4 (I)

Примечание: R — устойчивые штаммы, I — штаммы с промежуточной устойчивостью, S — чувствительные штаммы.

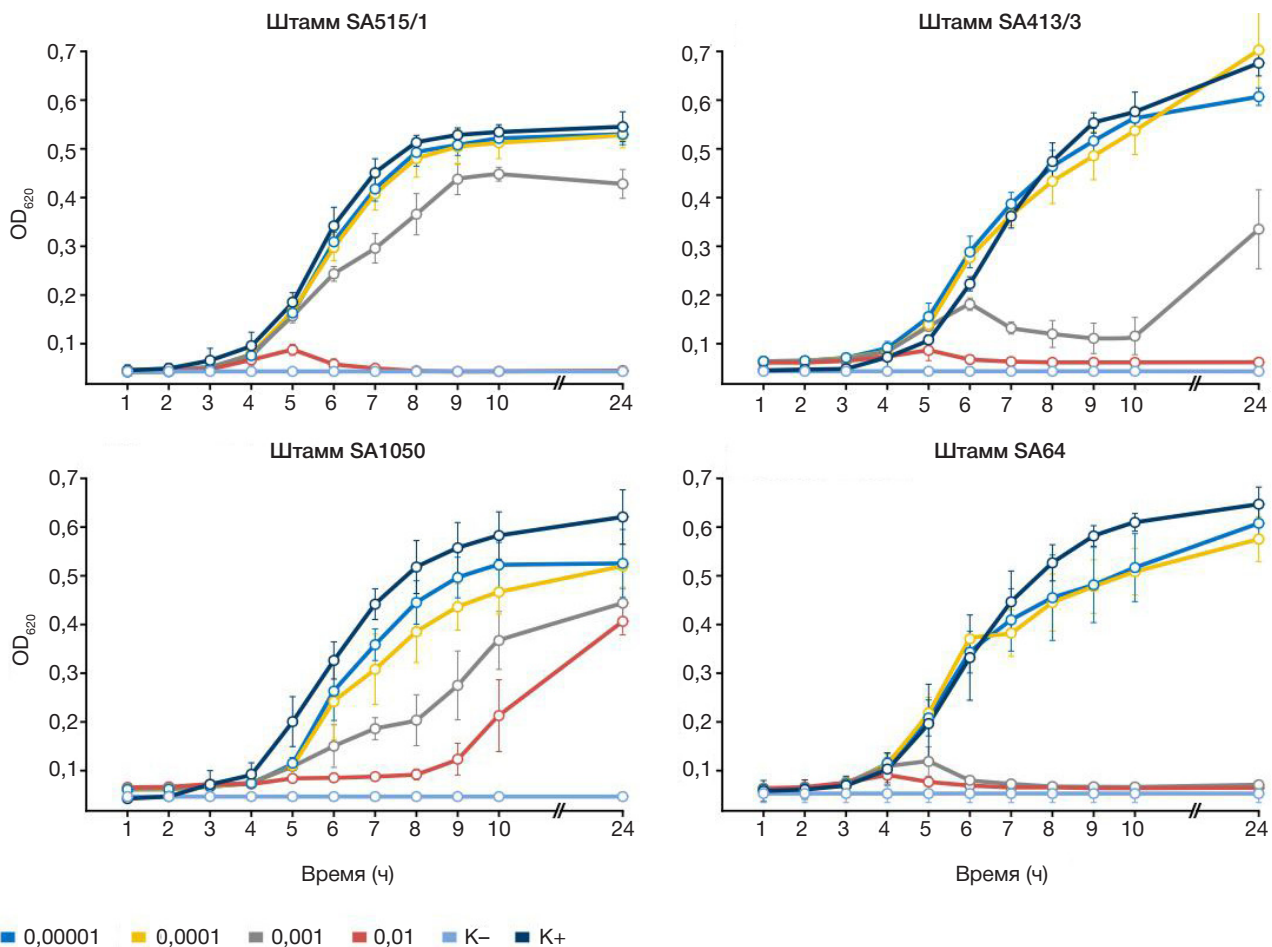


Рис. 1. Кривые роста штаммов *S. aureus*, инфицированных бактериофагом vB_SauM-515A1 при различных значениях MOI

к оксациллину штамма SA515/1. Бактериофаг усиливал действие антибиотика при оптимальном для этого штамма MOI, равном 0,001, и концентрации антибиотика 1/4 и 1/8 МИК (рис. 2, табл. 2). Похожий эффект наблюдали и для концентрации оксациллина 1/2 МИК, но данный результат статистически не достоверен.

Для других штаммов большинство случаев взаимодополняющих эффектов было зарегистрировано при совместном использовании бактериофага с тетрациклином либо линезолидом (рис. 2, табл. 2). В случае с SA64, SA413 и SA1050 данные антибиотики совместно с бактериофагом вызвали более эффективный лизис, чем каждый из антимикробных агентов по отдельности, причем в различных сочетаниях концентраций (табл. 2). Надо отметить, что взаимодополняющие эффекты чаще всего были выявлены при оптимальном значении MOI для каждого из штаммов и концентрации антибиотика в 1/2 МИК.

Взаимодополняющие эффекты при использовании бактериофага с ванкомицином, гентамицином и левофлоксацином на исследуемых штаммах *S. aureus* выявлены не были. Кроме того, ни для одного из исследуемых штаммов не были показаны эффекты антагонизма при совместном использовании антибиотика (оксациллина, ванкомицина, тетрациклина, гентамицина, линезолида и левофлоксацина) и бактериофага vB_SauM-515A1 (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое распространение инфекций, вызванных штаммами *S. aureus* с МЛУ, является серьезной проблемой

современного здравоохранения. Один из вариантов ее решения — совместное использование антибиотиков с бактериофагами. В настоящей работе для изучения комбинированного воздействия двух агентов на штаммы *S. aureus* с МЛУ был использован ранее охарактеризованный представитель семейства *Herelleviridae* — литический бактериофаг vB_SauM-515A1 [20, 22]. Стафилофаги семейства *Herelleviridae* — одни из наиболее эффективно применяемых в терапии [19]. Они облигатно вирулентны и обладают широким спектром литической активности [19]. Последнее согласуется с результатами настоящего исследования: бактериофаг vB_SauM-515A1 эффективно подавлял рост всех исследуемых штаммов *S. aureus*, принадлежащих к клинически значимым сиквенс-типам с высокой частотой встречаемости (табл. 1) [23, 24].

Для оценки комбинированного действия литического бактериофага и антибиотиков были выбраны препараты, используемые в терапии различных инфекционных заболеваний, вызванных стафилококками (оксациллин, ванкомицин, гентамицин, тетрациклин, левофлоксацин, линезолид) [25, 26]. Вышеперечисленные антибиотики относятся к разным классам, для каждого из которых характерен свой механизм действия на бактериальную клетку. Важно отметить, что в работе были исследованы препараты как с бактериостатическим (тетрациклин, гентамицин, линезолид), так и с бактерицидным действием (оксациллин, ванкомицин, левофлоксацин). Исследуемые штаммы в большинстве случаев были устойчивы к данным антибиотикам.

В настоящем исследовании были выявлены случаи взаимодополняющего эффекта препаратов (оксациллина,

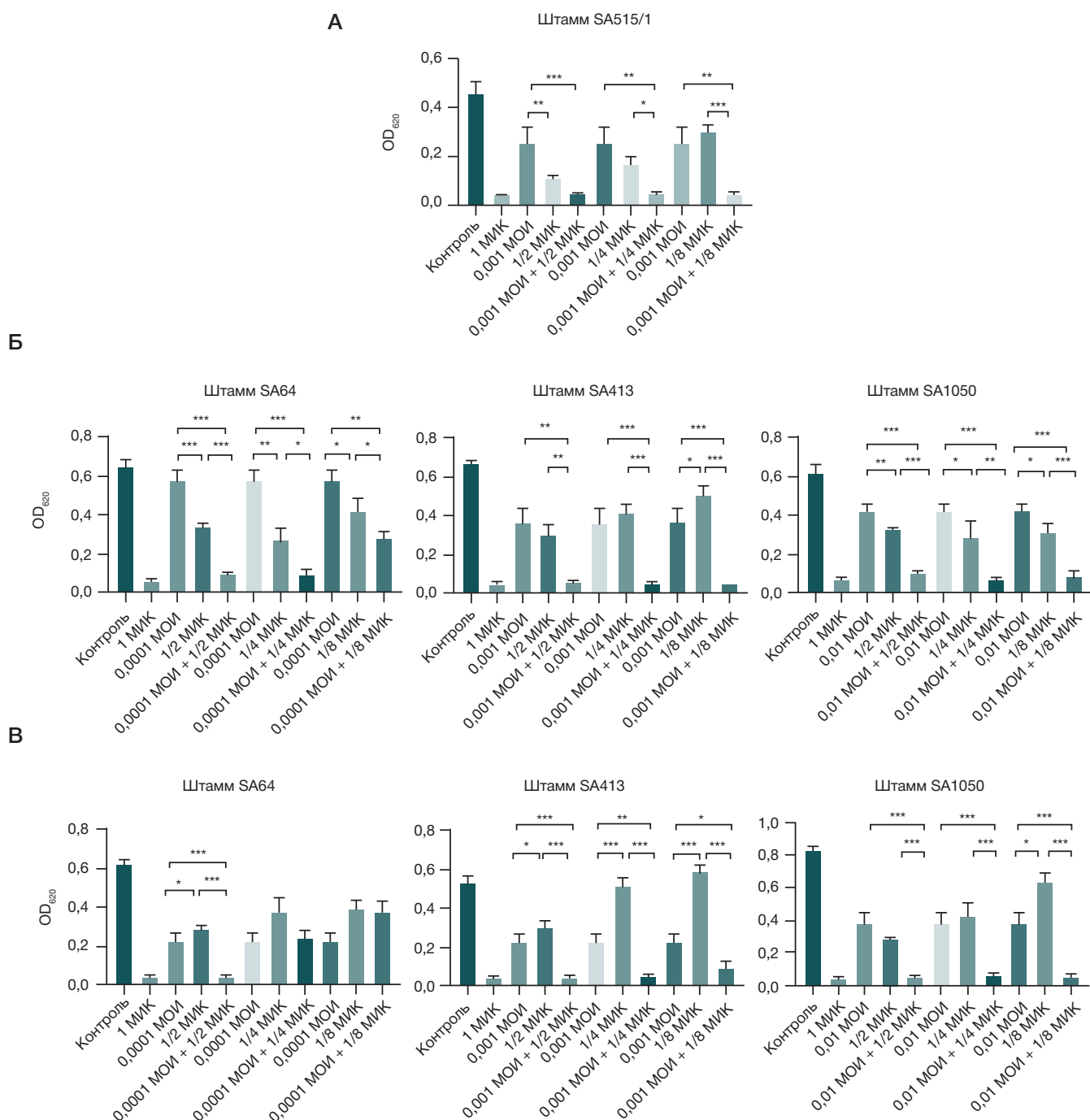


Рис. 2. Комбинированное воздействие литического бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков (оксациллина (**А**), тетрациклина (**Б**), линезолида (**В**)) на штаммы *S. aureus* при оптимальных значениях MOI. Статистическая значимость: * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$

тетрациклина, линезолида) и бактериофага vB_SauM-515A1, что согласуется с работами других авторов. Так, для оксациллина и линезолида ранее было показано, что совместное применение препаратов с литическим бактериофагом Sb-1 в большинстве случаев более эффективно ингибировало рост штаммов *S. aureus* [17, 25]. В свою очередь комбинация тетрациклина в определенной концентрации и бактериофага семейства *Herelleviridae* приводила к более эффективному подавлению роста устойчивых биопленкообразующих штаммов *S. aureus*, превосходя эффективность фага [27].

В недавно проведенном исследовании зарубежных коллег были получены противоположные результаты [28]. Авторы работы показали, что вне зависимости от типа антибиотика одновременное его использование с

литическим бактериофагом не приводит к значимому повышению эффективности ингибирования роста бактерий. Подобное расхождение можно объяснить зависимостью результата от использованного штамма бактерии-мишени [9]. Так, в настоящей работе комбинированное воздействие тетрациклина и линезолида с фагом на штамм SA515/1 не приводило к подавлению роста, в то время как при действии этих же комбинаций на другие штаммы взаимодополняющий эффект присутствовал.

При обнаружении положительных эффектов комбинированного использования антибиотиков и бактериофагов важным фактором является подбор оптимальных полулетальных концентраций обоих агентов. При соответствующих концентрациях вероятнее всего происходит суммирование их антибактериальных

Таблица 2. Результирующий эффект комбинированного воздействия различных концентраций бактериофага vB_SauM-515A1 и антибиотиков на клинические штаммы *S. aureus*

Штамм	MOI	Оксациллин, доля МИК			Ванкомицин, доля МИК			Гентамицин, доля МИК			Тетрациклин, доля МИК			Левифлоксацин, доля МИК			Линезолид, доля МИК		
		1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2	1/8	1/4	1/2
SA64	0,00001	S																	
	0,0001										+	+	+						+
	0,001				L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	0,01				L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
SA413	0,00001	S			S														
	0,0001											+	+						+
	0,001										+	+	+				+	+	+
	0,01							L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
SA1050	0,00001	S						S						S					
	0,0001												+						
	0,001											+	+					+	+
	0,01										+	+	+				+	+	+
SA515/1	0,00001													S					
	0,0001																		
	0,001	+	+																
	0,01	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L				L	L	L

Примечание: + — взаимодополняющий эффект; пустая ячейка — отсутствие взаимодополняющего эффекта; L — полный лизис культуры бактериофагом; S — штамм чувствителен к антибиотику.

действий, что наблюдалось в ходе проводимых работ (рис. 2, табл. 2). Эффективность совместного использования бактериофагов с антибиотиками может быть также обусловлена преодолением механизмов антибиотикоустойчивости в процессе взаимодействия клетки с вирусной частицей. Ранее было показано, что литический фаг устойчивого штамма *Pseudomonas aeruginosa* использует в качестве рецептора мембранный белок порин, необходимый для оттока антибиотических препаратов. Чтобы приобрести устойчивость к фагу, бактерия вынуждена избавиться от системы эффлюкса, вновь становясь чувствительной к антибиотику [29]. Таким образом, воздействие бактериофага на клетку может обеспечивать селективный отбор клонов, повышая чувствительность бактериальной культуры к антибиотикам.

Важно отметить, что антагонизма, а именно снижения эффективности действия одного антибактериального агента (антибиотик/бактериофаг) в присутствии другого, во всех исследуемых комбинациях не наблюдалось. Низкая частота встречаемости подобных негативных случаев была показана и в других работах [17, 27].

На данный момент остается неясным, что лежит в основе взаимного воздействия фагов и антибиотиков на

бактериальную клетку. Более эффективное применение может быть обусловлено как простым суммированием действий каждого из антибактериальных агентов, так и их более сложным взаимным влиянием друг на друга, приводящим к более активному подавлению роста клеток. Для дальнейшего практического применения фагов в качестве терапевтических агентов в комбинации с антибиотиками необходимо детальное изучение причин проявления взаимодополняющих эффектов, что требует проведения дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования показывают, что комбинация литического бактериофага vB_SauM-515A1 с антибиотиками различных классов может быть более эффективна по сравнению с отдельным использованием антибактериальных агентов. Таким образом, исследуемый фаг может быть рассмотрен в качестве перспективного терапевтического агента против штаммов *S. aureus* с МЛУ. Полученные данные могут быть использованы при дальнейшем изучении эффектов комбинированного применения двух антибактериальных агентов различной природы.

Литература

- Balasubramanian D, Harper L, Shopsis B, Torres VJ. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. Pathog Dis. 2017; 75 (1): ftx005.
- Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022; 399 (10325): 629–55.
- Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: An Interactive Web Platform for Analysis of Antimicrobial Resistance Surveillance Data in Russia. Front Microbiol Frontiers Media S.A. 2021; (12): 620002.
- McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus. Yale J Biol Med. 2017; 90 (2): 269.
- Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in Staphylococci. Pharmaceuticals. 2010; 3 (7): 1988–2006.
- D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy Microorganisms. 2021; 9 (2): 261.

7. Купцов Н. С. Корниенко М. А., Городничев Р. Б., Данилов Д. И., Малахова М., В., Парфенова Т. В. и др. Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE. Вестник российского государственного медицинского университета. 2020; (3): 19–26.
8. Harper DR. Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses*. 2018; 10 (4): 177.
9. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*. 2020; 9 (3): 135.
10. Kaźmierczak N, Grygorcewicz B, Roszak M, Bochentyn B, Piechowicz L. Comparative Assessment of Bacteriophage and Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1274.
11. Prazak J, Iten M, Cameron DR, Save J, Grandgirard D, Resch G, et al. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental *Staphylococcus aureus* Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (9): 1126–33.
12. Fabijan AP, Lin RCY, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (3): 465–72.
13. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS One*. 2007; 2 (8): e799.
14. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1008–15.
15. Jansen M, Wahida A, Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14140.
16. Kebriaei R, Lev K, Morrisette T, Stamper KC, Abdul-Mutakabbir JC, Lehman SM, et al. Bacteriophage-Antibiotic Combination Strategy: an Alternative against Methicillin-Resistant Phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64 (7): e00461–20.
17. Simon K, Pier W, Krüttgen A, Horz HP. Synergy between Phage Sb-1 and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10 (7): 849.
18. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th Edition. January 2019.
19. Komienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18612.
20. Komienko M, Fisunov G, Bespiatykh D, Kuptsov N, Gorodnichev R, Klimina K, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus aureus* Kayvirus Bacteriophage vB_SauM-515A1. *Viruses*. 2020; 12 (11): 1320.
21. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol*. 2009; (501): 81–85.
22. Kuptsov N, Kornienko M, Bespiatykh D, Gorodnichev R, Klimina K, Veselovsky V, et al. Global transcriptomic response of *staphylococcus aureus* to virulent bacteriophage infection. *Viruses*. 2022; 14 (3): 567.
23. Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J Med Microbiol*. 2015; 64 (12): 1462–73.
24. Ogura K, Kaji D, Sasaki M, Otsuka Y, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, et al. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; (28): 195–202.
25. Wang L, Tkhilaishvili T, Trampuz A. Adjunctive Use of Phage Sb-1 in Antibiotics Enhances Inhibitory Biofilm Growth Activity versus Rifampin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2020; 9 (11): 1–12.
26. Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 1982; 97 (3): 344–51.
27. Dickey J, Perrot V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS One*. 2019; 14 (1): e0209390.
28. Berryhill BA, Huseby DL, McCall IC, Hughes D, Levin BR. Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci*. 2021; 118 (10): e2008007118.
29. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Reports*. 2016; 6 (1): 1–8.

References

1. Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis*. 2017; 75 (1): ftx005.
2. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399 (10325): 629–55.
3. Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: An Interactive Web Platform for Analysis of Antimicrobial Resistance Surveillance Data in Russia. *Front Microbiol Frontiers Media S.A.* 2021; (12): 620002.
4. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*. 2017; 90 (2): 269.
5. Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals*. 2010; 3 (7): 1988–2006.
6. D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy Microorganisms. 2021; 9 (2): 261.
7. Kuptsov NS, Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, et al. Efficacy of commercial bacteriophage products against ESKAPE pathogens. *Bulletin of RSMU*. 2020; (3): 18–25.
8. Harper DR. Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses*. 2018; 10 (4): 177.
9. Nikolich MP, Filippov AA. Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*. 2020; 9 (3): 135.
10. Kaźmierczak N, Grygorcewicz B, Roszak M, Bochentyn B, Piechowicz L. Comparative Assessment of Bacteriophage and Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1274.
11. Prazak J, Iten M, Cameron DR, Save J, Grandgirard D, Resch G, et al. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental *Staphylococcus aureus* Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (9): 1126–33.
12. Fabijan AP, Lin RCY, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (3): 465–72.
13. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS One*. 2007; 2 (8): e799.
14. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1008–15.
15. Jansen M, Wahida A, Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14140.
16. Kebriaei R, Lev K, Morrisette T, Stamper KC, Abdul-Mutakabbir JC, Lehman SM, et al. Bacteriophage-Antibiotic Combination

- Strategy: an Alternative against Methicillin-Resistant Phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64 (7): e00461–20.
17. Simon K, Pier W, Krüttgen A, Horz HP. Synergy between Phage Sb-1 and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10 (7): 849.
 18. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th Edition. January 2019.
 19. Komienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18612.
 20. Komienko M, Fisunov G, Bespiatykh D, Kuptsov N, Gorodnichev R, Klimina K, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus aureus* Kayvirus Bacteriophage vB_SauM-515A1. *Viruses*. 2020; 12 (11): 1320.
 21. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol*. 2009; (501): 81–85.
 22. Kuptsov N, Kornienko M, Bespiatykh D, Gorodnichev R, Klimina K, Veselovsky V, et al. Global transcriptomic response of *staphylococcus aureus* to virulent bacteriophage infection. *Viruses*. 2022; 14 (3): 567.
 23. Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J Med Microbiol*. 2015; 64 (12): 1462–73.
 24. Ogura K, Kaji D, Sasaki M, Otsuka Y, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, et al. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; (28): 195–202.
 25. Wang L, Tkhalishvili T, Trampuz A. Adjunctive Use of Phage Sb-1 in Antibiotics Enhances Inhibitory Biofilm Growth Activity versus Rifampin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2020; 9 (11): 1–12.
 26. Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 1982; 97 (3): 344–51.
 27. Dickey J, Perrot V. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS One*. 2019; 14 (1): e0209390.
 28. Berryhill BA, Huseby DL, McCall IC, Hughes D, Levin BR. Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci*. 2021; 118 (10): e2008007118.
 29. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Reports*. 2016; 6 (1): 1–8.

ГЕНОГЕОГРАФИЯ В РОССИИ И МИРЕ SNP-МАРКЕРОВ ГЕНА *LZTFL1*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19

Е. В. Балановская^{1,2}✉, И. О. Горин¹, В. С. Петрушенко¹, Д. К. Черневский¹, С. М. Кошель^{1,3}, И. И. Темирбулатов^{1,4}, В. Ю. Пылёв^{1,2}, А. Т. Агджоян¹

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

² Автономная некоммерческая организация «Биобанк Северной Евразии», Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия

Ранее была обнаружена корреляция между риском смерти от COVID-19 и этногеографическим происхождением пациента. Ген *LZTFL1* отмечается как потенциальный маркер, ассоциированный с двухкратным увеличением риска тяжелого течения COVID-19. Целью исследования было изучить пространственную изменчивость SNP-маркеров гена *LZTFL1* в коренном населении России и мира. Биоинформатическими, статистическими и картографическими методами был проведен анализ пространственной изменчивости полиморфных маркеров гена *LZTFL1* в 28 метапопуляциях (97 этносов) Северной Евразии ($n = 1980$) и 34 метапопуляциях мира ($n = 3637$). В Северной Евразии основные географические векторы изменчивости «север–юг» и «запад–восток» в целом согласуются с антропологическим вектором «европеоидность–монголоидность». Глобальная изменчивость тоже соответствует антропологии: каждый кластер коренного населения включает популяции только «своей» части света — Африки, Азии или Америки. «Индоевропейский» кластер объединяет европеоидные популяции Европы и Азии. Все четыре кластера коренного населения мира отделены друг от друга, и только огромное генетическое разнообразие народов России и сопредельных стран является мостом, связующим три части света: Европу, Азию и Америку. Создан картографический атлас пространственной изменчивости 11 SNP-маркеров *LZTFL1* в популяциях. Выявлены основные закономерности: а) мировые экстремумы приходятся на коренное население Африки и Америки; 2) Северная Евразия является переходной зоной между мировыми экстремумами, но обладает собственными закономерностями и огромным размахом изменчивости в мировом масштабе; 3) генетический ландшафт России, как правило, органично вписан в Евразийский ландшафт.

Ключевые слова: COVID-19, *LZTFL1*, SNP, геогеография, популяции, коренное население, Россия, мир

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №21-14-00363 (биоинформатический анализ, картографический анализ) и Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. академика Н. П. Бочкова (статистический анализ, интерпретация результатов, написание статьи).

Благодарности: авторы благодарят всех участников экспедиционных обследований коренного населения Северной Евразии (доноров образцов) и АНО «Биобанк Северной Евразии» за предоставление коллекций ДНК, М. В. Олькову — за участие в сборе информации о генетических вариантах, связанных с тяжестью протекания COVID-19.

Вклад авторов: Е. В. Балановская — анализ данных, написание текста, руководство исследованием; И. О. Горин, В. С. Петрушенко — биоинформатический анализ; А. Т. Агджоян, Д. К. Черневский, В. Ю. Пылёв — статистический анализ, И. И. Темирбулатов — описание фармакогенетических подходов; С. М. Кошель — картографический анализ

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова» (протокол № 1 от 29 июня 2020 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья получена: 13.09.2022 **Статья принята к печати:** 28.09.2022 **Опубликована онлайн:** 23.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.047

GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF THE *LZTFL1* SNP MARKERS ASSOCIATED WITH SEVERE COVID-19 IN RUSSIA AND WORLDWIDE

Balanovska EV^{1,2}✉, Gorin IO¹, Petrusenko VS¹, Chernevsky DK¹, Koshel SM^{1,3}, Temirbulatov II^{1,4}, Pylev VYu^{1,2}, Agdzhoyan AT¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Autonomous non-profit organization "Biobank of North Eurasia", Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

The correlation between the risk of death from COVID-19 and the patient's ethnogeographic origin has been previously detected. *LZTFL1* gene was identified as a potential marker of a two times higher risk of severe COVID-19. The study was aimed to assess spatial variation in the *LZTFL1* SNP markers in indigenous populations of Russia and the world. Spatial variation in the *LZTFL1* polymorphic markers was analyzed in 28 metapopulations (97 ethnic groups) of North Eurasia ($n = 1980$) and 34 world's metapopulations ($n = 3637$) by bioinformatics, statistical and cartographic methods. In North Eurasia, the major geographic variation vectors, North–South and West–East, are generally in line with the Caucasoid–Mongoloid anthropological vector. Global variation also corresponds to anthropological features: each cluster of indigenous populations includes only those from the place where it originates: Africa, Asia, or America. Indo-European cluster integrates Caucasoid populations of Europe and Asia. All four clusters of the world's indigenous population are separated from each other. The huge genetic diversity of Russia peoples and neighboring countries forms a bridge between three continents: Europe, Asia and America. Cartographic atlas for spatial variation in 11 *LZTFL1* markers in the populations has been created. The following major patterns have been revealed: a) the world's extrema fall on the indigenous populations of Africa and America; 2) Eurasia constitutes a transition zone between these two extrema, but has its own patterns and shows enormous scale of variation shows enormous variation on a global scale; 3) the genetic landscape of Russia tends to be seamlessly integrated into the Eurasian landscape.

Keywords: COVID-19, *LZTFL1*, SNP, gene geography, populations, indigenous people, Russia, world

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant № 21-14-00363 (bioinformatics analysis, cartographic analysis) and performed within the State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics (statistical analysis, data interpretation, manuscript writing).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to all members of the expedition survey of the North Eurasian indigenous population (sample donors) and the autonomous non-profit organization "Biobank of North Eurasia" for access to DNA collections, and Olkova MV, for her participation in gathering information on the gene variants associated with the COVID-19 severity.

Author contribution: Balanovska EV — data analysis, manuscript writing, research management; Gorin IO, Petrusenko VS — bioinformatics analysis; Agdzhoyan AT, Chernevsky DK, Pylev VYu — statistical analysis; Temirbulatov II — explanation of pharmacogenetic approaches; Koshel SM — cartographic analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol № 1 of 29 June 2020); all subjects submitted the informed consent to study participation.

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

Received: 13.09.2022 **Accepted:** 28.09.2022 **Published online:** 23.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.047

Пандемия COVID-19, с ее высокой смертностью и тяжелыми осложнениями, заставила мировое научное сообщество включиться в поиск ДНК-маркеров, связанных с коронавирусом инфекцией SARS-CoV-2. Поскольку тяжесть заболевания COVID-19 неодинакова у представителей разных популяций мира, международный проект COVID-19 HGI начал сбор информации о встречаемости геномных вариантов ассоциированных с тяжелым течением COVID-19 [1]. Среди них ген *LZTFL1* [2] отмечается как потенциальный маркер, связанный с двукратным увеличением риска тяжелого протекания COVID-19 [3].

Ген *LZTFL1* экспрессируется в клетках легких человека и кодирует белок, участвующий в транспорте других белков к первичным ресничкам клеток мерцательного эпителия [4]. Клиническая значимость гена *LZTFL1* была известна и ранее: он ассоциирован с синдромом Барде-Бидля 17-го типа (OMIM 615994) [5], аутосомно-рецессивным заболеванием из группы цилиопатий [6, 7]. Семь белков BBS и BBIP10 образуют стабильный комплекс, известный как BBSome, обеспечивающий транспортировку белка к цилиарной мембране [8, 9], а снижение функции *LZTFL1* может компенсировать недостаток белков BBS и восстановить подвижность ресничек [10].

В клетках легочного эпителия пациентов с COVID-19 выявлены изменения, связанные с тяжелым течением заболевания COVID-19 и ассоциированные с геном *LZTFL1* [3, 11]: изменения в области хромосомы 3p21.31, включающей ген *LZTFL1*, приводят к двукратному увеличению риска дыхательной недостаточности [12, 13] и более чем двукратному увеличению риска смерти для лиц моложе 60 лет [11]. Исследование полиморфизма одного из вариантов гена *LZTFL1* в населении Великобритании выявило связь риска смерти от COVID-19 с происхождением пациента: для больных из Южной Азии риск в 4 раза больше, чем для больных европейского происхождения. Этими различиями отчасти объясняют более высокий уровень смертности представителей южноазиатских народов в Великобритании [3].

Ассоциация гена *LZTFL1* с тяжелым течением заболевания COVID-19, терапевтический потенциал и этногеографические различия требуют изучения его межпопуляционной изменчивости в населении мира. Научный коллектив располагает информационной базой, включающей массив собственных и литературных данных о геномах народов мира, которая уже обеспечила анализ изменчивости в населении мира (и России более детально) SNP-маркеров (*rs11385942*, *rs657152*), ассоциированных с тяжелым течением COVID-19 [14], и позволяет провести аналогичное исследование для 11 SNP-маркеров *LZTFL1*.

Цель исследования — изучить пространственную изменчивость SNP-маркеров гена *LZTFL1*, ассоциированного с тяжелым течением COVID-19 [15], в народонаселении: 1) провести поиск полиморфных SNP-маркеров гена *LZTFL1*, обеспеченных информацией об их встречаемости в коренном населении мира и Северной Евразии (более детально); 2) сформировать два репрезентативных массива популяционных данных об этих SNP-маркерах; 3) провести их многомерный статистический анализ; 4) создать картографический атлас распространения полиморфных SNP-маркеров *LZTFL1* в популяциях коренного населения Северной Евразии и мира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Два исходных массива ДНК-маркеров

Массив данных о коренном населении Северной Евразии представлен популяциями 97 этносов преимущественно из России, а также из большинства постсоветских стран и Монголии. Образцы ДНК предоставлены АНО «Биобанк Северной Евразии», технология формирования выборок приведена ранее [16]: в выборки включены образцы только неродственных индивидов, все деды и бабушки которых относились к данному этносу. Образцы из географически и исторически близких популяций, но с малыми выборками, объединены в метапопуляции [17]. Результирующий массив данных о коренном народонаселении Северной Евразии включил 28 метапопуляций ($n = 1980$) со средним размером выборки 140 хромосом.

Массив данных о коренном населении других регионов мира ($n = 1657$) включает данные по широкогеномным панелям Illumina, опубликованным в научной литературе и аккумулированным в БД «GG-base» [18]. Географически и исторически близкие группы объединены в метапопуляции с целью формирования репрезентативной выборки. Итоговый набор данных о коренном населении мира ($n = 3637$) включил 34 метапопуляции (64 популяции карт).

Отбор полиморфных маркеров гена *LZTFL1*

При биоинформатическом анализе обоих массивов данных выявлено 10 SNP-полиморфизмов гена *LZTFL1*, репрезентативно представленных в коренном населении Северной Евразии и остальных регионах мира. Из них два SNP-маркера указаны как достоверно ассоциированные с COVID-19: *rs1058961* (3'-нетранслируемая область) и *rs12493471* (2-й интрон) [1]. Остальные восемь SNP-маркеров исследовали впервые: *rs11130077* (3-й интрон), *rs17078408*, *rs1860264*, *rs2191031*, *rs2236938*, *rs6441929*, *rs7614952* и *rs9842595* (2-й интрон). О маркере *rs17713054*, ассоциированном с тяжелым течением заболевания COVID-19 [3] (энхансер *LZTFL1*), отсутствует информация в БД «GG-base», поэтому его анализ проведен только для Северной Евразии.

Оценка неравновесия по сцеплению (LD R²) исследуемых 11 SNP-маркеров гена *LZTFL1* дана по массиву данных Северной Евразии (приложение, табл. 1). Для маркера *rs17713054* [3] выявлено выраженное сцепление с *rs12493471*, ассоциированным с тяжелым течением COVID-19 [1], а также с *rs2191031* и *rs11130077*.

Статистический и картографический анализ

Многомерный статистический анализ проведен по частотам тех 10 SNP-маркеров *LZTFL1*, для которых есть информация о популяциях и Северной Евразии, и мира (приложение, табл. 2, 3): для Северной Евразии — методом многомерного шкалирования (MDS) по частотам как всех 10 SNP, так и только 5 SNP, наименее сцепленных между собой (приложение, табл. 1); для мира — по частотам всех 10 маркеров методами анализа главных компонент (PCA) и MDS. MDS рассчитаны по матрицам попарных генетических расстояний Нея (d).

По частотам SNP-маркеров гена *LZTFL1* построены карты их распространения в популяциях коренного населения Северной Евразии (11 SNP-маркеров) и мира (10 SNP-маркеров) с помощью оригинального ПО

GeneGeo. На картах и в таблицах (приложение, табл. 2, 3; рис. В) указан номер каждой популяции, по которому ее легко идентифицировать. Карты созданы на основе сеточной цифровой модели, представляющей собой матрицу интерполированных значений частоты маркера в узлах регулярной сетки, вычисленных процедурой средневзвешенной интерполяции с весами, убывающими пропорционально кубу расстояния, по значениям во всех опорных точках, попавших в круг радиуса R (для Северной Евразии $R = 3000$ км, для мира $R = 4200$ км). Единые цветовая и числовая шкалы всех карт создают единство атласа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гетерогенность населения Северной Евразии по SNP-маркерам гена *LZTFL1*

Данные о частоте встречаемости отдельных SNP-маркеров в популяциях Северной Евразии представлены в табл. 2 в приложении. Но до анализа генетического ландшафта каждого из SNP-маркеров гена *LZTFL1* необходимо распознать закономерности в изменчивости всей их совокупности (рис. 1).

Наиболее важной чертой взаиморасположения популяций России и сопредельных стран на графике многомерного шкалирования (рис. 1) оказалось их следование географической изменчивости по обеим осям — «север-юг» и «запад-восток».

«Северный» кластер, объединивший самые северные популяции Западной Сибири (ненцев, манси, хантов) и Дальнего Востока (ительменов, коряков, чукчей), противостоит всем остальным кластерам, расположившимся строго по оси «запад-восток». Однако в пределах каждого из «южных» кластеров популяции не следуют их географическому положению.

«Западный» кластер включил в себя и всех восточных славян (белорусов, русских, украинцев), и финноязычные

народы России (бесермяне, карелы, коми-пермяки, мордва, удмурты).

«Урало-кавказский» кластер включил все народы Кавказа, Закавказья, Таджикистана и тюрк Урала (башкиры, поволжские татары, чувашаи), а также финноязычных марийцев, вошедших в одну метапопуляцию с чувашами.

«Мезокластер» визуализирует переход генофондов от «Западного» кластера к «Восточному», объединяя те народы Южной Сибири и Евразийской степи, генофонды которых включают как древний европеоидный пласт, так и мощные поздние наслоения монголоидного населения (алтайцы, казахи, каракалпаки, киргизы, ногайцы, сибирские татары, туркмены, узбеки, уйгуры, хакасы).

«Восточный» кластер объединил все монголоязычные народы Северной Евразии (буряты, калмыки, народы Монголии), тувинцев (до середины XX века входивших в состав Монголии) и малочисленные народы Дальнего Востока (нанайцы, нивхи, ульчи, эвены).

Аналогичный анализ, проведенный по частотам пяти наименее сцепленных ($LD R^2 < 0,2$) SNP-маркеров, выявляет такую же структуру (приложение, рис. А) за исключением перехода поволжских татар в «Западный» кластер.

В целом, общий тренд изменчивости SNP-маркеров *LZTFL1* в Северной Евразии согласуется и с географическим вектором «запад-восток», и с антропологическим вектором «европеоидность-монголоидность» (рис. 1).

Гетерогенность населения мира по SNP-маркерам гена *LZTFL1*

Глобальная изменчивость отдельных SNP-маркеров представлена в табл. 3 приложения, а закономерности по совокупности SNP-маркеров — на графиках главных компонент (рис. 2) и многомерного шкалирования (приложение, рис. Б). Поскольку полученные обоими методами результаты и структура кластеров близки, рассмотрим график главных компонент (рис. 2).

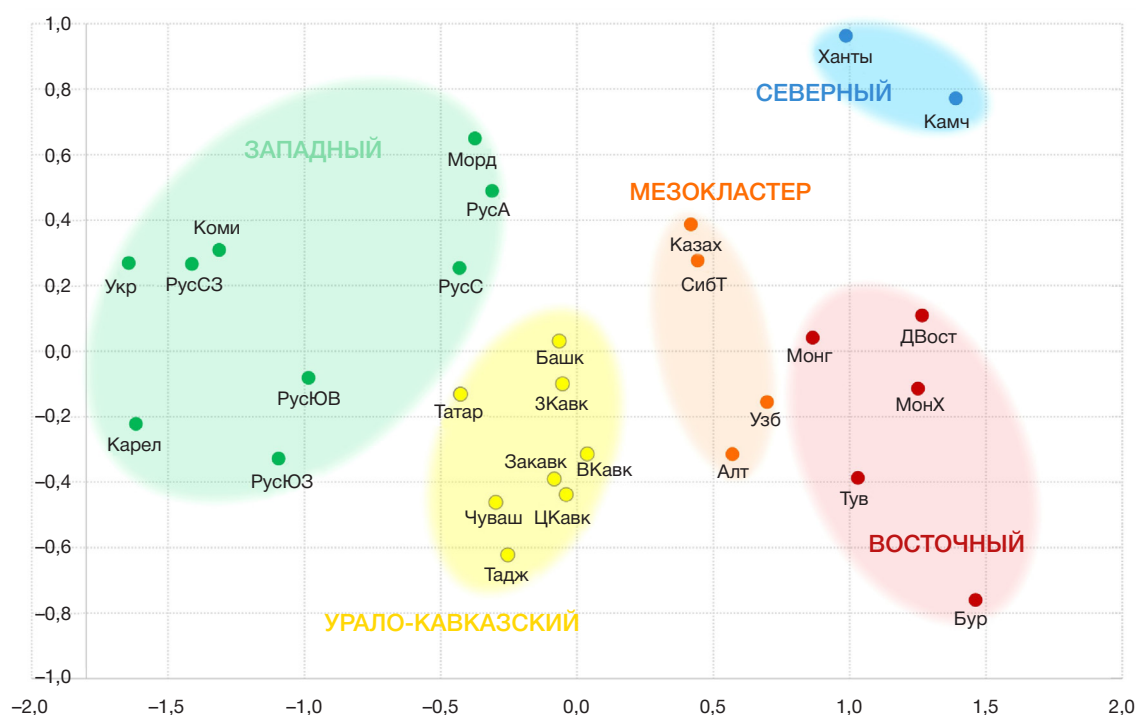


Рис. 1. Положение популяций России и сопредельных стран в генетическом пространстве многомерного шкалирования по данным о 10 SNP-маркерах гена *LZTFL1*. Примечания: график многомерного шкалирования, показатель алиенации 0,1, стресса $SO = 0,09$. Синим цветом показан «Северный» кластер; зеленым — «Западный» кластер; желтым — «Урало-Кавказский» кластер; оранжевым — «Мезокластер»; красным — «Восточный» кластер

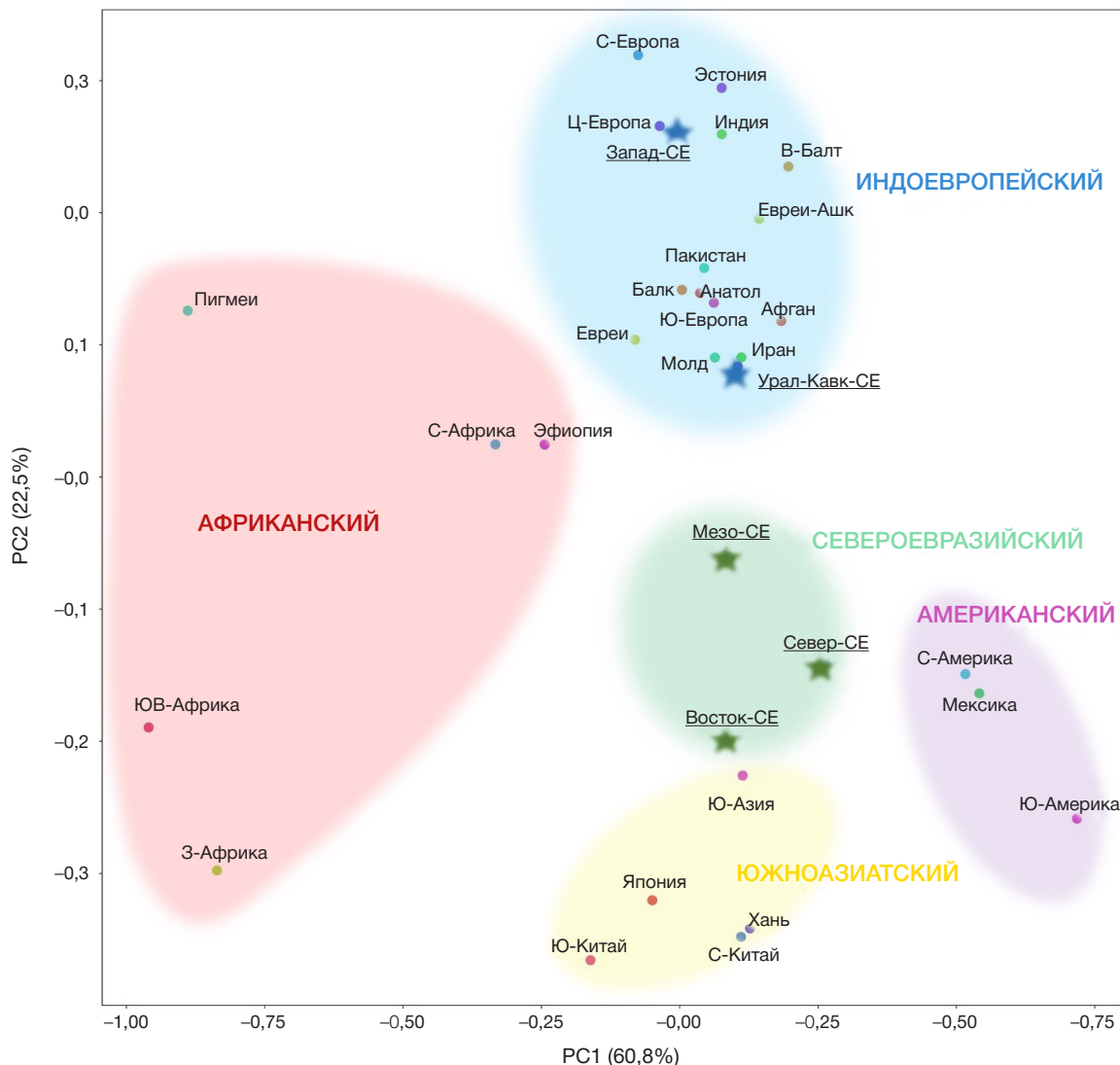


Рис. 2. Расположение популяций коренного населения мира в генетическом пространстве 1 и 2 главных компонент (ГК) изменчивости 10 SNP-маркеров гена *LZTFL1*. Звездочками отмечены пять кластеров, выделенных при многомерном шкалировании популяций России и сопредельных стран). Примечания: доля описываемой дисперсии: ГК1 (61%), ГК2 (22%). Синим цветом показан «Индоевропейский» кластер; красным — «Африканский» кластер; зеленым — «Североевразийский», желтым — «Южноазиатский», фиолетовым — «Американский»

Прежде всего бросается в глаза, насколько высока в мировом масштабе изменчивость популяций России и сопредельных стран — они не вместились ни в один из пяти кластеров в пространстве 1 и 2 главных компонент мирового генофонда (рис. 2). «Западный» кластер России расположился в верхней части «Индоевропейского» мирового кластера между популяциями Северной и Центральной Европы. «Урало-Кавказский» кластер России разместился в противоположной части «Индоевропейского» — среди популяций Передней Азии и Южной Европы. Три «азиатских» кластера Северной Евразии в генетическом пространстве мира образовали свой собственный «Североазиатский» кластер, в котором расположились в соответствии с их происхождением: «Мезокластер» России тяготеет к «Индоевропейскому» кластеру мира; «Восточный» кластер России — к «Южноазиатскому» мира; «Северный» кластер России (включивший народы Чукотки и Камчатки) близок к «Американскому».

В целом, коренное народонаселение мира распределено по четырем кластерам в соответствии с частями света, но с поправками на антропологию населения (рис. 2). Три кластера включают популяции только «своей» части света:

Африки, Азии, Америки. Но «Индоевропейский» кластер сочетает географию и историю популяций, включив европеоидные популяции не только Европы, но и Азии (Индии, Пакистана, Афганистана, Ближнего Востока).

Иными словами, основной тренд изменчивости совокупности всех SNP-маркеров гена *LZTFL1* в мире хорошо соответствует антропологическому делению населения мира. Причем все четыре кластера мира отдалены друг от друга, и лишь огромное генетическое разнообразие народов России и сопредельных стран является мостом, связующим три части света — Европу, Азию и Америку.

Геногеография 11 SNP-маркеров гена *LZTFL1* в населении России и мира

Карты не являются «иллюстрацией», а добавляют к таблицам еще два измерения географического пространства, становясь эффективным и мощным инструментом анализа. Особое достоинство этого инструментария — возможность быстро охватить огромный объем информации благодаря ее невербальному представлению. Для каждого SNP-маркера *LZTFL1* (кроме

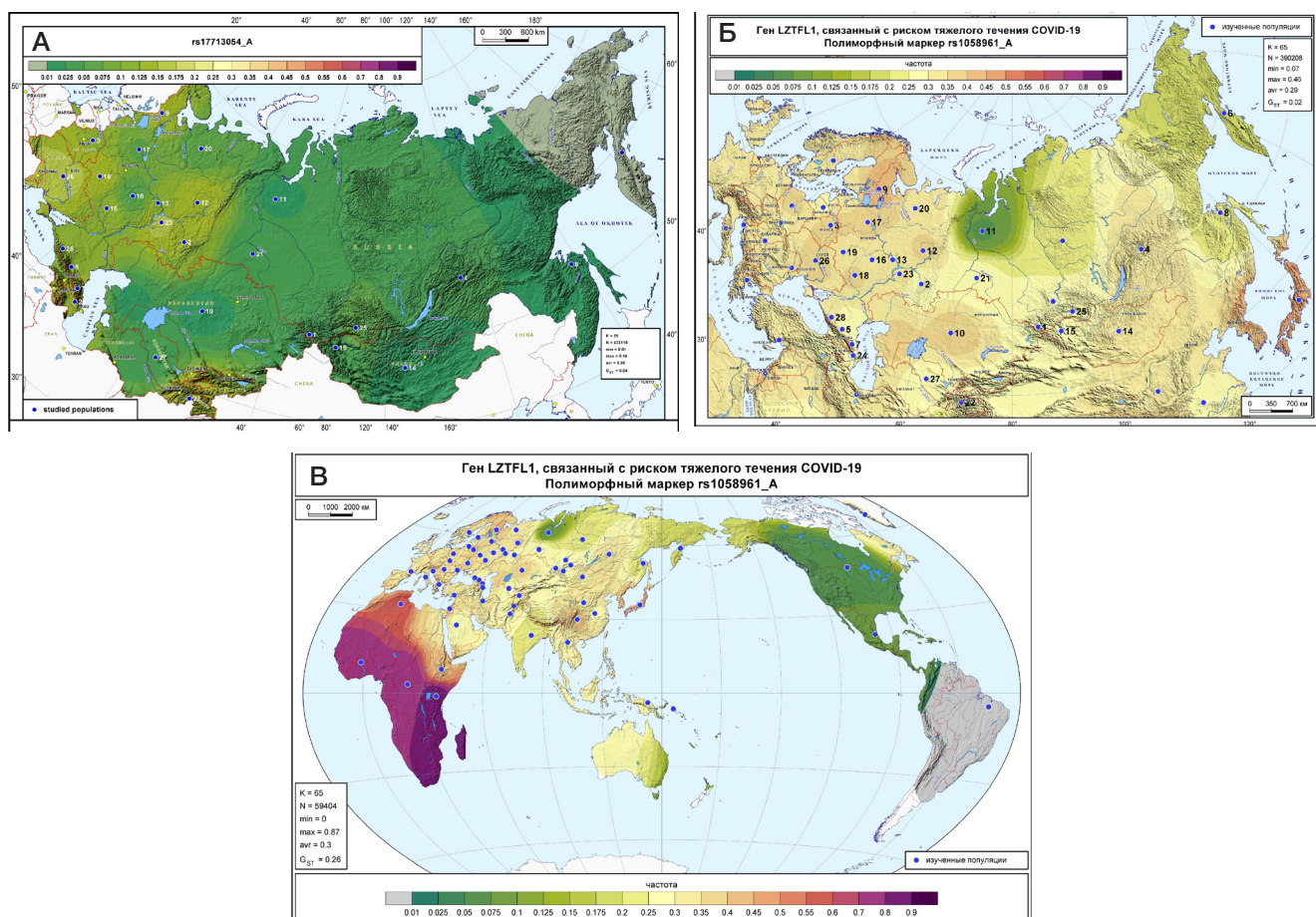


Рис. 3. Геногеографическая изменчивость частот SNP-маркеров гена *LZF1* в коренном народонаселении: 3А — изменчивость *rs17713054*(A) в населении Северной Евразии; 3Б — изменчивость *rs1058961*(A) в населении Северной Евразии; 3В — изменчивость *rs1058961*(A) в населении мира. Примечания: номера популяций на карте Северной Евразии соответствуют указанным в табл. 1 приложения, для карты мирового народонаселения — в табл. 2 и на рис.1 приложения. Для коренного населения Австралии литературные данные не найдены, и на этот регион распространяется интерполяция от Океании

rs17713054, для которого нет информации в БД мира) мы создали по две карты его изменчивости: в коренном населении Северной Евразии и мира. Их сравнение позволяет выявлять и глобальные закономерности, и не упускать из вида собственный генетический ландшафт России. Каждая из 28 метапопуляций Северной Евразии отмечена на всех картах номером, позволяющим уточнить и название метапопуляции, и частоту SNP-маркера в ней (приложение, табл. 2). Информация позволяет ориентироваться в метапопуляциях мира (приложение, табл. 3, рис. В). Карты приведены в том же порядке, что и в табл. 1 приложения.

***rs17713054*.** Пространственная изменчивость частоты *rs17713054*(A) в Северной Евразии (рис. 3А) мала, но отражает тренд «запад–восток»: как минимум на Дальнем Востоке, как максимум — в европейской части, где высокие значения частоты есть и на западе (Украина, 16%), и на северо-западе (Карелия, 14%), и в Уральском регионе (16%), и на Кавказе (14%). Поэтому можно рассматривать европейскую часть Северной Евразии как регион наиболее высокой частоты встречаемости этого SNP-маркера. Другой регион повышения частоты намечается в Таджикистане ($p = 0,15$), что может косвенно подтверждать более ранние выводы [3] о высоких частотах *rs17713054* в южных районах Азии.

***rs1058961*.** Генетический ландшафт *rs1058961*(A) в Северной Евразии (рис. 3Б) при более высокой средней частоте (30%) отражает схожую, но еще более сглаженную клинальную изменчивость снижения частоты с запада

(43% у карел и вепсов) на северо-восток (20% на Дальнем Востоке). При этом обнаружены локальные минимумы на севере Западной Сибири (8%) и локальные максимумы в Средней Азии (37%).

При сравнении с мировой изменчивостью (рис. 3В) оказывается, что генетический ландшафт Северной Евразии практически полностью вписан в общий паттерн населения мира. Снижение частоты на Дальнем Востоке плавно переходит в снижение частоты на Аляске, снижение в коренном населении Северной Америки и падение до нуля в Южной Америке. Повышенные частоты в Европе постепенно переходят в максимальные частоты (87%) в Африке. Даже локальный максимум в Японии (46%) (рис. 3Б) находит отражение в повышении частоты в Юго-Восточной Азии (42%).

***rs12493471*.** Та же клинальная изменчивость «запад–восток» в Северной Евразии обнаружена и для *rs12493471*(A) (рис. 4А), сцепленного с *rs17713054*(A) (рис. 3А; приложение, табл. 1). Но градиент падения частоты с запада на восток выражен намного ярче и четче: максимумы ($\approx 50\%$), охватывая европейскую часть России, почти не заходят за Урал. Падение частоты на востоке захватывает все регионы и снижается до нуля на Дальнем Востоке, в Японии и Китае. При этом пик частоты оказывается в Восточной Европе и Фенноскандии и снижается в Западной и Южной Европе.

Карта глобальной изменчивости (рис. 4Б) показывает, что максимум частоты в Восточной и Северной Европе является мировым максимумом — от него снижение

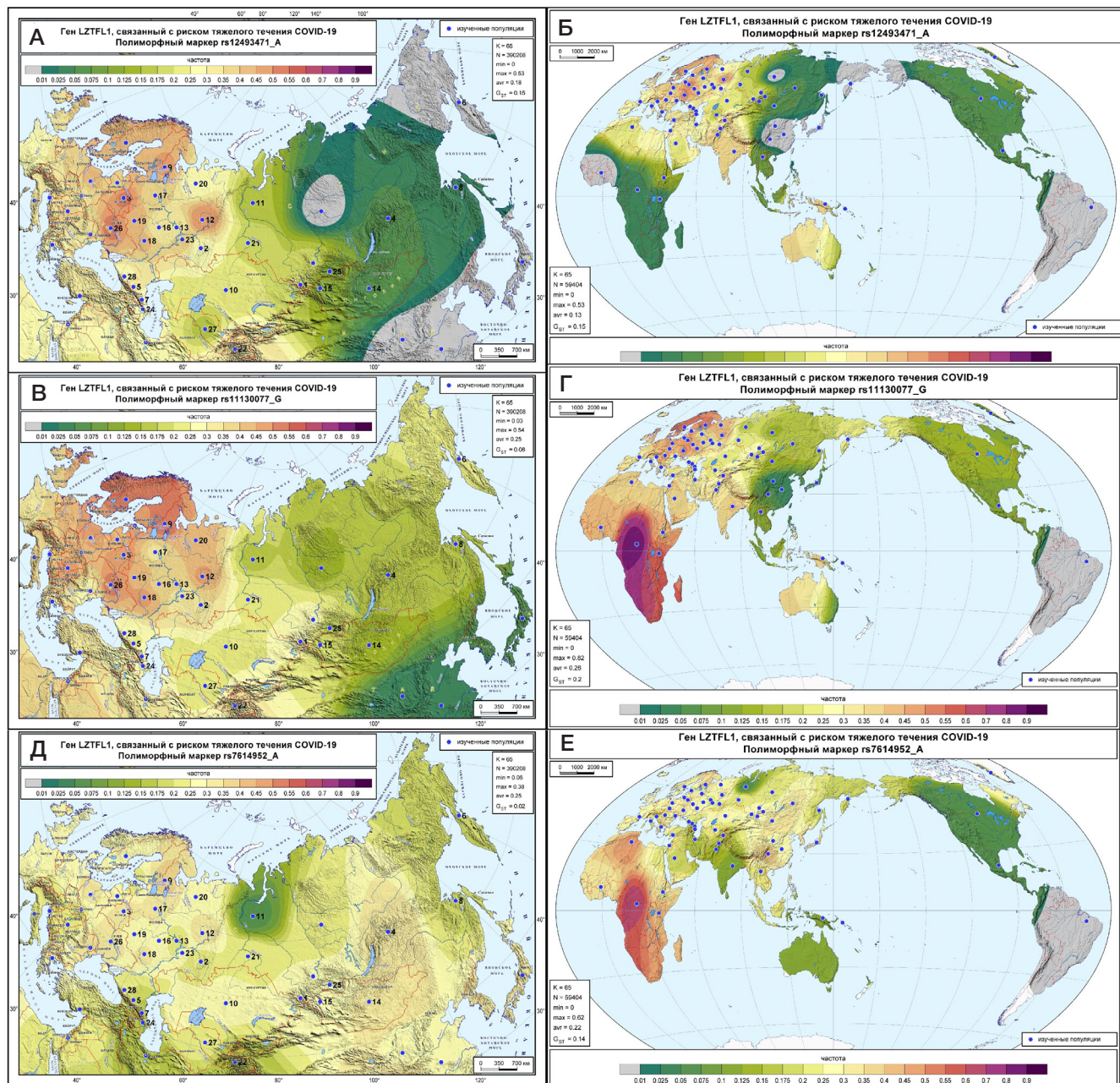


Рис. 4. Геногеографическая изменчивость частот SNP-маркеров гена *LZTFL1* в коренном народонаселении: 4А — изменчивость *rs12493471(A)* в населении Северной Евразии; 4Б — изменчивость *rs12493471(A)* в населении мира; 4В — изменчивость *rs11130077(G)* в населении Северной Евразии; 4Г — изменчивость *rs11130077(G)* в населении мира; 4Д — изменчивость *rs7614952(A)* в населении Северной Евразии; 4Е — изменчивость *rs7614952(A)* в населении мира. Примечания: номера популяций на карте Северной Евразии соответствуют указанным в табл. 1 приложения, для карты мирового народонаселения — в табл. 2 и на рис.1 приложения. Для коренного населения Австралии литературные данные не найдены, и на этот регион распространяется интерполяция от Океании

частоты идет во всех направлениях с локальными максимумами (40%) в Индостане (влияние которого доходит до Памира) и в Океании.

rs11130077. В Северной Евразии клинальная изменчивость «запад-восток» характерна и для *rs11130077(G)* (рис. 4В). Незначительные отличия связаны со смещением максимумов в Фенноскандию (54%), но они вновь не преодолевают Урал и не заходят на Кавказ. Однако в азиатской части картина не столь однозначна, как на предыдущих картах. При снижении частоты в Сибири до 16–17% на Дальнем Востоке намечается некоторое повышение частоты до 20%, а в Южной Сибири — до 27%.

Изменчивость *rs11130077(G)* в населении мира (рис. 4Г) в целом вторит предыдущей карте за одним резким исключением: мировой максимум приходится не на

Европу (53%), а на население Африки, в которой различия по этому маркеру велики: от 40% в Северной Африке до 82% у пигмеев Африки.

rs7614952. В отличие от предыдущих карт, генетический ландшафт *rs7614952(A)* (рис. 4Д) в Северной Евразии не отличается четкой закономерностью. Хотя максимальные значения по-прежнему находятся на западе региона и в направлении к Дальнему Востоку снижаются, но минимум частоты приходится на север Западной Сибири, а локальный максимум обнаружен не только в Европе, но и в Забайкалье.

В контексте мировой изменчивости (рис. 4Е) мы видим, что байкальский максимум является частью повышенных частот во всем регионе Восточной Азии. В этом наиболее яркое отличие от предыдущей карты:

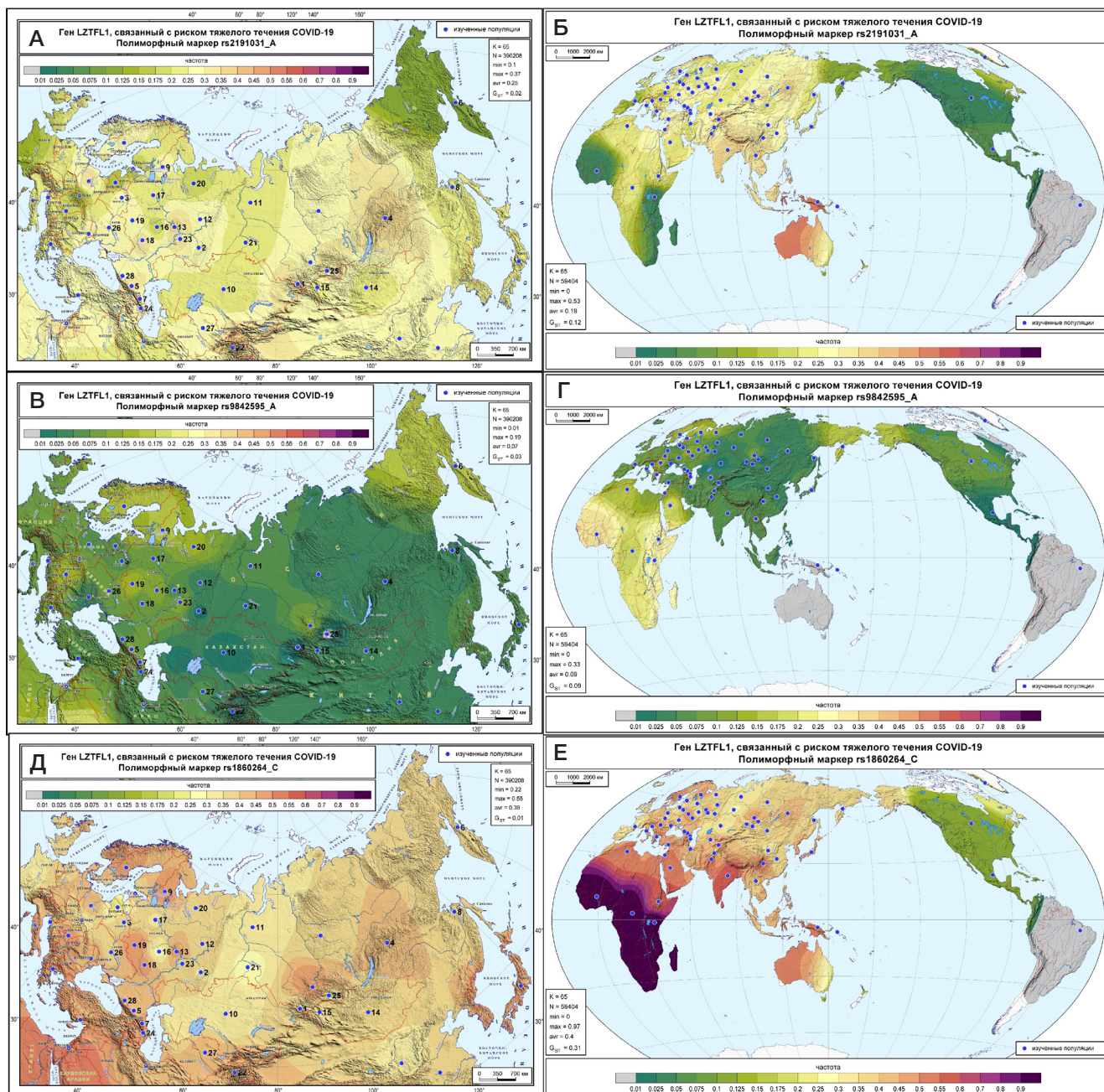


Рис. 5. Геногеографическая изменчивость частот SNP-маркеров гена *LZTFL1* в коренном народонаселении: 5А — изменчивость *rs2191031*(А) в населении Северной Евразии; 5Б — изменчивость *rs2191031*(А) в населении мира; 5В — изменчивость *rs9842595*(А) в населении Северной Евразии; 5Г — изменчивость *rs9842595*(А) в населении мира; 5Д — изменчивость *rs1860264*(С) в населении Северной Евразии; 5Е — изменчивость *rs1860264*(С) в населении мира. Примечания: номера популяций на карте Северной Евразии соответствуют указанным в табл. 1 приложения, для карты мирового народонаселения — в табл. 2 и на рис.1 приложения. Для коренного населения Австралии литературные данные не найдены, и на этот регион распространяется интерполяция от Океании

в Восточной Азии частоты *rs11130077*(G) минимальны (рис. 4Г), но по *rs7614952*(A) (рис. 4Е) они высоки. И напротив: вместо высоких частот в Индостане и Передней Азии мы видим резкое падение частоты *rs7614952*(A). Однако вновь мировой максимум находится в Африке, а мировой минимум — в Америке.

***rs2191031*.** Изменчивость *rs2191031*(A) в Северной Евразии невыразительна (рис. 5А) из-за чересполосицы локальных максимумов и минимумов. Минимум вновь находится на Дальнем Востоке (10%), а также на западе региона (18%) и в Западной Сибири (22%). Высокие частоты тянутся от Забайкалья (36%) через Южную Сибирь (34%) к Центральной Азии (36%), но характерны и для Поволжья (37%), и для Кавказа (34%).

Этот паттерн, однако, полностью вписан в ландшафт мировой изменчивости (рис. 5Б): снижение частоты в Западной Европе (16%) переходит в минимум в Западной и Восточной Африке (3%), а снижение частоты на Дальнем Востоке — в минимумы коренного населения Америки (0–4%). Максимумы юга Сибири и Центральной Азии являются частью области высоких частот Юго-Восточной и Южной Азии (35–40%), достигая мирового максимума в Океании (53%).

***rs9842595*.** Еще менее выразителен генетический ландшафт *rs9842595*(A) (рис. 5В): повышенные частоты разбросаны по Северной Евразии: на Дальнем Востоке (19%), на севере (17%) и юге (15%) Европы, в Приуралье (12%) и на Кавказе (11%).

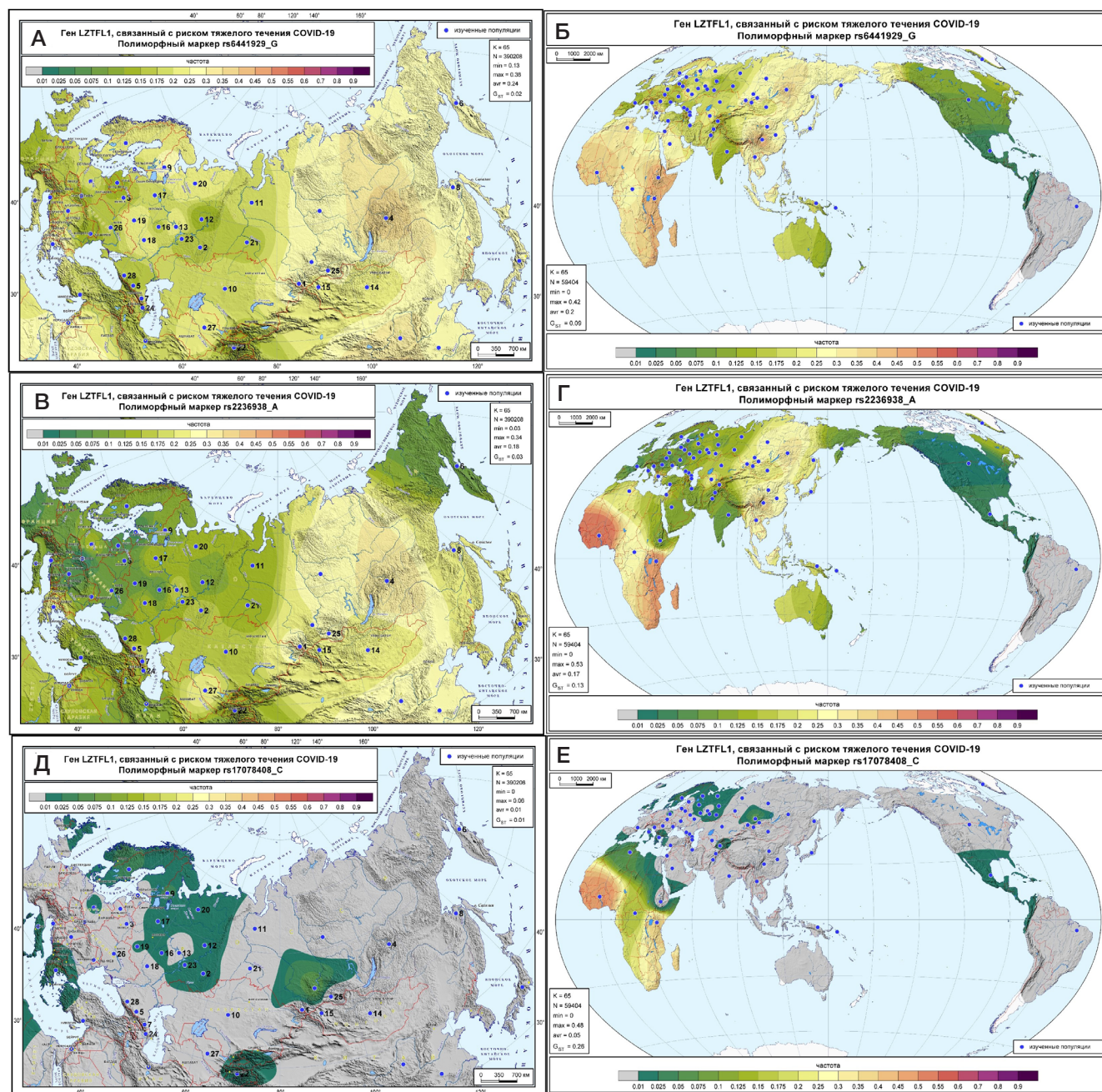


Рис. 6. Геногеографическая изменчивость частот SNP-маркеров гена *LZF1L* в коренном народонаселении: 6А — изменчивость *rs6441929(G)* в населении Северной Евразии; 6Б — изменчивость *rs6441929(G)* в населении мира; 6В — изменчивость *rs2236938(A)* в населении Северной Евразии; 6Г — изменчивость *rs2236938(A)* в населении мира; 6Д — изменчивость *rs17078408(C)* в населении Северной Евразии; 6Е — изменчивость *rs17078408(C)* в населении мира. Примечания: номера популяций на карте Северной Евразии соответствуют указанным в табл. 1 приложения, для карты мирового народонаселения — в табл. 2 и на рис.1 приложения. Для коренного населения Австралии литературные данные не найдены, и на этот регион распространяется интерполяция от Океании

Ему вторит генетический ландшафт мира (рис. 5Г), практически весь охваченный областью низких частот за исключением Африки южнее Сахары, где частота маркера повышается до 33%.

rs1860264. Частота маркера *rs1860264(C)*, напротив, нигде в Северной Евразии (рис. 5Д) не опускается ниже 22% и в целом следует общему тренду «запад–восток», хотя локальные минимумы и максимумы разбросаны в разных регионах. Так, полоса минимальных частот тянется через всю Западную Сибирь к Казахстану, но обнаруживается также в Приуралье и Прибалтике. А повышенные частоты выявлены не только на западе региона (50%), но и в Центральной Азии, Южной Сибири и в Прибайкалье (40–42%).

Карта глобального генетического ландшафта (рис. 5Е) показывает, что Евразия представляет собой постепенный переход от африканского максимума (97%) к американскому минимуму (0%).

rs6441929. Закономерность изменчивости *rs6441929(G)* вновь следует тренду «запад–восток» (рис. 6А), но наибольшие значения находятся на востоке с максимумом в Забайкалье (38%) и с минимальными частотами на Урале, Кавказе и в Прибалтике.

Такой ландшафт полностью вписан в мировой (рис. 6Б): деление Евразии на западную с низкими значениями и восточную с более высокими значениями длится на юг вплоть до границы между Индостаном и Юго-Восточной Азией. При этом Евразия в мировом масштабе не

содержит экстремумов — они вновь обнаруживаются в Африке (максимумы) и в Америке (минимумы).

rs2236938. Генетический ландшафт *rs2236938(A)* вторит предыдущему (рис. 6В). Лишь западная зона минимумов выражена более ярко и четко, а в восточной зоне высоких частот появилась зона резкого снижения частоты на северо-востоке, тяготеющая к американскому мировому минимуму.

Мировой ландшафт *rs2236938(A)*, тоже вторя предыдущему, более контрастен (рис. 6Г). В Африке частота повышается до 53%, но при этом Аравия, северная и северо-восточная Африка присоединились к западной Евразийской зоне низких частот.

rs17078408. Завершает панораму маркер, практически отсутствующий на всем мировом пространстве (рис. 6Д, Е), кроме Африки, где частота *rs17078408(C)* достигает 48%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обобщая геногеографические ландшафты всех рассмотренных маркеров гена *LZTFL1*, связанного с риском тяжелого течения COVID-19, укажем на основные закономерности: 1) мировые экстремумы наиболее характерны для коренного населения Африки и Америки и, как правило, альтернативны; 2) Евразия обычно составляет переходную зону между этими двумя экстремумами, но обладает собственными закономерностями и огромным размахом изменчивости в мировом масштабе; 3) генетический ландшафт России органично вписан в Евразийский ландшафт.

Эти основные закономерности выполняются далеко не всегда.

Из первой закономерности есть два исключения. Минимальные частоты встречаемости *rs12493471(A)* сосредоточены и в Африке, и в Америке, и в Восточной Азии, а максимумы — в Европе и Индостане. Аналогично минимумы *rs2191031(A)* встречены и в Африке, и в Америке, вся Евразия занята высокими частотами, но максимум сосредоточен в Океании. Отметим, что коренное население Америки всегда подчинено единой закономерности — низкие частоты всех рассмотренных маркеров снижаются до нуля в Южной Америке.

Из второй закономерности тоже есть исключения. Например, для *rs11130077(G)* мировой максимум характерен не только для Африки, но и для Северной Европы. Евразия является таким же сосредоточием низких частот встречаемости *rs9842595(A)*, как и Северная Америка. А евразийский ландшафт *rs6441929(G)* хотя и промежуточен между африканским и американским экстремумами, но резко противоречит понятию «переходной» зоны: максимальные частоты африканского континента граничат с минимальными частотами в Европе и Индостане, а мировой

минимум Америки граничит с высокими значениями частоты в Восточной Азии. Такая же евразийская «чересполосица» обнаружена и для *rs2236938(A)*. Наиболее характерным для Евразии оказывается деление на «запад» и «восток» по 80-му меридиану, разделяющему Индостан и Юго-Восточную Азию на юге и, постепенно размываясь, доходящему до Северного Ледовитого океана. В эту закономерность не укладываются: *rs1058961(A)* (практически вся Евразия занята высокими частотами); *rs9842595(A)* и *rs17078408(C)* (вся Евразия гомогенна по низким частотам этого маркера); *rs2191031(A)* (частота нарастает к югу, переходя в океанийский мировой максимум); слабо выражена для *rs9842595(A)*. Но для половины маркеров *LZTFL1* эта закономерность прослеживается четко.

Из третьей закономерности также есть исключения. Как правило, они связаны с локальными экстремумами — на севере Западной Сибири, на юге Средней Сибири и в Приуралье. Но в целом они не отменяют, а лишь оттеняют общую встроенность Российского генетического ландшафта в Евразийский.

ВЫВОДЫ

1. В пространственной изменчивости изученных SNP-маркеров гена *LZTFL1*, ассоциированных с тяжелым течением COVID-19, выявлены закономерности, характерные для коренного народонаселения России и мира. 2. В генетическом пространстве Северной Евразии основной закономерностью является следование географической изменчивости по двум осям: «север–юг» и «запад–восток». Этот тренд хорошо согласуется с антропологическим вектором «европеоидность–монголоидность». 3. Основной вектор глобальной изменчивости четко соответствует антропологическому делению населения мира. Кластеры коренного населения Африки, Азии и Америки включают популяции только «своей» части света. «Индоевропейский» кластер сочетает географию и историю популяций, включая европеоидные популяции и Европы, и Азии. 4. Все четыре кластера коренного населения мира отдалены друг от друга, и только огромное генетическое разнообразие народов России и сопредельных стран является мостом, связующим генофонды трех частей света — Европы, Азии и Америки. 5. Создан картографический атлас пространственной изменчивости 11 SNP-маркеров *LZTFL1* в населении Северной Евразии и мира, выявивший основные закономерности в их генетических ландшафтах: а) мировые экстремумы приходятся на коренное население Африки и Америки; б) Евразия является переходной зоной между этими двумя экстремумами, но обладает собственными закономерностями; в) генетический ландшафт России органично вписан в Евразийский ландшафт.

Литература

1. The COVID-19 Host Genetics Initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature*. 2021; 600: 472–7. DOI: 10.1038/s41586-021-03767-x.
2. COVID19-hg GWAS meta-analyses round 6. The COVID-19 Host Genetics Initiative. [cited 2022 Sep 13]. Available from: <https://www.covid19hg.org/results/r6/>.
3. Downes DJ, Cross AR, Hua P, Roberts N, Schwessinger R, Cutler AJ, et al. Identification of *LZTFL1* as a candidate effector gene at a COVID-19 risk locus. *Nat Genet*. 2021; 53: 1606–15. DOI: 10.1038/s41588-021-00955-3.
4. Воложанин Д. А., Голота А. С., Камилова Т. А., Шнейдер О. В., Щербак С. Г. Генетика COVID-19. Клиническая практика. 2021; 12 (1): 41–52. DOI: 10.17816/clinpract64972.
5. Bardet-Biedl syndrome-17; BBS17. Online Mendelian Inheritance in Man — OMIM. [cited 2021 Nov 25]. Available from: <https://omim.org/entry/615994>.

6. Waters AM, Beales PL. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26: 1039–56. DOI: 10.1007/s00467-010-1731-7.
7. Потрохова Е. А., Бабаян М. Л., Балева Л. С., Сафонова М. П., Сипягина А. Е. Синдром Барде–Бидля. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2020; 65 (6): 76–83. DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-6-76-83.
8. Seo S, Zhang Q, Bugge K, Breslow DK, Searby CC, Nachury MV, et al. A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothened. *PLoS Genet.* 2011; 7 (11): e1002358. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002358.
9. GeneCards: The Human Gene Database [Internet]. Rehovot, Israel: Weizmann Institute of Science. c1996-2022 — LZTFL1 Gene — Leucine Zipper Transcription Factor Like 1; [cited 2022 Sep 12]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LZTFL1>.
10. Klink BU, Gatsogiannis C, Hofnagel O, Wittinghofer A, Raunser S. Structure of the human BBSome core complex. *eLife.* 2020; 9: e53910. DOI: 10.7554/eLife.53910.
11. Nakanishi T, Pigazzini S, Degenhardt F, Cordioli M, Butler-Laporte G, Maya-Miles D, et al. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality. *J Clin Invest.* 2021; 131 (23): e152386. DOI: 10.1172/JCI152386.
12. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Alballos A, Invernizzi P, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *Engl J Med.* 2020; 383 (16): 1522–34. DOI: 10.1056/NEJMoa2020283.
13. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature.* 2021; 591 (7848): 92–8. DOI: 10.1038/s41586-020-03065-y.
14. Balanovsky O, Petrusenko V, Mirzaev K, Abdullaev S, Gorin I, Chernevskiy D, et al. The variation of genome sites associated with severe COVID-19 across populations the worldwide and national patterns. *Pharmgenomics Pers Med.* 2021; 14: 1391–402. DOI: 10.2147/PGPM.S320609.
15. Secolin R, de Araujo TK, Gonsales MC, Rocha CS, Naslavsky M, Marco L, et al. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population. *Hum Genome Var.* 2021; 8 (15). DOI: 10.1038/s41439-021-00146-w.
16. Балановская Е. В., Жабалин 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.
17. Горин И. О., Петрушенко В. С., Записецкая Ю. С., Кошель С. М., Балановский О. П. Применение популяционного биобанка для анализа распространенности клинически значимых ДНК-маркеров в населении России: биоинформатические аспекты. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2020; 19 (6): 2732. DOI: 10.15829/1728-8800-2020-2732
18. GG-base [cited 2022 Sep 10]. Available from: <https://gg-base.org/>.

References

1. The COVID-19 Host Genetics Initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature.* 2021; 600: 472–7. DOI: 10.1038/s41586-021-03767-x.
2. COVID19-hg GWAS meta-analyses round 6. The COVID-19 Host Genetics Initiative. [cited 2022 Sep 13]. Available from: <https://www.covid19hg.org/results/r6/>.
3. Downes DJ, Cross AR, Hua P, Roberts N, Schwessinger R, Cutler AJ, et al. Identification of LZTFL1 as a candidate effector gene at a COVID-19 risk locus. *Nat Genet.* 2021; 53: 1606–15. DOI: 10.1038/s41588-021-00955-3.
4. Vologzhanin DA, Golota AS, Kamilova TA, Shneider OV, Sherbak SG. Genetics of COVID-19. *Journal of Clinical Practice.* 2021; 12 (1): 41–52. DOI: 10.17816/clinpract64972. Russian.
5. Bardet-Biedl syndrome-17; BBS17. Online Mendelian Inheritance in Man — OMIM. [cited 2021 Nov 25]. Available from: <https://omim.org/entry/615994>.
6. Waters AM, Beales PL. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26: 1039–56. DOI: 10.1007/s00467-010-1731-7.
7. Potrokhova EA, Babayan ML, Baleva LS, Safonova MP, Sipyagina AE. Bardet–Biedl Syndrome. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii* (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics). 2020; 65 (6): 76–83. DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-6-76-83. Russian.
8. Seo S, Zhang Q, Bugge K, Breslow DK, Searby CC, Nachury MV, et al. A novel protein LZTFL1 regulates ciliary trafficking of the BBSome and Smoothened. *PLoS Genet.* 2011; 7 (11): e1002358. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002358.
9. GeneCards: The Human Gene Database [Internet]. Rehovot, Israel: Weizmann Institute of Science. c1996-2022 — LZTFL1 Gene — Leucine Zipper Transcription Factor Like 1; [cited 2022 Sep 12]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LZTFL1>.
10. Klink BU, Gatsogiannis C, Hofnagel O, Wittinghofer A, Raunser S. Structure of the human BBSome core complex. *eLife.* 2020; 9: e53910. DOI: 10.7554/eLife.53910.
11. Nakanishi T, Pigazzini S, Degenhardt F, Cordioli M, Butler-Laporte G, Maya-Miles D, et al. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality. *J Clin Invest.* 2021; 131 (23): e152386. DOI: 10.1172/JCI152386.
12. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Alballos A, Invernizzi P, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *Engl J Med.* 2020; 383 (16): 1522–34. DOI: 10.1056/NEJMoa2020283.
13. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature.* 2021; 591 (7848): 92–8. DOI: 10.1038/s41586-020-03065-y.
14. Balanovsky O, Petrusenko V, Mirzaev K, Abdullaev S, Gorin I, Chernevskiy D, et al. The variation of genome sites associated with severe COVID-19 across populations the worldwide and national patterns. *Pharmgenomics Pers Med.* 2021; 14: 1391–402. DOI: 10.2147/PGPM.S320609.
15. Secolin R, de Araujo TK, Gonsales MC, Rocha CS, Naslavsky M, Marco L, et al. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population. *Hum Genome Var.* 2021; 8 (15). DOI: 10.1038/s41439-021-00146-w.
16. Balanovska EV, Zhabagin MK, Agdjoyan AT, Chuhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA, et al. Population biobanks: Organizational models and prospects of application in gene geography and personalized medicine. *Russ J Genet.* 2016; 52 (12): 1227–43. DOI: 10.1134/S1022795416120024.
17. Gorin IO, Petrusenko VS, Zapisetskaya YS, Koshel SM, Balanovsky OP. Application of the population biobank for analysis of the distribution of the clinically significant DNA markers in the Russian populations: bioinformatic aspects. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2020; 19 (6): 2732. DOI: 10.15829/1728-8800-2020-2732. Russian.
18. GG-base [cited 2022 Sep 10]. Available from: <https://gg-base.org/>.

АНТИФОСФОЛИПИДНЫЕ АНТИТЕЛА И ИСХОДЫ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У ПАЦИЕНТОК С COVID-19 В АНАМНЕЗЕ

Д. М. Ермакова, Н. В. Долгушина, И. В. Менжинская ✉, Н. А. Ломова, В. В. Вторушина

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

Исследование влияния COVID-19, опосредованного аутоантителами, на репродуктивные исходы имеет важное значение. Целью исследования было оценить профиль антифосфолипидных антител (аФЛ) и их связь с исходами программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у пациенток с COVID-19 в анамнезе. В исследование включили 240 пациенток: 105 из них не болели COVID-19 (группа 1), 135 перенесли COVID-19 (группа 2) в легкой (подгруппа 2а; $n = 85$) или среднетяжелой форме (подгруппа 2б; $n = 50$). С использованием ИФА определяли сывороточные антитела (М, G) к кардиолипину, β_2 -гликопротеину-I, аннексину V (AnV), фосфатидилэтаноламину (ФЭ), фосфатидилсерину, комплексу фосфатидилсерин/протромбин. Оценивали показатели оогенеза, эмбриогенеза, исходы ВРТ. В группе 2 повышение уровня анти-AnV и анти-ФЭ IgG наблюдалось чаще (у 28 (20,7%) и 8 (5,9%) пациенток), чем в группе 1 (у 10 (9,5%) и 1 (0,95%); $p = 0,02$ и $p = 0,045$ соответственно). В подгруппе 2б был отмечен более высокий уровень анти-ФЭ IgG и более высокая частота ранних выкидышей (у 6 (12%) пациенток), чем в группе 1 (у 3 (2,9%)) ($p = 0,024$). Выявлены слабые обратные корреляционные связи между уровнем анти-ФЭ IgG и числом полученных ооцитов и зигот. Результаты исследования предполагают негативное влияние COVID-19, опосредованное аФЛ, на исходы программ ВРТ и течение беременности на ранних сроках.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вспомогательные репродуктивные технологии, исходы ВРТ, антифосфолипидные антитела

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

Вклад авторов: Д. М. Ермакова, Н. А. Ломова — ведение пациенток, принимающих участие в исследовании, написание статьи; Н. В. Долгушина — сбор и анализ литературных данных, редактирование рукописи, статистический анализ данных; И. В. Менжинская — выполнение лабораторной части исследования, написание и редактирование статьи; В. В. Вторушина — выполнение лабораторной части исследования

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

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Владимировна Менжинская
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; i_menzinskaya@oparina4.ru

Статья получена: 07.09.2022 **Статья принята к печати:** 30.09.2022 **Опубликована онлайн:** 30.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.048

ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AND OUTCOMES OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS IN PATIENTS WITH A HISTORY OF COVID-19

Ermakova DM, Dolgushina NV, Menzhinskaya IV ✉, Lomova NA, Vtorushina VV

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

Investigation of the effect COVID-19 mediated with autoantibodies has on reproductive outcomes is important. This study aimed to evaluate the profile of antiphospholipid antibodies (aPL) and their association with the outcomes of assisted reproductive technology (ART) programs in patients with a history of COVID-19. The study included 240 patients: 105 of them did not have a history of COVID-19 (group 1) and 135 of them had a history of COVID-19 (group 2) with a mild course (subgroup 2a, $n = 85$) or moderate course (subgroup 2b, $n = 50$). With the help of ELISA, serum antibodies (M, G) to cardiolipin, β_2 -glycoprotein-I, annexin V (AnV), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine, and phosphatidylserine/prothrombin complex were determined. The evaluated parameters were the indices of oogenesis, embryogenesis, ART intervention outcomes. In group 2, growing levels of anti-AnV and anti-PE IgG were observed more often (in 28 (20.7%) and 8 (5.9%) patients) than in group 1 (in 10 (9.5%) and 1 (0.95%); $p = 0.02$ and $p = 0.045$, respectively). In subgroup 2b we registered a higher level of anti-PE IgG and a higher incidence of early miscarriages (in 6 (12%) patients) than in group 1 (in 3 (2.9%)) ($p = 0.024$). Weak inverse correlations were found between the level of anti-PE IgG and the number of oocytes and zygotes. The results of this study suggest a negative impact of aPL-mediated COVID-19 on the outcomes of ART programs and the course of early pregnancy.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, assisted reproductive technologies, ART intervention outcomes, antiphospholipid antibodies

Funding: the work was supported by the Vklad v buduscheye (Investment in the Future) charity foundation as part of the Stop Coronavirus Together program-campaign.

Author contribution: Ermakova DM, Lomova NA — management of patients participating in the study, article authoring; Dolgushina NV — collection and analysis of literature data, manuscript editing, statistical data analysis; Menzhinskaya IV — execution of the laboratory part of the study, article authoring and editing; Vtorushina VV — execution of the laboratory part of the study

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes of meeting № 12 of November 26, 2020); all patients signed an informed voluntary consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Menzhinskaya
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; i_menzinskaya@oparina4.ru

Received: 07.09.2022 **Accepted:** 30.09.2022 **Published online:** 30.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.048

В связи с пандемией новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной вирусом SARS-CoV-2 и охватившей более 500 млн человек в мире, появилась острая необходимость изучения влияния COVID-19 на репродуктивную систему женщины. Согласно разноречивым

данным имеющихся единичных исследований, COVID-19 увеличивает риск возникновения таких осложнений беременности, как самопроизвольные выкидыши и преждевременные роды [1, 2]. Частота преждевременных родов у беременных женщин с COVID-19 достигает

11,5–17% [3, 4], а частота ранних самопроизвольных выкидышей у них выше в 1,7 раза по сравнению с не инфицированными SARS-CoV-2 пациентками [5].

Исследований по оценке влияния COVID-19 и постковидного синдрома на фертильность и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий (BPT) недостаточно. Описаны отдельные случаи развития преждевременной недостаточности яичников у женщин после перенесенного COVID-19 [6]. При этом не ясен генез этих нарушений. В метаанализе 2022 г. не отмечено влияние COVID-19 на исходы программ BPT [7]. Однако результаты другого исследования позволяют предположить негативное воздействие COVID-19 и зависимость числа полученных ооцитов в программах BPT от времени, прошедшего после заболевания [8].

Известно, что инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, сопровождается повышением продукции цитокинов, таких как IL6, TNF α , может привести к цитокиновому шторму и отрицательно повлиять на репродуктивную функцию через подавление цитокинами гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, а также вследствие развития системного васкулита и аутоиммунного поражения гонад [9, 10].

Одним из возможных механизмов поражения репродуктивной системы у женщин под влиянием инфекции является аутоиммунный механизм. Показано, что развитию аутоиммунных процессов после COVID-19 наиболее подвержены люди с определенным HLA-гаплотипом [11]. Активация и созревание аутореактивных В-лимфоцитов из наивных В-клеток может происходить по экстрафолликулярному пути, лишенному некоторых контрольных точек толерантности [12], что подтверждено наличием у пациентов с тяжелой формой COVID-19 более высокого уровня экстрафолликулярных В-клеток и плазматических клеток.

В подтверждение гипотезы о роли аутоиммунитета при COVID-19 недавно были выявлены 28 белков человека, содержащих домены, гомологичные пептидам SARS-CoV-2, которые могут действовать как аутоантигены у пациентов с COVID-19, приводя к запуску продукции аутоантител по механизму молекулярной мимикрии [13]. У пациентов с COVID-19 обнаружена значительная распространенность аутоантител разной специфичности, включая антинуклеарные антитела, антитела к цитоплазме нейтрофилов, кардиолипину (КЛ) и β_2 -гликопротеину-1 (β_2 -ГП-1) [14]. При постковидном синдроме также найдены антитела к тиреоидной пероксидазе [15].

Наблюдаемые при COVID-19 сосудистые осложнения, такие как тромбоз глубоких вен, инсульт, диссеминированное внутрисосудистое свертывание, первоначально связывали с наличием антифосфолипидных антител (аФЛ) [16], прежде всего антител к КЛ и β_2 -ГП-1, отнесенных к лабораторным критериям антифосфолипидного синдрома (АФС) [17]. Однако показано, что аФЛ при COVID-19 выявляются нечасто (8,9%), могут быть транзиторными и не всегда ассоциируются с тромбозом [18]. В то же время у пациентов с генетической предрасположенностью можно наблюдать длительную персистенцию патогенных аФЛ и развитие аутоиммунного заболевания [19].

Аутоиммунные процессы у бесплодных женщин могут оказывать влияние на оплодотворение, имплантацию и развитие плаценты [20]. Патогенетические механизмы, которые связывают аутоиммунитет и бесплодие, остаются до конца не выясненными. Связь аФЛ с бесплодием в настоящее время активно обсуждают. Анализ научной литературы (2016) показал, что в

большинстве исследований выявлена связь бесплодия с антителами к β_2 -ГП-1 и некритеиальными аФЛ, в том числе к фосфатидилэтаноламину (ФЭ) [21]. В пяти из 18 исследований сообщалось о потенциальном вредном воздействии, главным образом, критерияльных аФЛ на исход программ BPT. Таким образом, исследование различных аутоантител у пациенток с бесплодием, перенесших COVID-19, и их влияния на репродуктивные исходы имеет важное научное и практическое значение.

Цель настоящего исследования — оценить профиль антифосфолипидных антител и их связь с исходами программ BPT у пациенток с COVID-19 в анамнезе.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Всего в проспективное обсервационное исследование были включены 240 пациенток с бесплодием. Пациентки были стратифицированы на две группы в зависимости от COVID-19 в анамнезе: в группу 1 вошли пациентки, не болевшие COVID-19 ($n = 105$), в группу 2 — пациентки, перенесшие COVID-19 ($n = 135$) за 12 и менее месяцев до вступления в программу BPT. Группа 2 была дополнительно разделена на две подгруппы: в подгруппу 2а вошли пациентки, перенесшие COVID-19 в легкой форме ($n = 85$), в подгруппу 2б — пациентки, перенесшие COVID-19 в среднетяжелой форме ($n = 50$).

Критерии включения: возраст 18–40 лет; нормальный овариальный резерв (антимюллеров гормон (АМГ) $\geq 1,2$ нг/мл, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) < 12 мМЕ/мл, число антральных фолликулов (КАФ) ≥ 5 в обоих яичниках). Критерии исключения: наличие вакцинации от COVID-19 в анамнезе; наличие противопоказаний к BPT, морбидное ожирение (ИМТ $\geq 40,0$ кг/м²); участие в донорских программах, программах суррогатного материнства; ВИЧ-инфекция. Все пациентки были обследованы в соответствии с клиническими рекомендациями «Женское бесплодие» (2021 г.).

Данные о перенесенном COVID-19, полученные со слов пациенток, подтверждали информацией, внесенной в систему ЕГИСЗ, а также с помощью определения антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови с использованием «Набора реагентов для выявления антител класса G к spike белку SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа» («ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G(S)») («Диагностические системы»; Россия) для качественного определения антител к SARS-CoV-2 с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для оценки результатов анализа рассчитывали индекс позитивности (ИП) по формуле: ИП = ОП образца / Cut-off, где ОП образца — величина оптической плотности образца. При ИП $> 1,2$ результат считали положительным, при ИП $< 0,8$ — отрицательным, при ИП в диапазоне от 0,8 до 1,2 — сомнительным (неопределенным).

Исследование аФЛ проводили с помощью ИФА с использованием наборов для количественного определения антител классов M и G к КЛ, β_2 -ГП-1, аннексину V (Ан V), фосфатидилсерину (ФС) (ORGENTEC Diagnostika GmbH; Германия). Референсные значения (РЗ) содержания антител в крови составляли: анти-КЛ IgM — < 7 MPL-Ед/мл, анти-КЛ IgG — < 10 GPL-Ед/мл; анти- β_2 -ГП-1 IgM и IgG — < 5 Ед/мл; анти-АнV IgM и IgG — < 5 Ед/мл; анти-ФС IgM и IgG — < 10 Ед/мл. Для количественного определения антител (M, G) к ФЭ и комплексу фосфатидилсерин/протромбин (ФС/ПТ) в сыворотке крови использовали

иммуноферментные наборы (AESKU Diagnostics; Германия). Референсный диапазон концентраций антител к ФЭ и антител к ФС/ПТ составлял < 12 Ед/мл.

Овариальную стимуляцию проводили по протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ) и/или препаратами, содержащими лютеинизирующий гормон (ЛГ)-компонент: человеческим менопаузальным гонадотропином (чМГ) или комбинированным препаратом, содержащим рФСГ/рЛГ. Всем пациенткам, переболевшим COVID-19, овариальную стимуляцию осуществляли в среднем через шесть месяцев (от двух до девяти месяцев) после заболевания. Дозу гонадотропинов подбирали индивидуально с учетом возраста, анамнеза и параметров овариального резерва. В качестве триггера овуляции использовали хорионический гонадотропин (ХГ) однократно в дозе 8000–10 000 МЕ или комбинацию ХГ с агонистом гонадотропин-рилизинг гормона (а-ГнРГ). Трансвагинальную пункцию фолликулов (ТВП) проводили под контролем УЗИ через 36 ч после введения триггера овуляции.

В аспирированной фолликулярной жидкости определяли число полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), затем после денудирования ооцитов оценивали степень зрелости клеток. Все зрелые ооциты подвергали оплодотворению методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ); через 16–18 ч при наличии в цитоплазме двух симметричных по размеру пронуклеусов регистрировалось нормальное оплодотворение. Затем зиготы переносились в культуральную среду COOK (COOK Medical; США) для дальнейшего культивирования. Морфологическую оценку эмбрионов проводили через 120–122 ч (на пятые сутки) культивирования с использованием классификации Гарднера (степень зрелости бластоцист, качество трофэктодермы и внутриклеточной массы).

Перенос одного или двух эмбрионов (ПЭ) в полость матки осуществляли на пятые сутки культивирования. Поддержку посттрансферного периода проводили с применением микронизированного прогестерона (600 мг в день) или дидрогестерона (30 мг в день). Наступление беременности определяли по уровню β -ХГ в сыворотке крови через 14 дней после ПЭ в полость матки. Тест на беременность считали положительным при уровне β -ХГ более 20 МЕ/л. Через 21 день после ПЭ при визуализации плодного яйца в полости матки с помощью УЗИ регистрировали клиническую беременность.

Для статистического анализа использовали пакет статистических программ Statistica 10 (StatSoft Inc.; США). Для оценки качественных данных вычисляли доли (%). Для сравнения категориальных данных, а также для оценки различий между ними использовали тест χ^2 . Для анализа количественных данных в группах сравнения определяли вид распределения данных с помощью теста Колмогорова–Смирнова и графического анализа данных. При распределении данных, не соответствующем нормальному, применяли методы непараметрической статистики: определение медианы с интерквартильным размахом ($Me(Q_{25}-Q_{75})$), тест Манна–Уитни или тест Краскела–Уоллиса для сравнения данных в несвязанных совокупностях. Наличие корреляционной зависимости между переменными оценивали с применением корреляционного критерия Спирмена. Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст пациенток составил 34 года (34 (30–36) года в группе 1 и 34 (31–37) года в группе 2 ($p = 0,39$). Поздний репродуктивный возраст (35 лет и старше) отмечался у 24 (22,8%) женщин в группе 1 и у 36 (26,7%) — в группе 2 ($p = 0,49$). Пациентки группы 2 имели значимо более высокий сывороточный уровень специфических противовирусных антител по сравнению с пациентками группы 1, средние значения ИП составили в группах 1 и 2, соответственно, $0,16 \pm 0,13$ и $6,8 \pm 4,1$ ($p < 0,001$). Пациентки, перенесшие COVID-19, отличались от не болевших более высоким индексом массы тела ($22,9$ ($20,4-25,5$) $кг/м^2$ и $21,9$ ($20,0-24,5$) $кг/м^2$; $p = 0,009$), большей частотой заболеваний ЛОР-органов (24 (17,8%) и 9 (8,6%); $p = 0,04$) и аллергических заболеваний (23 (17%) и 9 (8,6%); $p = 0,055$).

Среди гинекологических заболеваний у женщин в группах 1 и 2 часто диагностировали эндометриоз (у 25 (23,8%) и 38 (28,1%); $p = 0,45$) и миому матки (у 21 (20%) и 33 (24,4%); $p = 0,41$), реже выявляли хронический сальпингоофорит (у 13 (12,4%) и 15 (11,1%); $p = 0,76$), хронический эндометрит (у 11 (10,5%) и 8 (5,6%); $p = 0,19$) и СПКЯ (у 9 (8,6%) и 6 (4,4%); $p = 0,19$). Доля пациенток с первичным бесплодием в обеих группах была одинаковой и составляла 61 (58,1%) и 79 (58,5%); $p = 0,95$. Исследуемые группы не различались по среднему числу беременностей, родов и выкидышей.

Исследование сывороточного содержания аФЛ у пациенток в двух группах показало частое повышение уровня антител выше РЗ. Повышение содержания хотя бы одного аФЛ класса М или G наблюдали суммарно у 66 (62,9%) пациенток в группе 1 и у 81 (60%) пациентки в группе 2 ($p = 0,65$). Одновременное повышение уровня нескольких аФЛ наблюдали, соответственно, у 18 (17,1%) и у 33 (24,4%) пациенток ($p = 0,17$). Наиболее часто отмечали повышение уровня антител к ФЭ суммарно у 55 (52,4%) пациенток в группе 1 и у 66 (48,9%) пациенток в группе 2; реже наблюдали повышение уровня антител к Ан V, соответственно, у 20 (19%) и 37 (27,4%) пациенток ($p < 0,001$). Повышение уровня антител другой специфичности отмечено реже, чем антител к Ан V: антител к β_2 -ГП-I у 6 (5,7%) и 8 (5,9%) соответственно, к комплексу ФС/ПТ — у 6 (5,7%) и у 6 (4,4%), к КЛ — у 2 (1,9%) и у 4 (3,0%), к ФС — только в группе 1 у одной (0,95%) пациентки ($p < 0,001$). При этом сравнительный анализ частоты повышения уровня аФЛ отдельно классов М и G в исследуемых группах выявил значимые различия только у IgG-антител к ФЭ и АнV (табл. 1), частота которых была значимо выше в группе 2 по сравнению с группой 1.

При оценке сывороточного уровня аФЛ у пациенток в группах 1 и 2 было показано, что средние уровни с интерквартильными размахами всех исследованных антител находились в пределах РЗ. При этом средний уровень анти- β_2 -ГП-I IgG, анти-АнV IgM и анти-ФС/ПТ IgG был выше в группе 1, тогда как средний уровень анти-ФЭ IgG и анти-ФС/ПТ IgM напротив был выше в группе 2 (табл. 2). Отмечен несколько более высокий уровень IgG-антител к АнV в группе 2 по сравнению с группой 1.

Показатели сперматогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза в группах 1 и 2 значимо не различались. При этом следует отметить высокую частоту патоспермии у партнеров пациенток в обеих группах: у 72 (68,6%) и 86 (63,7%) партнеров соответственно ($p = 0,43$). Среднее число зрелых ооцитов, полученных у пациенток в группах

Таблица 1. Частота повышения сывороточного уровня аФЛ у пациенток в исследуемых группах

Параметр	Группа 1, <i>n</i> = 105	Группа 2, <i>n</i> = 135		Значение <i>p</i>
		Подгруппа 2а, <i>n</i> = 85	Подгруппа 2б, <i>n</i> = 50	
анти-КЛ IgM	2 (1,9%)	4 (2,9%)		0,60*
		3 (5,2%)	1 (2,0%)	0,75**
анти-КЛ IgG	0 (0,0%)	0 (0,0%)		–
		0 (0,0%)	0 (0,0%)	–
анти-β ₂ -ГП-1 IgM	3 (2,9%)	3 (2,2%)		0,75
		2 (2,4%)	1 (2,0%)	0,95
анти-β ₂ -ГП-1 IgG	4 (3,8%)	7 (5,2%)		0,61
		3 (3,5%)	4 (8%)	0,43
анти-АнV IgM	9 (8,6%)	10 (7,4%)		0,74
		3 (3,5%)	7 (14%)	0,09
анти-АнV IgG	10 (9,5%)	28 (20,7%)		0,02
		20 (23,5%)	8 (16%)	0,03
анти-ФС IgM	1 (0,9%)	0 (0,0%)		0,26
		0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,52
анти-ФС IgG	0 (0,0%)	0 (0,0%)		–
		0 (0,0%)	0 (0,0%)	–
анти-ФЭ IgM	23 (21,9%)	23 (17,0%)		0,34
		11 (12,9%)	12 (24,0%)	0,28
анти-ФЭ IgG	1 (0,95%)	8 (5,9%)		0,045
		5 (5,9%)	3 (6%)	0,13
анти-ФС/ПТ IgM	3 (2,9%)	2 (1,5%)		0,46
		2 (2,3%)	0 (0,0%)	0,49
анти-ФС/ПТ IgG	4 (3,8%)	4 (2,9%)		0,72
		4 (4,7%)	0 (0,0%)	0,32

Примечание: абс (%), χ²-тест; * — при сравнении групп 1 и 2; ** — при сравнении группы 1 и подгрупп 2а и 2б

1 и 2, составило, соответственно, 8 (5–11) и 7 (4–11) ($p = 0,26$), уровень фертилизации — 0,90 (0,75–1,0) и 0,92 (0,80–1,0) ($p = 0,39$), число зигот — 6 (4–9) и 6 (4–10) ($p = 0,37$), число бластоцист было одинаково в двух группах 3 (1–5), число бластоцист отличного качества — 1 (0–3) и 1 (0–2) ($p = 0,19$), число бластоцист плохого качества — 1 (0–2) в двух группах.

При исследовании связи уровня аФЛ и параметров оогенеза и эмбриогенеза была выявлена значимая слабая отрицательная корреляционная связь между уровнем анти-ФЭ IgG-антител и числом полученных зрелых ооцитов ($r = -0,129$, $p = 0,045$) и зигот ($r = -0,132$, $p = 0,041$). В остальных случаях корреляционные связи между другими аФЛ и параметрами оогенеза и эмбриогенеза не были статистически значимыми. Следует отметить, что средний уровень анти-ФЭ IgG-антител был значимо выше у пациенток в группе 2 и особенно в подгруппе 2б у пациенток, перенесших COVID-19 в среднетяжелой форме. Кроме того, доля пациенток с повышенным уровнем анти-ФЭ IgG-антител в группе 2 была значимо выше по сравнению с группой 1.

При оценке исходов программ BPT показано, что частота наступления беременности (ЧНБ) и родов у пациенток в двух группах значимо не различалась: биохимическую беременность наблюдали у 32 (30,5%) и 39 (28,9%) женщин ($p = 0,79$), клиническую беременность — у 30 (28,6%) и 39 (28,9%) ($p = 0,96$), роды — у 27 (25,7%) и 30 (22,2%) ($p = 0,53$). Важно отметить, что в подгруппе 2б со среднетяжелой формой COVID-19 в анамнезе выявлена более высокая частота самопроизвольных

прерываний беременности до 12 недель (у 6 (12%)) по сравнению с группой 1 (у 3 (2,9%)) ($p = 0,024$). Показатель ОШ для самопроизвольного выкидыша в подгруппе 2б при сравнении с группой 1 составил 2,1 (95% ДИ = 1,1; 19,4) ($p = 0,036$). Следует подчеркнуть, что у 3 из 6 пациенток с выкидышами был отмечен повышенный сывороточный уровень IgM-антител к ФЭ и АнV.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ряд научных исследований демонстрирует отсутствие негативного влияния COVID-19 на исходы программ BPT [2, 7, 22]. О том же свидетельствуют работы, сравнивающие результаты программ BPT в доковидный и ковидный периоды [23, 24]. Однако имеются публикации, в которых обсуждается возможное негативное влияние перенесенной инфекции на репродуктивную функцию женщин [6, 25, 26]. Одним из проявлений постковидного синдрома могут быть нарушения репродуктивной функции, проявляющиеся, в том числе, в нарушении фертильности и невынашивании беременности [6]. Описаны отдельные случаи развития бесплодия у фертильных пациенток молодого возраста или преждевременной недостаточности яичников после перенесенного COVID-19 [25, 26]. Тяжесть течения COVID-19 может оказывать влияние на частоту осложнений беременности [27].

Предполагается, что COVID-19 может вызывать аутоиммунные процессы у генетически предрасположенных людей [28]. У пациентов, перенесших COVID-19, описано развитие таких аутоиммунных патологий, как иммунная

Таблица 2. Средний уровень аФЛ в сыворотке крови у пациенток в исследуемых группах

Параметр	Группа 1, <i>n</i> = 105	Группа 2, <i>n</i> = 135		Значение <i>p</i>
		Подгруппа 2а, <i>n</i> = 85	Подгруппа 2б, <i>n</i> = 50	
анти-КЛ IgM, MPL-Ед/мл	3,03 (1,94–4,05)	2,52 (1,59–3,91)		0,14*
		2,43 (1,59–1,04)	3,04 (1,50–3,83)	0,30**
анти-КЛ IgG, GPL-Ед/мл	1,87 (1,41–2,56)	2,10 (1,59–3,01)		0,06*
		2,01 (1,50–2,86)	2,14 (1,68–3,31)	0,08**
анти-β ₂ -ГП-1 IgM, Ед/мл	1,51 (0,81– 2,43)	1,41 (0,98–2,17)		0,87
		1,41 (0,95–2,38)	1,42 (1,06–2,07)	0,96
анти-β ₂ -ГП-1 IgG, Ед/мл	2,98 (2,12– 3,59)	2,37 (1,21–3,26)		0,001
		2,09 (0,94–2,30)	2,52 (1,94–3,54)	0,001
анти-АнV IgM, Ед/мл	2,52 (1,76–3,52)	2,22 (1,23–3,22)		0,03
		2,22 (1,26–3,18)	2,25 (1,45–3,35)	0,07
анти-АнV IgG, Ед/мл	2,88 (2,26–3,94)	3,37 (2,13–4,65)		0,19
		3,37 (2,20–4,95)	3,23 (2,00–4,58)	0,25
анти-ФС IgM, Ед/мл	2,53 (1,56–3,76)	2,54 (1,25–4,01)		0,64
		2,31 (1,11–3,78)	2,95 (1,50–4,14)	0,33
анти-ФС IgG, Ед/мл	1,76 (1,41–2,15)	1,69 (1,32–2,16)		0,76
		1,67 (1,27–2,10)	1,73 (1,51–2,23)	0,32
анти-ФЭ IgM, Ед/мл	12,23 (8,70–16,98)	11,85 (8,67–15,58)		0,54
		11,93 (7,78–15,2)	11,61 (9,09–7,89)	0,51
анти-ФЭ IgG, Ед/мл	3,63 (2,96–4,80)	4,78 (3,27–6,82)		0,001
		4,39 (3,20–5,89)	5,20 (3,74–7,93)	0,001
анти-ФС/ПТ IgM, Ед/мл	1,72 (1,10–3,28)	2,39 (1,47–3,58)		0,01
		2,39 (1,53–3,73)	2,33 (1,28–3,55)	0,03
анти-ФС/ПТ IgG, Ед/мл	4,24 (3,00–5,36)	3,38 (2,28–5,31)		0,03
		3,43 (2,32–5,48)	3,02 (2,24–5,11)	0,06

Примечание: Me (Q_{25} – Q_{75}), тест Манна–Уитни или Краскела–Уоллиса; * — при сравнении групп 1 и 2, ** — при сравнении группы 1 и подгрупп 2а и 2б.

тромбоцитопеническая пурпура, синдром Гийена–Барре, синдром Миллера–Фишера [16]. У пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, выявлена значительная распространенность аутоантител разной специфичности: антиядерных — у 57,5%, антител к цитоплазме нейтрофилов — у 25%, КЛ — у 12,5%, β₂-ГП-I — у 5% [14].

В настоящем исследовании показана высокая суммарная частота выявления аФЛ классов М и G в исследуемых группах у пациенток с бесплодием как у переболевших, так и у не болевших COVID-19. Следует отметить, что наиболее часто выявлялось повышение уровня некритеиальных антител к ФЭ и АнV, значимо реже наблюдалось повышение классических аФЛ, а именно к КЛ и β₂-ГП-I, которые относятся к лабораторным критериям АФС, принятым в настоящее время. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о низкой частоте выявления антител к КЛ и β₂-ГП-I и более высокой частоте выявления антител к АнV у больных COVID-19 [29].

При отдельном рассмотрении частоты выявления аФЛ классов М и G показано, что частота повышения уровня IgG-антител к ФЭ и АнV была значимо выше у

пациенток, перенесших COVID-19 за менее чем 12 месяцев до программы BPT, по сравнению с пациентками, не болевшими ранее COVID-19. Как известно, у больных COVID-19 отмечается предрасположенность к провоспалительным и гиперкоагуляционным состояниям, повышению риска тромботических событий и нарушению коагуляции. Повышенная активация клеток эндотелия сосудов, экстернализация фосфолипидов, повышение содержания естественных антикоагулянтов, связывающих фосфолипиды на поверхности поврежденного эндотелия, в частности АнV, может приводить к повышенному образованию аутоантител к АнV [29].

Кроме того, у пациенток, перенесших COVID-19, отмечены более высокие средний уровень IgG-антител к ФЭ и частота повышения их уровня, чем у пациенток, не болевших COVID-19. Известно, что антитела к ФЭ могут образовываться при инфекционно-воспалительных процессах вирусной или бактериальной природы и длительно персистировать в организме человека. Это связано с тем, что ФЭ является главным липидным компонентом микробных мембран,

а также широко представлен в мембранах клеток человека с асимметричным распределением. Продукция провоспалительных медиаторов и повреждение клеток и тканей при инфекционно-воспалительных процессах способствуют экспонированию ФЭ в клеточных мембранах и образованию аутоантител к ФЭ.

Выявленная отрицательная корреляционная связь между уровнем IgG-антител к ФЭ и числом полученных зрелых ооцитов и зигот может косвенно свидетельствовать о возможном негативном влиянии некоторых аФЛ, персистирующих после перенесенного COVID-19, на исходы программ ВРТ.

В настоящем исследовании показано, что параметры оогенеза, эмбриогенеза, ЧНБ и частота родов не различались значимо в группах пациенток, переболевших и не болевших COVID-19, что согласуется с приведенными выше данными других исследователей. Однако у пациенток, перенесших COVID-19 в среднетяжелой форме, отмечена высокая частота самопроизвольных выкидышей до 12 недель гестации, а риск развития выкидыша был в 2,1 раза выше по сравнению с пациентками, не болевшими ранее COVID-19. Так как у половины пациенток с ранним

выкидышем были обнаружены антитела к ФЭ и АНУ, можно предположить участие аутоиммунных механизмов в развитии данных осложнений беременности. Как известно, антитела к ФЭ и АНУ ассоциируются с привычным выкидышем и являются значимыми факторами риска этого осложнения беременности.

ВЫВОДЫ

У пациенток с бесплодием с высокой частотой выявляются антифосфолипидные антитела. У пациенток, перенесших COVID-19 в среднетяжелой форме до вступления в программу ВРТ, чаще отмечается повышение сыровороточного уровня IgG-антител к ФЭ и АНУ, чем у пациенток, не болевших COVID-19. Предполагается, что COVID-19 может оказывать негативное влияние на репродуктивные исходы, приводить к получению меньшего числа зрелых ооцитов, зигот и, как следствие, эмбрионов в программах ВРТ, повышать риск самопроизвольного прерывания беременности на ранних сроках, что может быть связано с вовлечением аутоиммунных механизмов, опосредованных образованием аФЛ, в частности к ФЭ и АНУ.

Литература

1. 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.
2. Wang M, Yang Q, Ren X, Hu J, Li Z, Long R, et al. Investigating the impact of asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection on female fertility and in vitro fertilization outcomes: A retrospective cohort study. *E Clinical Medicine.* 2021; 38: 101013. DOI: 10.1016/j.eclim.2021.101013.
3. Mullins E, Perry A, Banerjee J, Townson J, Grozeva D, Milton R, et al. Pregnancy and neonatal outcomes of COVID-19: The PAN-COVID study. *Eur J Obstet. Gynecol Reprod Biol.* 2022; 276: 161–7.
4. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, Kew T, et al. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: Living systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2020; 370: m3320. DOI: 10.1136/bmj.m3320.
5. Balachandren N, Davies MC, Hall JA, Stephenson JM, David AL, Barrett G, et al. SARS-CoV-2 infection in the first trimester and the risk of early miscarriage: a UK population-based prospective cohort study of 3041 pregnancies conceived during the pandemic. *Hum. Reprod.* 2022; 37 (6): 1126–33.
6. Bechmann N, Maccio U, Kotb R, Dweik RAI, Cherfane M, Moch H, et al. COVID-19 Infections in Gonads: Consequences on Fertility? *Horm Metab Res.* 2022; 54 (08): 549–55.
7. Hu W, Zhu Y, Wu Y, Wang F, Qu F. Impact of COVID-19 pandemic on the pregnancy outcomes of women undergoing assisted reproductive techniques (ARTs): a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2022; 23 (8): 655–65.
8. Youngster M, Avraham S, Yaakov O, Landau Rabbi M, Gat I, Yerushalmi G, et al. IVF under COVID-19: treatment outcomes of fresh ART cycles. *Hum Reprod.* 2022; 37 (5): 947–53.
9. Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. From inflammation to sexual dysfunctions: a journey through diabetes, obesity, and metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2018; 41 (11): 1249–58.
10. Huang C, Ji X, Zhou W, Huang Z, Peng X, Fan L, et al. Coronavirus: A possible cause of reduced male fertility. *Andrology.* 2021; 9 (1): 80–7.
11. Matyushkina D, Shokina V, Tikhonova P, Manuvera V, Shirokov D, Kharlampieva D, et al. Autoimmune Effect of Antibodies against the SARS-CoV-2 Nucleoprotein. *Viruses.* 2022; 14 (6): 1141.
12. Knight JS, Caricchio R, Casanova J-L, Combes AJ, Diamond B, Fox SE, et al. The intersection of COVID-19 and autoimmunity. *J Clin Invest.* 2021; 131 (24): e154886. DOI: 10.1172/JCI154886.
13. Mohkhdar M, Venigalla SSK, Janakiraman V. Untangling COVID-19 and autoimmunity: Identification of plausible targets suggests multi organ involvement. *Mol Immunol.* 2021; 137: 105–13.
14. Sacchi MC, Tamiasso S, Stobbione P, Agatea L, De Gaspari P, Stecca A, et al. SARS-CoV-2 infection as a trigger of autoimmune response. *Clin Transl Sci.* 2021; 14 (3): 898–907.
15. Lui DTW, Lee CH, Chow WS, Lee ACH, Tam AR, Pang P, et al. Long COVID in Patients With Mild to Moderate Disease: Do Thyroid Function and Autoimmunity Play a Role? *Endocr Pract.* 2021; 27 (9): 894–902.
16. Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, Cattalini M, Greenbaum A, Kanduc D, et al. Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2020; 19 (8): 102597. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102597.
17. Zhang Y, Xiao M, Zhang S, Xia P, Cao W, Jiang W, et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 382 (17): e38. DOI: 10.1056/NEJMc2007575.
18. Harzallah I, Deblis A, Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost.* 2020; 18 (8): 2064–5.
19. Soriano A, Blank M, Shoenfeld Y. Genetics and origin of antiphospholipid syndrome. In: Meroni PL, editor. *Antiphospholipid antibody syndrome. From bench to bedside.* Cham: Springer I, 2014; p. 1–12.
20. Khizroeva J, Nalli C, Bitsadze V, Lojaco A, Zatti S, Andreoli L, Tincani A, Shoenfeld Y, Makatsariya A. Infertility in women with systemic autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2019; 33 (6): 101369. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101369>.
21. Chighizola CB, de Jesus GR, Branch DW. The hidden world of anti-phospholipid antibodies and female infertility: A literature appraisal. *Autoimmunity Reviews.* 2016; 15 (6): 493–500. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.018>.
22. Kolanska K, Hours A, Jonquière L, Mathieu d'Argent E, Dabi Y, et al. Mild COVID-19 infection does not alter the ovarian reserve in women treated with ART. *Reprod Biomed Online.* 2021; 43 (6): 1117–21.

23. Aharon D, Gounko D, Lee JA, Copperman AB, Flisser E. The Impact of the Coronavirus Disease 19 Pandemic on Early Pregnancy Outcomes Among Patients Undergoing In Vitro Fertilization Treatment. *Women's Heal Reports*. 2021; 2 (1): 473–8.
 24. Setti PEL, Cirillo F, Immediata V, Morengi E, Canevisio V, Ronchetti C, et al. First trimester pregnancy outcomes in a large IVF center from the Lombardy County (Italy) during the peak COVID-19 pandemic. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 16529. DOI: 10.1038/s41598-021-96134-9.
 25. Madaan S, Jaiswal A, Kumar S, Talwar D. Premature ovarian failure-A long COVID sequelae. *Med Sci*. 2021; 25 (112): 1286–90.
 26. Wilkins J, Al-Inizi S. Premature ovarian insufficiency secondary to COVID-19 infection: An original case report. *Int J Gynecol Obstet*. 2021; 154 (1): 179–80.
 27. Shams T, Alhashemi H, Madkhali A, Noorelahi A, Allarakia S, Faden Y, et al. Comparing pregnancy outcomes between symptomatic and asymptomatic COVID-19 positive unvaccinated women: Multicenter study in Saudi Arabia. *J Infect Public Health*. 2022; 15 (8): 845–52.
 28. Caso F, Costa L, Ruscitti P, Navarini L, Del Puente A, Giacomelli R, et al. Could Sars-coronavirus-2 trigger autoimmune and/or autoinflammatory mechanisms in genetically predisposed subjects? *Autoimmun Rev*. 2020; 19 (5): 102524. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102524.
 29. Долгушина Н. В., Менжинская И. В., Безнощенко О. С., Муллабаева С. М., Городнова Е. А., Кречетова Л. В. Профиль антифосфолипидных антител и состояние системы комплемента у больных COVID-19 разной степени тяжести. *Медицинская иммунология*. 2022; 24 (2): 355–370.
- References**
1. 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.
 2. Wang M, Yang Q, Ren X, Hu J, Li Z, Long R, et al. Investigating the impact of asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection on female fertility and in vitro fertilization outcomes: A retrospective cohort study. *E Clinical Medicine*. 2021; 38: 101013. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.101013.
 3. Mullins E, Perry A, Banerjee J, Townson J, Grozeva D, Milton R, et al. Pregnancy and neonatal outcomes of COVID-19: The PAN-COVID study. *Eur J Obstet. Gynecol Reprod Biol*. 2022; 276: 161–7.
 4. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, Kew T, et al. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: Living systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020; 370: m3320. DOI: 10.1136/bmj.m3320.
 5. Balachandren N, Davies MC, Hall JA, Stephenson JM, David AL, Barrett G, et al. SARS-CoV-2 infection in the first trimester and the risk of early miscarriage: a UK population-based prospective cohort study of 3041 pregnancies conceived during the pandemic. *Hum. Reprod*. 2022; 37 (6): 1126–33.
 6. Bechmann N, Maccio U, Kotb R, Dweik RAI, Cherfane M, Moch H, et al. COVID-19 Infections in Gonads: Consequences on Fertility? *Horm Metab Res*. 2022; 54 (08): 549–55.
 7. Hu W, Zhu Y, Wu Y, Wang F, Qu F. Impact of COVID-19 pandemic on the pregnancy outcomes of women undergoing assisted reproductive techniques (ARTs): a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2022; 23 (8): 655–65.
 8. Youngster M, Avraham S, Yaakov O, Landau Rabbi M, Gat I, Yerushalmi G, et al. IVF under COVID-19: treatment outcomes of fresh ART cycles. *Hum Reprod*. 2022; 37 (5): 947–53.
 9. Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. From inflammation to sexual dysfunctions: a journey through diabetes, obesity, and metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2018; 41 (11): 1249–58.
 10. Huang C, Ji X, Zhou W, Huang Z, Peng X, Fan L, et al. Coronavirus: A possible cause of reduced male fertility. *Andrology*. 2021; 9 (1): 80–7.
 11. Matyushkina D, Shokina V, Tikhonova P, Manuvera V, Shirokov D, Kharlampieva D, et al. Autoimmune Effect of Antibodies against the SARS-CoV-2 Nucleoprotein. *Viruses*. 2022; 14 (6): 1141.
 12. Knight JS, Caricchio R, Casanova J-L, Combes AJ, Diamond B, Fox SE, et al. The intersection of COVID-19 and autoimmunity. *J Clin Invest*. 2021; 131 (24): e154886. DOI: 10.1172/JCI154886.
 13. Mohkhedkar M, Venigalla SSK, Janakiraman V. Untangling COVID-19 and autoimmunity: Identification of plausible targets suggests multi organ involvement. *Mol Immunol*. 2021; 137: 105–13.
 14. Sacchi MC, Tamiazzo S, Stobbione P, Agatea L, De Gaspari P, Stecca A, et al. SARS-CoV-2 infection as a trigger of autoimmune response. *Clin Transl Sci*. 2021; 14 (3): 898–907.
 15. Lui DTW, Lee CH, Chow WS, Lee ACH, Tam AR, Pang P, et al. Long COVID in Patients With Mild to Moderate Disease: Do Thyroid Function and Autoimmunity Play a Role? *Endocr Pract*. 2021; 27 (9): 894–902.
 16. Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, Cattalini M, Greenbaum A, Kanduc D, et al. Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmun. Rev*. 2020; 19 (8): 102597. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102597.
 17. Zhang Y, Xiao M, Zhang S, Xia P, Cao W, Jiang W, et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 382 (17): e38. DOI: 10.1056/NEJMc2007575.
 18. Harzallah I, Debliquis A, Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost*. 2020; 18 (8): 2064–5.
 19. Soriano A, Blank M, Shoenfeld Y. Genetics and origin of antiphospholipid syndrome. In: Meroni PL, editor. *Antiphospholipid antibody syndrome. From bench to bedside*. Cham: Springer I, 2014; p. 1–12.
 20. Khizroeva J, Nalli C, Bitsadze V, Lojcono A, Zatti S, Andreoli L, Tincani A, Shoenfeld Y, Makatsariya A. Infertility in women with systemic autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019; 33 (6): 101369. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101369>.
 21. Chighizola CB, de Jesus GR, Branch DW. The hidden world of anti-phospholipid antibodies and female infertility: A literature appraisal. *Autoimmunity Reviews*. 2016; 15 (6): 493–500. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.018>.
 22. Kolanska K, Hours A, Jonquière L, Mathieu d'Argent E, Dabi Y, et al. Mild COVID-19 infection does not alter the ovarian reserve in women treated with ART. *Reprod Biomed Online*. 2021; 43 (6): 1117–21.
 23. Aharon D, Gounko D, Lee JA, Copperman AB, Flisser E. The Impact of the Coronavirus Disease 19 Pandemic on Early Pregnancy Outcomes Among Patients Undergoing In Vitro Fertilization Treatment. *Women's Heal Reports*. 2021; 2 (1): 473–8.
 24. Setti PEL, Cirillo F, Immediata V, Morengi E, Canevisio V, Ronchetti C, et al. First trimester pregnancy outcomes in a large IVF center from the Lombardy County (Italy) during the peak COVID-19 pandemic. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 16529. DOI: 10.1038/s41598-021-96134-9.
 25. Madaan S, Jaiswal A, Kumar S, Talwar D. Premature ovarian failure-A long COVID sequelae. *Med Sci*. 2021; 25 (112): 1286–90.
 26. Wilkins J, Al-Inizi S. Premature ovarian insufficiency secondary to COVID-19 infection: An original case report. *Int J Gynecol Obstet*. 2021; 154 (1): 179–80.
 27. Shams T, Alhashemi H, Madkhali A, Noorelahi A, Allarakia S, Faden Y, et al. Comparing pregnancy outcomes between symptomatic and asymptomatic COVID-19 positive unvaccinated women: Multicenter study in Saudi Arabia. *J Infect Public Health*. 2022; 15 (8): 845–52.
 28. Caso F, Costa L, Ruscitti P, Navarini L, Del Puente A, Giacomelli R, et al. Could Sars-coronavirus-2 trigger autoimmune and/or autoinflammatory mechanisms in genetically predisposed subjects? *Autoimmun Rev*. 2020; 19 (5): 102524. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102524.
 29. Dolgushina NV, Menzhinskaya IV, Beznoshchenko OS, Mullabaeva SM, Gorodnova EA, Krechetova LV. Profil antifosfolipidnykh antitel i sostoyanie sistemy komplementa u bol'nykh COVID-19 raznoj stepeni tyazhesti. *Medicinskaya immunologiya*. 2022; 24 (2): 355–370. *Medical immunology*. 2022; 24 (2): 355–370. Russian.

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА НА СЕКСУАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С БЕСПЛОДИЕМ

А. А. Гависова , Н. Н. Стеняева, Ж. Р. Гарданова, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина


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

Андрогены играют одну из ключевых ролей в физиологии женского организма и репродуктивной системы. Экспрессия андрогенных рецепторов в различных тканях свидетельствует о важной роли андрогенов в регуляции сексуального и социального функционирования женщин. Целью исследования было оценить сексуальное функционирование у женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом (COP) по результатам опросника «Индекс женской сексуальной функции» (Female Sexual Function Index, FSFI). В одномоментном исследовании у 496 пациенток с бесплодием и COP провели оценку нарушений сексуального функционирования и их взаимосвязи с изменениями андрогенного профиля, основанного на концентрации андростендиона в сыворотке крови. Женщины с бесплодием при COP статистически значимо чаще отмечали изменение сексуального функционирования, в том числе снижение способности и частоты сексуальных отношений, либидо. Для женщин с бесплодием и измененным овариальным резервом с нормальным уровнем андростендиона характерен суммарно больший общий балл ($21,2 \pm 7,2$), что говорит о меньшей степени выраженности нарушений сексуального функционирования по сравнению с группой со сниженным уровнем андрогенов, средний балл в которой статистически значимо ниже ($15,17 \pm 3,0$). Кроме того, наблюдаются снижение влечения, возбуждения, удовлетворения, оргазма, lubrication и увеличение болевых ощущений. Изменение гормонального профиля у пациенток с COP и снижением уровня андрогенов вносит значимый вклад в сексуальное функционирование, и его выявление в клинической практике позволит на более раннем этапе провести объективизацию жалоб и оценить выраженность сексуальных нарушений у молодых женщин с бесплодием с целью определения дальнейшей персонализированной тактики ведения.

Ключевые слова: андрогены, андрогенный дефицит, репродуктивный возраст, бесплодие, сниженный овариальный резерв, BPT, опросник, сексуальное функционирование, FSFI

Вклад авторов: А. А. Гависова — дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание статьи, окончательное утверждение версии для публикации; Н. В. Долгушина — дизайн исследования, рецензирование; Н. Н. Стеняева, Ж. Р. Гарданова, Т. А. Назаренко — рецензирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГиП имени В. И. Кулакова (протокол № 2 от 07 февраля 2019 г.).

 **Для корреспонденции:** Алла Анатольевна Гависова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, Россия; 117997; gaviiala@ya.ru

Статья получена: 26.08.2022 **Статья принята к печати:** 13.09.2022 **Опубликована онлайн:** 23.09.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.045

CHANGES IN SEXUAL FUNCTIONING IN WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE WITH INFERTILITY AND DIMINISHED OVARIAN RESERVE

Gavisova AA , Stenyaeva NN, Gardanova ZR, Nazarenko TA, Dolgushina NV


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

Androgens play a key role in the physiology of the female body and the reproductive system. Androgen receptor expression in the various tissues points to the importance of androgens in the regulation of the female sexual and social functioning. The study aimed to evaluate sexual functioning in women with infertility and diminished ovarian reserve (DOR) using the Female Sexual Functioning Index questionnaire (FSFI). A cross-sectional study of 496 patients with infertility and DOR assessed the degree of sexual dysfunction in conjunction with the changes in the androgenic profiles as indicated by the androstenedione levels in the blood serum. Women with infertility and DOR were significantly more likely to report changes in sexual functioning, including a decrease in libido and in the quality and frequency of sexual relations. Furthermore, patients with normal androstenedione levels generally significantly outscored patients with decreased androstenedione levels (average questionnaire scores 21.2 ± 7.2 and 15.17 ± 3.0 respectively), indicating a lesser degree of sexual dysfunction in the former group; on the other hand, the latter group reported increased pain and decreased attraction, arousal, lubrication, orgasm, and satisfaction. Hormonal profile changes in patients with DOR, including decreased androstenedione levels, significantly impact sexual functioning, and their detection in clinical practice will allow to objectify complaints at an earlier state in order to assess the severity of sexual dysfunction and determine further personalized management tactics.

Keywords: androgens, androgen deficiency, reproductive age, infertility, diminished ovarian reserve, ART, questionnaire, sexual dysfunction, FSFI

Author contribution: Gavisova AA — analysis, manuscript writing, final approval; Gavisova AA, Dolgushina NV — study design; Stenyaeva NN, Gardanova ZR, Nazarenko TA, Dolgushina NV — review.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical review board at the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 2 of 07 February 2019).

 **Correspondence should be addressed:** Alla A. Gavisova
Akademika Oparina, 4, Moscow, Russia; 117997; gaviiala@ya.ru

Received: 26.08.2022 **Accepted:** 13.09.2022 **Published online:** 23.09.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.045

Современный стиль жизни многих женщин в первую очередь складывается из формирования карьеры, выбора партнера и лишь на вторую половину жизни приходится решение о рождении ребенка, которое они принимают уже на фоне изменения концентраций репродуктивно значимых гормонов к возрасту 35–38

лет, еще до нарушения ритма менструаций. Изменение гормонального профиля клинически манифестирует к 40 годам. Оно сопряжено с изменением процессов фолликулогенеза и вносит вклад в структуру бесплодия [1], идентифицирующегося как отсутствие беременности при регулярной сексуальной жизни в течение года, в связи с

чем у женщин со снижением овариального резерва (COP) изменение сексуального функционирования сопряжено с уровнем антимюллерового гормона (АМГ).

В процессах фолликулогенеза важную роль играют андрогены, формирующие определенные поведенческие особенности, в том числе сексуальное функционирование, что особенно ярко прослеживается в мужском организме. Выработка андрогенов под воздействием лютеинизирующего гормона (ЛГ) стимулирует появление рецепторов фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) на клетках гранулезы. Андрогены участвуют в процессе дифференцировки и созревания фолликулов, особенно на ФСГ-зависимых ранних антральных стадиях [2].

Экспрессия андрогенных рецепторов (АР) в различных тканях, включая центральную нервную систему и репродуктивные органы, свидетельствует о важной роли андрогенов в регуляции сексуального и социального функционирования женщин. Гонадэктомия приводит к изменениям в нейропластичности гиппокампа, депрессивному поведению и подавлению сексуальной мотивации.

Мозг является одной из главных мишеней для половых гормонов, как для эстрадиола в центральной модуляции сексуального желания, так и для тестостерона, который считают «королем» сексуальности. Андрогены играют важную роль в поддержании всех фаз сексуального функционирования и оказывают длительное влияние на многие нейронные и поведенческие функции посредством как геномных, так и негеномных эффектов [3].

АР обладают высоким сродством к дигидротестостерону (ДГТ) в области мозга, регулирующей сексуальное поведение, — медиальной преоптической области гипоталамуса. Нейроэндокринные механизмы, лежащие в основе влияния тестостерона на сексуальное функционирование женщин, продолжают изучать: через прямую стимуляцию андрогенных рецепторов или через преобразование андрогенов в эстрогены и последующее связывание с эстрогенными рецепторами [4].

Андростендион (А) является предшественником тестостерона и других андрогенов, а также эстрогенов в организме. Учитывая сложности определения уровня андрогенов и отсутствие нижних референсных значений у женщин репродуктивного возраста, при анализе андрогенного профиля у пациенток с COP целесообразно ориентироваться на уровень андростендиона.

В настоящее время для оценки сексуального функционирования используют опросник «Индекс женской сексуальной функции» (Female Sexual Function Index, FSFI), который позволяет оценить степень выраженности нарушений сексуального функционирования, обусловленных снижением андрогенов [5, 6].

Все вышеизложенное послужило поводом к проведению данного исследования, целью которого было оценить выраженность нарушений сексуального функционирования у пациенток с бесплодием и COP по данным психодиагностического тестирования.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Было проведено одномоментное исследование в параллельных группах. В исследование включили 496 пациенток. Критерии включения: возраст от 18 до 42 лет; подтвержденные бесплодие и COP. Критерии исключения: хирургическая менопауза (двусторонняя овариэктомия или гистерэктомия); гормонпродуцирующие

опухоли; ИМТ $\leq 18 \text{ кг/м}^2$ и $\geq 30 \text{ кг/м}^2$; ВИЧ-инфекция и другие иммунодефицитные состояния; наличие ревматических заболеваний, прохождение иммуномодулирующей терапии; прием глюкокортикоидов (ГК), комбинированных оральных контрацептивов (КОК), других гормональных препаратов; использование средств внутриматочной контрацепции (ВМК); наличие онкологических заболеваний; беременность и лактация. При сборе анамнеза учитывали возраст пациентки, возраст наступления менопаузы у матери, индекс массы тела (ИМТ).

У пациенток определяли гормональный профиль методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА). Для всех гормонов проводили ROC-анализ, критерием прогностической значимости считали площадь под кривой AUC от 0,6. Рассчитывали чувствительность и специфичность моделей по данным логистической регрессии в качестве прогностических факторов для выявления снижения уровня андрогенов. По результатам анализа у женщин репродуктивного возраста наиболее прогностически значимой оказалась концентрация андростендиона (точка «cut off» = 7,034) (см. рисунок).

По результатам анализа гормонов были сформированы две группы пациенток в зависимости от наличия снижения концентрации А. Группа 1 включала 256 женщин со сниженным уровнем А ($\leq 7,0 \text{ нмоль/л}$), группа 2 — 240 женщин с нормальным уровнем А ($> 7,0 \text{ нмоль/л}$).

Женское сексуальное функционирование оценивали по шести показателям в баллах: влечение, возбуждение, lubricация, оргазм, удовлетворение, боль. Баллы подсчитывали по каждому пункту посредством умножения полученного показателя (0(1)–5) на множитель; общий балл представлял собой сумму по всем шкалам. С целью подтверждения результата каждая пациентка отвечала на опросник дважды, с интервалом в один месяц. Пороговое значение для здоровых женщин с отсутствием нарушений сексуального функционирования — 29 баллов. Меньший суммарный балл по данным опросника соответствует более выраженным нарушениям сексуального функционирования [5, 6].

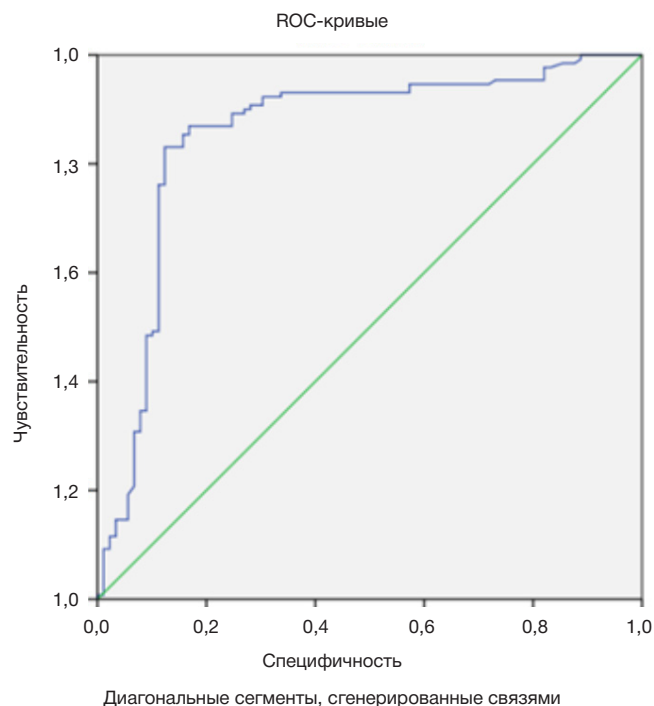


Рис. ROC-кривая для андростендиона

Таблица 1. Гормональная характеристика пациенток исследуемых групп

<i>n</i> = 496	Сниженный уровень А (<i>n</i> = 256)	Нормальный уровень А (<i>n</i> = 240)	<i>p</i>
ЛГ, мМЕ/мл	5,3 (2,8–8,3)	5,1 (3,2–9,8)	0.112
ФСГ, мМЕ/мл	7,9 (6,3–9,5)	6,7 (4,6–8,8)	0.1009
Тобщ, нмоль/л	0,7 (0,5; 1,2)	1,1 (0,6; 1,7)	0.0586
Тсв, пг/мл	1,7 (0,6; 2,1)	2,1 (0,7; 3,3)	0.4696
ДГТ, пг/мл	294 (152; 554)	269 (201,5; 422,0)	0.0768
ДГЭАС, мкмоль/л	4,5 (2,4; 6,8)	4,6 (2,6; 7,7)	0.2019
17-ОП, нмоль/л*	2,2 (1,0; 4,3)	3,15 (2,3; 3,8)	0.0174
А, нмоль/л*	4,5 (2,5; 7,0)	8,9 (7,1; 11,6)	<0,001
АМГ, нг/мл*	1,0 (0,4; 4,2)	2,7 (1,3; 5,6)	<0,001

Примечание: данные представлены в виде медианы (нижний и верхний квартиль); * — критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$; ЛГ — лютеинизирующий гормон; ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; Т_{общ} — общий тестостерон; Т_{св} — свободный тестостерон; ДГТ — дигидротестостерон; ДГЭАС — дигидроэпиандростерона сульфат; 17-ОП — 17-оксипрогестерон; А — андростендион; АМГ — антимюллеров гормон.

Для статистической обработки данных использовали пакет статистических программ «Statistica V10» (StatSoft Inc.; США). Вид распределения количественных данных определяли с помощью теста Колмогорова–Смирнова и графического анализа данных перед проведением сравнительного анализа в исследуемых группах. При нормальном виде распределения вычисляли среднее значение со стандартным отклонением (СО), метод параметрической статистики (*t*-тест) применяли с целью оценки различий в двух группах. При распределении данных, отличающемся от нормального, определяли медиану и интерквартильный размах; для оценки различий в группах применяли метод непараметрической статистики (тест Манна–Уитни). Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены женщины репродуктивного возраста с бесплодием и СОР, обратившиеся для достижения беременности в программе ЭКО/ИКСИ в Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова (Москва, Россия). Средний возраст женщин — $37,3 \pm 2,4$ года. У всех пациенток был регулярный менструальный цикл, средняя продолжительность которого составила $27,4 \pm 2,1$ дней. Все пациентки демонстрируют высокий уровень интеллекта и социальной ответственности.

На проведенные оперативные вмешательства (аппендэктомия или диагностическую лапароскопию, в том числе в связи с трубно-перитонеальным фактором) указывали 30% пациенток. При анализе перенесенных воспалительных и инфекционных заболеваний половых органов каждая третья пациентка отмечала наличие в анамнезе *ureaplasma parvum*. Отмечено в среднем более трех безуспешных программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) (ЭКО и криопротокोल), завершившихся негативным результатом на этапе гормональной верификации беременности. Длительность бесплодия составила $6,8 \pm 5,9$ лет, 349/496 (70,6%) пациенток были с первичным бесплодием. Число проводимых циклов ВРТ в анамнезе составило $2,7 \pm 2,2$. Наличие в анамнезе беременностей, закончившихся родами, отмечено у 49/147 (33,3%) пациенток, медицинский аборт по различным показаниям — у 28/147 (19%), наличие в анамнезе случаев прерывания беременности на ранних

сроках (6–7 недель гестации), составило 52/147 (35,4%). ИМТ у пациенток составил $24,6 \pm 5,4$ кг/м².

По данным исследования гормонального профиля выявлены статистически значимые различия в группе пациенток со снижением концентраций андрогенов по таким показателям, как 17-ОП, А и АМГ (табл. 1).

С целью оценки сексуального функционирования всем пациенткам было проведено тестирование. Для женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом при уровне А > 7,0 нмоль/л характерен суммарно больший общий балл ($21,2 \pm 7,2$), что говорит о меньшей степени выраженности нарушений сексуального функционирования. В группе со снижением уровня А средний балл статистически значимо ниже ($15,17 \pm 3,0$). Также, рассматривая отдельные характеристики сексуального функционирования, в этой группе наблюдаются снижение влечения, возбуждения, удовлетворения, оргазма, lubricации и увеличение болевых ощущений.

При наличии лабораторно подтвержденного снижения уровня А менее 7,0 нмоль/л полученные данные опросника подтверждают вовлеченность и сопряженность нарушений сексуального функционирования у женщин с СОР и бесплодием (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование было направлено на определение выраженности и распространенности нарушений сексуального функционирования у пациенток репродуктивного возраста с бесплодием и СОР.

Наиболее быстро реагируют на изменение концентрации андрогенов ткани, в которых наблюдается экспрессия андрогенных рецепторов, в том числе в нервной системе, что подтверждает выявленные в нашем исследовании нарушения сексуального функционирования, например, снижение либидо, оргазмов, удовлетворения сексуальной жизнью [7].

Нарушения женского сексуального функционирования многогранны. Их встречаемость зависит от этнической принадлежности, возраста женщины. При исследовании 1749 пациентов сексуальная дисфункция в возрасте 18–59 лет была выявлена чаще у женщин (43% случаев), чем у мужчин (31% случаев) [8]. При сохраненном ритме менструального цикла количество антральных фолликулов и АМГ снижается, а концентрация эстрогенов зависит от наличия лидирующего фолликула. Гипоэстрогения определяется ближе к менопаузальному периоду,

Таблица 2. Сравнительная оценка сексуального функционирования женщин по данным опросника FSFI (M ± SD)

	Сниженный уровень A (n = 256)	Нормальный уровень A (n = 240)	p
Влечение*	2,58 ± 0,95	3,45 ± 1,55	0,003
Возбуждение*	2,15 ± 0,8	2,98 ± 1,39	0,003
Любрикация*	2,88 ± 0,49	3,96 ± 0,87	< 0,001
Оргазм*	2,4 ± 0,8	3,48 ± 1,36	< 0,001
Удовлетворение*	2,68 ± 0,98	3,54 ± 1,43	0,002
Боль*	2,45 ± 1,0	3,79 ± 1,26	< 0,001
Сумма*	15,17 ± 3,0	21,2 ± 7,2	< 0,001

Примечание: * — критерий Стьюдента, p < 0,05.

тогда как снижение уровня андрогенов, в частности дегидроэпиандростерона (ДГЭА), манифестирует задолго до наступления менопаузы. По данным многочисленных исследований, снижение концентрации ДГЭА, обладающего слабой андрогенной активностью и участвующего в синтезе половых гормонов, отмечается уже после 30 лет [9].

Снижение синтеза половых стероидов в сыворотке крови вносит дополнительный вклад в комплекс нарушений, усугубляя психологический дискомфорт женщины [10]. Нами было показано, что у пациенток при сниженном уровне андрогенов (андрогенном дефиците) чаще встречаются изменения сексуального функционирования. Статистически значимо чаще отмечались нарушения всех параметров опросника FSFI, в том числе снижение возбуждения и либидо (полового влечения). Эти данные согласуются с результатами другого исследования, где выявленные сниженные уровни андрогенов у женщин в постменопаузе ассоциированы и приводят к снижению либидо при относительном сохранении физиологических механизмов половой функции [11].

Снижение сексуального функционирования, по данным нашего исследования, коррелировало со снижением уровней АМГ, 17-ОП и андростендиона. Аналогично нашим данным в исследовании женщин с гипоактивной сексуальной дисфункцией выявлен статистически значимо более низкий уровень двух предшественников тестостерона — А и ДГЭА-С. По данным других авторов, существующая взаимосвязь низких уровней андрогенов и сексуального желания тоже была ассоциирована с концентрацией ДГЭАС [12].

Применение эстрогенов в составе менопаузальной гормональной терапии (МГТ) у женщин в постменопаузе ассоциировано с незначительным улучшением сексуального функционирования и отсутствием влияния на либидо [13], тогда как в рандомизированном

платцебо-контролируемом исследовании на фоне комбинированной МГТ с препаратами тестостерона у женщин в постменопаузе отмечена нормализация уровней общего и свободного тестостерона с улучшением сексуального функционирования: сексуального удовлетворения, общего самочувствия и настроения [14], что также подтверждает роль андрогенов в поддержании сексуального функционирования.

Снижение уровней андрогенов вносит значимый и, возможно, определяющий вклад в нарушение сексуального функционирования. На основании только лабораторных данных не всегда можно определить ранние изменения андрогенного профиля, так как клиническая диагностика, как правило, носит ретроспективный характер, когда изменения уже достаточно выраженные [15]. Также необходимо учитывать вероятное снижение концентрации половых рецепторов как фактора сужения окна терапевтических возможностей.

ВЫВОДЫ

Проведение психодиагностического тестирования, по данным опросника FSFI, у женщин репродуктивного возраста с бесплодием и СОР позволяет выявить изменения сексуального функционирования у женщин репродуктивного возраста и может быть рассмотрено как метод ранней оценки изменений концентрации андрогенов. Снижение показателей сексуального функционирования при бесплодии и СОР ассоциировано с физиологическим снижением уровня андростендиона как предшественника тестостерона и эстрадиола и патогенетически объясняется снижением функциональной активности яичников и концентрацией андрогенов в организме. Необходимы дальнейшие исследования для своевременной персонифицированной коррекции изменения сексуального функционирования.

Литература

1. Kirschner AA, Bardin CW. Androgen production and metabolism in normal and virilized women. *Metabolism*. 1972; 21 (7): 667–88. DOI: 10.1016/0026-0495(72)90090-x.
2. Lenie S, Smits J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol Reprod*. 2009; 80 (4): 685–95. DOI: 10.1095/biolreprod.107.067280. Epub 2008 Dec 10. PMID: 19074005.
3. Bramen JE, Hranilovich JA, Dahl RE, Chen J, Rosso C, Forbes EE, et al. Sex matters during adolescence: testosterone-related cortical thickness maturation differs between boys and girls. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e33850. DOI: 10.1371/journal.pone.0033850. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22479458; PMCID: PMC3315517.
4. Cappelletti M, Wallen K. Increasing women's sexual desire: the comparative effectiveness of estrogens and androgens. *Horm Behav*. 2016; 78: 178–93. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2015.11.003. Epub 2015 Nov 14.
5. Rosen R, Brown C, Heiman J, Leiblum S, Meston C, Shabsigh R, et al. The Female Sexual Function Index (FSFI): a multidimensional self-report instrument for the assessment of female sexual function. *J Sex Marital Ther*. 2000; 26 (2): 191–208. DOI: 10.1080/009262300278597. PMID: 10782451.
6. Стеняева Н. Н., Хритинин Д. Ф., Чаусов А. А. Гинекологические заболевания как предикторы женской сексуальной дисфункции. *Гинекология*. 2021: 2.

7. Poletti A, Martini L. Androgen-activating enzymes in the central nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 69 (1–6): 117–22. DOI: 10.1016/S0960-0760(98)00150-2. PMID: 10418985.
8. Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA.* 1999; 281: 537–44.
9. Гончаров Н. П., Дедов И. И., Гависова А. А., Сухих Г. Т. Эндокринная система человека в различные периоды его жизни. М.: Издательство АдамантЪ, 2020.
10. Graziottin A, Serafini A, Palacios S. Aetiology, diagnostic algorithms and prognosis of female sexual dysfunction. *Maturitas.* 2009; 63 (2): 128–34. DOI: 10.1016/j.maturitas.2009.04.007. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19493639.
11. Bemserderfer S. A revised psychoanalytic view of menopause. *J Am Psychoanal Assoc.* 1996; 44 Suppl: 351–69. PMID: 9170070.
12. Worboys S, Kotsopoulos D, Teede H, McGrath B, Davis SR. Evidence that parenteral testosterone therapy may improve endothelium-dependent and -independent vasodilation in postmenopausal women already receiving estrogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (1): 158–61. DOI: 10.1210/jcem.86.1.7103. PMID: 11231994.
13. Nastri CO, Lara LA, Ferriani RA, Rosa-E-Silva AC, Figueiredo JB, Martins WP. Hormone therapy for sexual function in perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; (6): CD009672. DOI: 10.1002/14651858.CD009672.pub2. PMID: 23737033.
14. Davis SR, Goldstat R, Papalia MA, Shah S, Kulkarni J, Donath S, et al. Effects of aromatase inhibition on sexual function and well-being in postmenopausal women treated with testosterone: a randomized, placebo-controlled trial. *Menopause.* 2006; 13 (1): 37–45. DOI: 10.1097/O1.gme.0000168061.32917.83. PMID: 16607097.
15. Bachmann G, Bancroft J, Braunstein G, Burger H, Davis S, Dennesstein L. Female androgen insufficiency: the Princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. *Fertil Steril.* 2002; 77 (4): 660–5. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)02969-2.

References

1. Kirschner AA, Bardin CW. Androgen production and metabolism in normal and virilized women. *Metabolism.* 1972; 21 (7): 667–88. DOI: 10.1016/0026-0495(72)90090-x.
2. Lenie S, Smits J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 2009; 80 (4): 685–95. DOI: 10.1095/biolreprod.107.067280. Epub 2008 Dec 10. PMID: 19074005.
3. Bramen JE, Hranilovich JA, Dahl RE, Chen J, Rosso C, Forbes EE, et al. Sex matters during adolescence: testosterone-related cortical thickness maturation differs between boys and girls. *PLoS One.* 2012; 7 (3): e33850. DOI: 10.1371/journal.pone.0033850. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22479458; PMCID: PMC3315517.
4. Cappelletti M, Wallen K. Increasing women's sexual desire: the comparative effectiveness of estrogens and androgens. *Horm Behav.* 2016; 78: 178–93. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2015.11.003. Epub 2015 Nov 14.
5. Rosen R, Brown C, Heiman J, Leiblum S, Meston C, Shabsigh R, et al. The Female Sexual Function Index (FSFI): a multidimensional self-report instrument for the assessment of female sexual function. *J Sex Marital Ther.* 2000; 26 (2): 191–208. DOI: 10.1080/009262300278597. PMID: 10782451.
6. Stenyaeva NN, Khritinin DF, Chausov AA. Ginekologicheskie zabollevaniya kak prediktory zhenskoy seksual'noj disfunkcii. *Ginekologiya.* 2021; 2. Russian.
7. Poletti A, Martini L. Androgen-activating enzymes in the central nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 69 (1–6): 117–22. DOI: 10.1016/S0960-0760(98)00150-2. PMID: 10418985.
8. Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA.* 1999; 281: 537–44.
9. Goncharov NP, Dedov II, Gavisova AA, Sukhikh GT. Ehndokrinnaya sistema cheloveka v razlichnye periody ego zhizni. M.: Izdatel'stvo Adamant, 2020. Russian.
10. Graziottin A, Serafini A, Palacios S. Aetiology, diagnostic algorithms and prognosis of female sexual dysfunction. *Maturitas.* 2009; 63 (2): 128–34. DOI: 10.1016/j.maturitas.2009.04.007. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19493639.
11. Bemserderfer S. A revised psychoanalytic view of menopause. *J Am Psychoanal Assoc.* 1996; 44 Suppl: 351–69. PMID: 9170070.
12. Worboys S, Kotsopoulos D, Teede H, McGrath B, Davis SR. Evidence that parenteral testosterone therapy may improve endothelium-dependent and -independent vasodilation in postmenopausal women already receiving estrogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (1): 158–61. DOI: 10.1210/jcem.86.1.7103. PMID: 11231994.
13. Nastri CO, Lara LA, Ferriani RA, Rosa-E-Silva AC, Figueiredo JB, Martins WP. Hormone therapy for sexual function in perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; (6): CD009672. DOI: 10.1002/14651858.CD009672.pub2. PMID: 23737033.
14. Davis SR, Goldstat R, Papalia MA, Shah S, Kulkarni J, Donath S, et al. Effects of aromatase inhibition on sexual function and well-being in postmenopausal women treated with testosterone: a randomized, placebo-controlled trial. *Menopause.* 2006; 13 (1): 37–45. DOI: 10.1097/O1.gme.0000168061.32917.83. PMID: 16607097.
15. Bachmann G, Bancroft J, Braunstein G, Burger H, Davis S, Dennesstein L. Female androgen insufficiency: the Princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. *Fertil Steril.* 2002; 77 (4): 660–5. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)02969-2.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА RMI-IV И RMI-V ПРИ ДООПЕРАЦИОННОМ ПРОГНОЗИРОВАНИИ ХАРАКТЕРА ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ У БЕРЕМЕННЫХ

А. А. Герасимова¹, Ю. В. Шевченко¹, П. А. Клименко² ✉, Л. А. Ашрафян³

¹ Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

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

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Прогнозирование характера опухолей яичников у беременных имеет важное клиническое значение, но значительно затруднено. В последние 5–10 лет у небеременных в гинекологии предложено использовать RMI (Risk of malignancy index), однако в акушерской практике ценность этого исследования еще не установлена. Целью исследования было определить RMI-IV и RMI-V при дооперационном неинвазивном прогнозировании характера опухолей яичников у беременных. Ретро и проспективно отобраны данные клиничко-лабораторного обследования 114 беременных 20–38 лет, из которых 15 пациенток имели злокачественные опухоли яичников (ЗОЯ), 28 пациенток — пограничные опухоли яичников (ПОЯ) и 71 пациентка — доброкачественные опухоли яичников (ДОЯ). Проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) с использованием цветовой доплерографии и импульсно-волновой доплерометрии. Определяли концентрацию СА-125 с помощью иммуноферментного анализа. Для оценки риска рака яичников использовали модификации IV, V. В крови беременных с ЗОЯ было выявлено умеренное статистически не значимое повышение СА-125 по сравнению с таковыми значениями у пациенток с ДОЯ и ПОЯ. По сравнению с группой беременных с ДОЯ, пациентки с ПОЯ и ЗОЯ демонстрировали повышенный уровень RMI-IV и RMI-V. Для гарантированного различия в диагностике опухолей необходимы крайние значения (RMI-IV — выше 3500 указывают на ЗОЯ, ниже 100 — на отсутствие злокачественного процесса). Для RMI-V аналогичными значениями являются 1500 и 60. Однако для принятия решения в большинстве наблюдений наличия только показателей RMI-IV и RMI-V было недостаточно и требовалось использовать комплексный подход. Таким образом, определить характер новообразований яичников у беременных трудно, если использовать только индексы RMI. Для дооперационного прогнозирования характера опухолей яичников у беременных требуется комплексное клиническое обследование с использованием визуализационных методов, применение моделей прогнозирования, учитывающих большое количество описательных «морфологических» характеристик опухолей.

Ключевые слова: доброкачественные и злокачественные опухоли яичников, ультразвуковое исследование, RMI

Вклад авторов: авторы внесли равнозначный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили ее финальную версию перед публикацией

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 176 от 25 июня 2018 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Петр Афанасьевич Клименко
Севастопольский проспект, д. 24а, г. Москва, 117209, Россия; pa.klimenko@mail.ru

Статья получена: 27.09.2022 **Статья принята к печати:** 12.10.2022 **Опубликована онлайн:** 24.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.050

COMPARATIVE ASSESSMENT OF RMI-IV AND RMI-V IN PREOPERATIVE PREDICTION OF OVARIAN TUMOR TYPE IN PREGNANT WOMEN

Gerasimova AA¹, Chevchenko UV¹, Klimenko PA² ✉, Asyrafyan LA³

¹ Center of Family Planning and Reproduction of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Prediction of ovarian tumor type in pregnant women is of great clinical significance, however, it is vastly difficult. In the last 5–10 years gynecologists were suggested to use RMI (Risk of Malignancy Index) in non-pregnant women, however the value of the test for obstetric practice has yet to be established. The study was aimed to determine RMI-IV and RMI-V during preoperative non-invasive prediction of ovarian tumor type in pregnant women. Retrospective and prospective clinical and laboratory data of 114 pregnant women aged 20–38 were collected. Among them 15 patients had malignant ovarian tumors (MOTs), 28 had borderline ovarian tumors (BOTs), and 71 had benign ovarian tumors. Color Doppler and pulsed wave Doppler ultrasound was performed. The levels of CA-125 were defined by enzyme immunoassay. Models IV, V were used to assess the risk of ovarian cancer. A moderate non-significant increase in blood levels of CA-125 compared to patients with benign ovarian tumors and BOTs was found in pregnant women with MOTs. Patients with BOTs and MOTs showed higher RMI-IV and RMI-V values compared to the group of pregnant women with benign ovarian tumors. Extreme values are required to guarantee the differences in the diagnosis of tumors (RMI-IV > 3500 indicate the presence of MOTs, the values below 100 indicate no malignancy). Similar RMI-V values are 1500 and 60. However, in most cases, availability of RMI-IV and RMI-V is insufficient for decision making, and a comprehensive approach has to be used. Thus, it is difficult to define ovarian mass type in pregnant women using RMI only. Comprehensive clinical assessment with the use of imaging methods is required for preoperative prediction of ovarian mass type in pregnant women, along with the use of prognostic models taking into account the majority of descriptive “morphological” tumor characteristics.

Keywords: benign and malignant ovarian tumors, ultrasound, RMI

Author contribution: the authors contributed equally to the study and manuscript writing, read and approved the final version of the paper prior to publishing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 176 of 25 June 2018). All patients submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pyotr A. Klimenko
Sevastopolsky prospect, 24a, Moscow, 117209, Russia; pa.klimenko@mail.ru

Received: 27.09.2022 **Accepted:** 12.10.2022 **Published online:** 24.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.050

Большой научный и практический интерес представляет дифференциальная диагностика неоплазий яичников во время беременности, при которых часто выполняют хирургические вмешательства на органах малого таза. Прирост стандартизированных показателей заболеваемости данной патологией в России составляет около 4% за последние 5 лет [1]. Отмечается тенденция к увеличению числа случаев сочетания беременности и опухолей яичников (ОЯ) [2]. При этом у 87,0% молодых пациенток опухоли имеют доброкачественную структуру. Правильно выбранная тактика (консервативная или оперативная) особенно важна у беременных и зависит от характера образования яичника, установленного в результате применения специальных методов исследования [3–5]. Как известно, при составлении прогноза возможны ложноотрицательные и ложноположительные результаты. В акушерской практике у пациенток с опухолями яичников недопустимы ошибки как первого рода (ложноположительная ошибка — определить болезнь, когда ее нет), так и второго (ложноотрицательная ошибка — неопознанная болезнь). Ошибки первого рода могут привести к необоснованному хирургическому лечению опухолей в период раннего эмбриогенеза и плацентации и, возможно, к потере желанной беременности, второго рода — без лечения вызвать резкое прогрессирование заболевания.

Совершенствование неинвазивных методов диагностики опухолей яичников, основанных на сочетании результатов клинических данных, уровней онкомаркеров и визуализационных, методик привело к предложению использования моделей RMI (Risk of malignancy index)

для дифференциальной диагностики опухолей яичников [6]. Считается, что оценка RMI наиболее информативна в дифференциально-диагностическом поиске у пациенток с новообразованиями яичников по сравнению с применением других критериев злокачественных овариальных опухолей [7]. На сегодняшний день известны уже пять модификаций RMI. Однако использование их в гинекологической практике из-за отсутствия универсальности и неоднозначности результатов их применения не всегда достоверно, а в акушерской практике таких исследований слишком мало.

Поэтому целью нашего исследования было определение RMI-IV и RMI-V при дооперационном неинвазивном прогнозировании характера опухолей яичников у беременных.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

За период с 2000 по 2021 г. были отобраны ретро и проспективные данные клинко-лабораторного обследования 114 беременных в возрасте 20–38 лет (медиана — 31,3 года), из которых 15 пациенток со злокачественными опухолями яичников (ЗОЯ), 28 пациенток с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) и 71 пациентка с доброкачественными новообразованиями яичников (табл. 1). Критерии включения пациенток: наличие беременности на ранних сроках (1–2 триместр) и опухолей яичников. Критерий исключения: отсутствие беременности.

Исследование выполнено на базе «ГБУЗ Центр планирования семьи и репродукции ДЗМ».

УЗИ проводили на аппарате Voluson E8 (General Electric; США) с использованием трансабдоминальной

Таблица 1. Распределение гистологических вариантов опухолей яичников у беременных

1. Злокачественные опухоли яичника	
Эпителиальные	
Серозная аденокарцинома	3
Муцинозная аденокарцинома	2
Светлоклеточная аденокарцинома	1
Герминогенные	
Незрелая тератома	2
Дисгерминома	3
Опухоль желточного мешка	1
Смешанная герминогенная опухоль	1
Метастатические	2
Итого:	15
2. Пограничные опухоли яичника	
Серозные	24
Муцинозные	1
Эндометриоидные	1
Серозно-муцинозные	2
Итого:	28
3. Доброкачественные опухоли яичника	
Струма	1
Серозная цистаденома	19
Муцинозная цистаденома	9
Текома/Фиброма	6
Зрелая тератома	16
Эндометриома	20
Итого:	71

Таблица 2. Данные описательной статистики СА-125 и индексов риска малигнизации (RMI-IV и RMI-V) у беременных с доброкачественными, пограничными и злокачественными опухолями яичников

		Доброкачественные опухоли	Пограничные опухоли	Злокачественные опухоли
Количество		71	28	15
СА-125	Значение	69,7 ± 49,9	63,3 ± 52	95 ± 53,1
	Минимум	5,29	4,8	15,4
	Максимум	361	361	703
	Стандартное отклонение	73,6	75,9	170,9
	Медиана	40	34,6	73,5
RMI-IV	Значение	275,6 ± 56,1	283,3 ± 74,4	1031 ± 357,2
	Минимум	8,3	8,9	123
	Максимум	2888	1776	5631
	Стандартное отклонение	505	393,7	1383,3
	Медиана	88	104	518,4
RMI-V	Значение	125,0 ± 25,2	183,7 ± 42,0	515 ± 178,6
	Минимум	5,29	9,7	61
	Максимум	1444	888	2815
	Стандартное отклонение	227	222,4	691,6
	Медиана	54	70	259,2

и трансвагинальной цветовой доплерографии и импульсно-волновой доплерометрии.

Концентрацию СА-125 исследовали с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-системы производителя (Siemens; Германия).

Для оценки риска рака яичников (РЯ) использовали комбинированные оценки показателей риска РЯ (Risk of malignancy index, RMI) в модификации IV, V [8–11].

Для статистической обработки данных применяли прикладной пакет программ SPSS 15.0. (INC; США). Использовали описательную статистику и корреляционный анализ по методу Спирмена. Поиск достоверных различий между выборками проводили с помощью критериев Уилкоксона и Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$. Крайние варианты (лимиты ряда), ограничивающие вариационный ряд, указывали в виде $(V_{\max} \div V_{\min})$. Описательная статистика для количественных переменных представлена в формате M (SD) (среднее арифметическое и стандартное отклонение). При анализе ROC-кривых использовали метод оценки площади под графиком «чувствительность/специфичность». Этот метод кроме оценки точности диагностики позволяет выбрать баланс между ошибками первого и второго рода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У большинства беременных были диагностированы эпителиальные опухоли, среди которых преобладали доброкачественные гистологические типы ($n = 71$). Злокачественные эпителиальные новообразования (6 из 15) диагностированы практически в одинаковом соотношении с герминогенными (7 из 15). Среди ПОЯ преобладали серозные опухоли (25 из 28). Большинство ПОЯ и ЗОЯ были выявлены в IA стадии, однако у 7 пациенток опухолевый процесс соответствовал IIIC стадии. Распределение гистологических типов ОЯ у беременных представлено в табл. 1.

Полученные данные показали, что все обследуемые беременные находились в детородном периоде примерно в одинаковом возрасте. Кроме того, в крови беременных с

ЗОЯ было выявлено умеренное статистически не значимое повышение СА-125 по сравнению с таковыми значениями у пациенток с ДОЯ и ПОЯ (табл. 2).

По сравнению с группой беременных с ДОЯ, пациентки с ПОЯ и ЗОЯ демонстрировали повышенный уровень RMI-IV и RMI-V.

Индивидуальный анализ показал, что в группе беременных с ДОЯ наибольшие значения RMI-IV (540–2888) и RMI-V (200–1444) были зарегистрированы у пациенток с двухсторонним глубоким эндометриозом яичников. При тератоме значение RMI-IV колебалось от 8,3 до 256, RMI-V — от 8,3 до 128. У пациенток с серозными папиллярными цистаденомами значение RMI-IV варьировало от 18,7 до 397, RMI-V — от 18,7 до 198,6. Самые низкие величины RMI-IV (13–144) и RMI-V (13–72) обнаружены при муцинозных цистаденомах. При остальных ДОЯ уровни RMI-IV и RMI-V варьировали между указанными значениями. При пограничных серозных опухолях наблюдались как небольшие, так и высокие значения RMI-IV (8,9–1776) и RMI-V (15–888). Следовательно, по изучаемым индексам малигнизации дифференцировать ДОЯ и ПОЯ не удалось. При ЗОЯ уровень RMI-IV колебался от 123,2 до 5631, RMI-V — от 61,6 до 2815,6, в каждом третьем наблюдении превышая показатели пациенток с ДОЯ. Статистически значимые различия были выявлены у больных ЗОЯ в IIIC стадии опухолевого процесса: при опухоли желточного мешка уровень RMI-IV составил 1016, RMI-V — 508, при серозной аденокарциноме RMI-IV достигал значения 5631,2, RMI-V — 2815,6. Высокие показатели диагностических алгоритмов обнаружены также у пациенток с дисгерминомами IA стадии: RMI-IV — от 1152 до 2168, RMI-V — от 567 до 1084.

При распределении частоты наблюдений по десятичной логарифмической шкале RMI-IV и RMI-V видны интервалы значений индексов, в которых перекрещиваются результаты всех трех групп (рис. 1). Для RMI-IV эти значения составили 100 и 1200, для RMI-V — 70 и 1200. В этих интервалах с помощью индексов RMI невозможно было определить, к какой группе относится та или иная опухоль у беременной, поэтому пациенток со значениями RMI от 70 до 1200 следует подвергать дополнительным

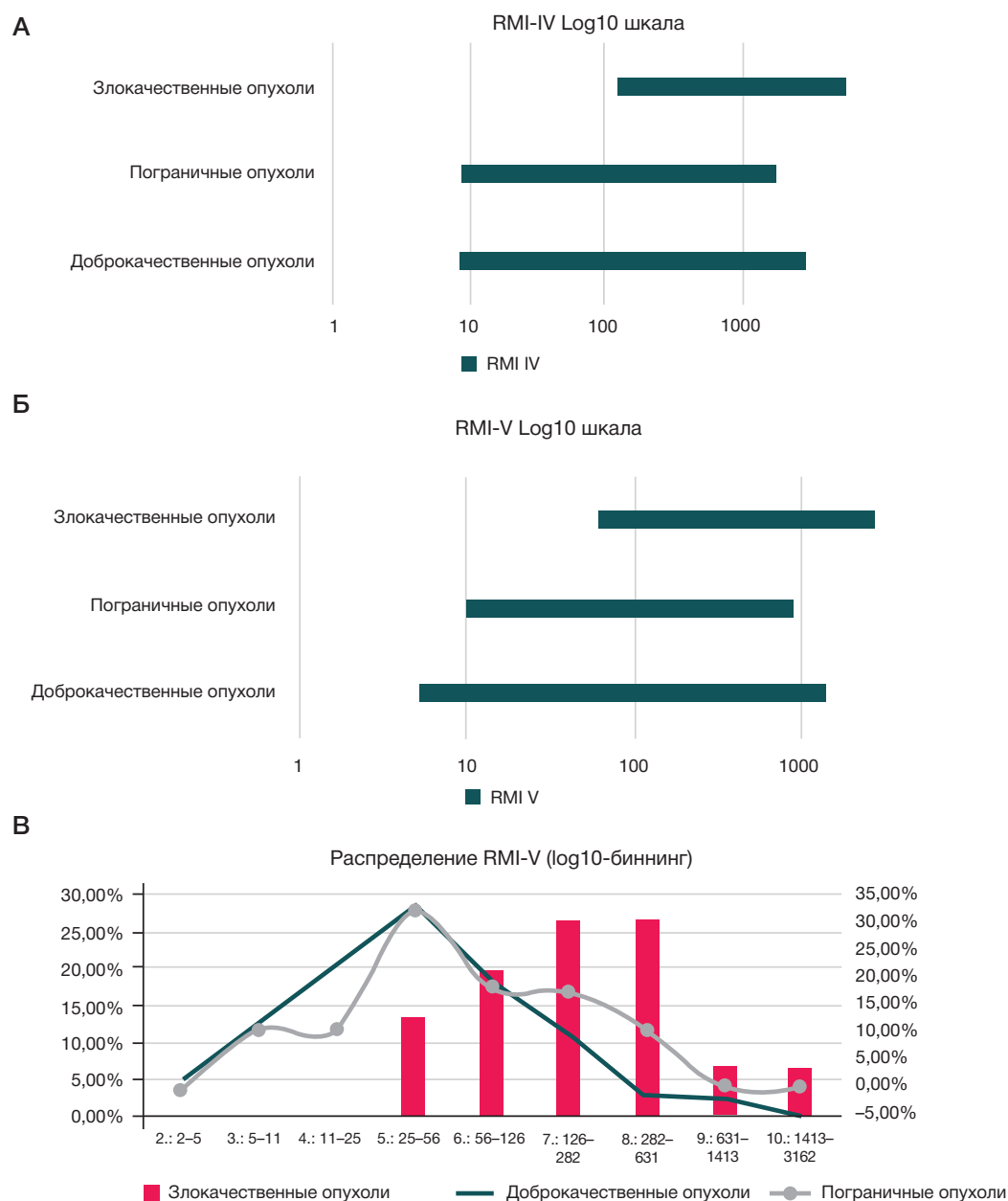


Рис. 1. Частотный анализ RMI-IV и RMI-V у обследованных беременных

методам обследования. Дифференцировать ДОЯ и ПОЯ по результатам диагностических моделей (RMI в модификации IV, V) не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследований, посвященных использованию комбинированных диагностических систем, свидетельствуют о неоднозначной ценности RMI при дооперационном прогнозировании характера образований яичников. Прежде всего, это связано с многообразием морфологических форм и фенотипической гетерогенностью неоплазий яичников. Поэтому использовать RMI-IV и RMI-V при прогнозировании характера опухолей яичников, имеющего существенное значение в выборе тактики ведения пациенток с ОЯ на ранних сроках беременности, изолированно не следует.

При прогнозировании характера опухолей у беременных нам приходилось рассматривать два негативных

исхода, что сближало между собой ошибки первого и второго рода. То есть при принятии окончательного решения ошибка приобретала критическое значение. Это приводило к тому, что мы не могли пожертвовать специфичностью (долей ложно отрицательных результатов) в пользу чувствительности и должны были использовать диагностические методы максимальной точности 90% и выше.

При попытке определения отсекающих значений RMI-IV и RMI-V нам удалось добиться точности определения ЗОЯ до 81%, однако такой результат был при низкой чувствительности (количество определений ЗОЯ при этом было меньше истинного), при смещении отсекающих значений в сторону чувствительности мы могли добиться точности 93%, в ущерб правильности определения незлокачественных опухолей, точность при этом падала до 70%. При этом отмечено 37% ложноположительных результатов (подозрений на ЗОЯ при их отсутствии), что являлось недопустимым (рис. 1 и 2).

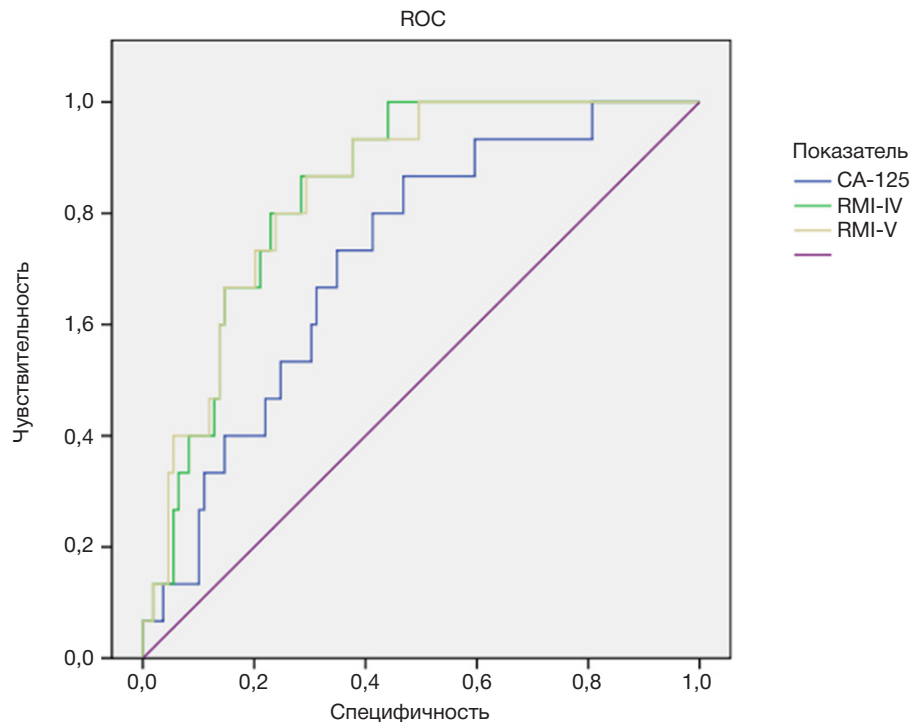


Рис. 2. ROC-кривые, характеризующие чувствительность и специфичность CA125, RMI-IV и RMI-V как предикторов успешности диагностики злокачественности опухолей яичников у беременных

При всех преимуществах применения показателей RMI-IV и RMI-V, чтобы получить гарантированное отличие в прогнозировании, были необходимы крайние значения (лимиты ряда) индексов (показатели RMI-IV выше 3500 указывают на ЗОЯ, ниже 100 — на отсутствие злокачественного процесса). Для RMI-V аналогичными значениями стали уровни 1500 и 60. При этом по частоте встречаемости большую значимость получили низкие значения. Однако для принятия медицинских решений в большинстве наблюдений наличие только показателей RMI-IV и RMI-V было недостаточным и следовало использовать комплексный подход: вместе со значениями RMI учитывать результаты УЗИ и МРТ, логрегрессионные модели, основанные на анализе большого количества маркеров ОЯ, например, способы, описанные ранее [12–18].

Было показано, что при ДОЯ уровни RMI (в модификации I–III) не должны превышать 200, а при ЗОЯ RMI-IV должен быть выше 450 [11, 19]. При этом чувствительность составила 73%, 81%, а специфичность — 93,7%, 89,6%, 93,7% и 92,3%. По результатам этих исследований, правильная диагностика возможна в 95% наблюдений.

В то же время есть сообщение, что при прогнозировании характера образований яичников, чувствительность составляет более 90%, а частота ложноотрицательных результатов — около 10% для всех модификаций RMI [20]. При этом установлено, что RMI-IV неэффективен при прогнозировании характера опухолей даже при пороговом значении, равном 450. Помимо того, при прогнозировании была обоснована необходимость применения доплеровских методик, впоследствии учтенная в алгоритме с RMI-V. Показатели внутри опухолевого кровотока, его выраженность при доплеровском исследовании и наличие солидного компонента были предикторами малигнизации, а размер

опухоли и изолированное значение CA-125 таковыми не являлись.

Другие исследователи при использовании RMI-IV обнаружили ложноположительные результаты у небеременных пациенток с ДОЯ при эндометриодных цистаденомах, фибромах, серозных цистаденофибромах [21]. Ложноотрицательные результаты они зарегистрировали у пациенток с ЗОЯ (при светлоклеточной и муцинозной карциномах).

По другим данным, величина RMI менее 25 свидетельствует о низком риске малигнизации, 25–200 — о промежуточном риске, уровни более 200 могут подтверждать высокий риск злокачественных процессов в яичниках [22]. В то же время диагностированы высокие значения RMI при глубоком эндометриозе яичников, а низкие (ниже 200) — у пациенток со светлоклеточной карциномой.

Наиболее близки к нашим результаты работы, в которой показано, что индекс RMI во время беременности изолированно использовать не следует, так как чувствительность при этом остается невысокой (50–55,6%), в связи с чем заключение о ДОЯ, ПОЯ и ЗОЯ необходимо принимать только в совокупности с клинической картиной и данными визуальных методов исследования [23].

ВЫВОДЫ

Определить характер новообразований яичников у беременных трудно, используя одни только индексы RMI. Для дооперационного прогнозирования характера опухолей яичников у беременных требуется комплексное клиническое обследование с использованием визуализационных методов, а также применение моделей прогнозирования, учитывающих большое количество описательных «морфологических» характеристик опухолей.

Литература

1. Стилиди И. А., Аксель Е. М. Стандартизированные показатели онкоэпидемиологической ситуации 2016 г. Международный научно-практический журнал. Евразийский онкологический журнал. 2018; 6 (2): 261–325.
2. Hoover K, Jenkins TR. Evaluation and management of adnexal mass in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 97–102.
3. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, et al. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206: 349–54.
4. Sarandakou A, Protonotariou E, Rizos D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007; 44: 151.
5. Yacobozzi M, Nguyen D, et al. Adnexal Masses in Pregnancy. *Semin Ultrasound CT MRI.* 2012; 33: 55–64.
6. National Institute for Health and Clinical Excellence: Ovarian cancer: recognition and initial management. *Clinical guideline.* 2011; 1–20.
7. Диагностика и лечение доброкачественных новообразований яичников с позиции профилактики рака. Клинические рекомендации (протокол лечения). Письмо Минздрава РФ. 2018. № 15-4/10/2-7838. Доступно по ссылке: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72047432/>.
8. Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG. A risk of malignancy index incorporating CA125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990; 97 (10): 922–29.
9. Tingulstad S, Hagen B, Skjeldestad FE, Onsrud M, Kiserud T, et al. Evaluation of a risk of malignancy index based on serum CA125, ultrasound findings and menopausal status in the pre-operative diagnosis of pelvic masses. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996; 103 (8): 826–31.
10. Tingulstad S, Hagen B, Skjeldestad FE, Halvorsen T, Nustad K, et al. The risk-of-malignancy index to evaluate potential ovarian cancers in local hospitals. *Obstet Gynecol.* 1999; 93 (3): 448–52.
11. Yamamoto Y, Yamada R, Oguri H, Maeda N, Fukaya T. Comparison of four malignancy risk indices in the preoperative evaluation of patients with pelvic masses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 144 (2): 163–67.
12. Tailor A, Jurcovic D, Bourne T. Sonographic prediction of malignancy in adnexal masses using multivariate logistic regression analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997; 10: 41–47.
13. Timmerman D, Bourne T, Taylor A. A comparison of methods of the pre-operative discrimination between benign and malignant adnexal masses. The development of a new logistic regression model. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 181: 57–65.
14. Timmerman D, Verrelst H, Bourne T. Artificial neural network models for the preoperative discrimination between malignant and benign adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999; 13: 17–25.
15. Valentin L, Hagen B, Tingulstad S, Eik-Nes S. Comparison of pattern recognition and logistic regression models for discrimination between benign and malignant pelvic masses. A prospective cross validation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 357–65.
16. Campbell S. Ovarian cancer: role of ultrasound in preoperative diagnosis and population screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012; 40: 245–54.
17. Герасимова А. А., Гус А. И., Клименко П. А. авторы; Герасимова А. А., Гус А. И., Клименко П. А., патентообладатели. Способ дифференциальной диагностики опухолеподобных образований и опухолей яичников у беременных. Патент РФ № 2325118; 05.06.07.
18. Герасимова А. А., Швырев С. Л., Соломатина А. А., Гус А. И., Клименко П. А. Способ выявления характера яичниковых образований. *Онкология.* 2013; 1: 34–40.
19. Yamamoto Y, Tsuchida A, Ushiwaka T, et al. Comparison of 4 risk-of-malignancy index in preoperative evaluation of patients with pelvic masses: a prospective study. *Clinical ovarian and other gynecologic cancer.* 2015; 7 (1): 8–12.
20. Joshi R, Baral G. Modified Risk of Malignancy Index (RMI 5) in ovarian tumor. *Nep J Obstet Gynecol.* 2021; 16 (32): 97–102. DOI: doi.org/10.3126/njog.v16i1.37617.
21. Егунова М. А., Куценко И. Г., Дмитриева А. И., Пикалова Л. В., Кунгурова Е. А. и др. Сравнительная эффективность современных методов дифференциальной диагностики объемных образований яичников Ж. Мать и дитя в Кузбассе. 2018; 3 (74): 16–22.
22. Ульянова А. В., Пономарёва Ю. Н., Ашрафян Л. А. Совершенствование дифференциально-диагностических методов при новообразованиях яичников. *Ж. Гинекология Эндокринология.* 2018; 6 (150): 40–43.
23. Мартынов С. А., Адамян Л. В., Липатенкова Ю. И., Калабухова Е. А., Учеваткина П. В. и др. Возможности неинвазивных методов диагностики в определении структуры опухолей и опухолевидных образований яичников во время беременности. *Ж. Гинекология.* 2015; 16 (6): 44–48.

References

1. Stilidi IA, Aksel EM. Standartizirovannye pokazateli onkoepidemiologicheskoy situatsii 2016 g. *Mezhdunarodnyj nauchno-prakticheskij zhurnal. Evrazijskij onkologicheskij zhurnal.* 2018; 6 (2): 261–325. Russian.
2. Hoover K, Jenkins TR. Evaluation and management of adnexal mass in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 97–102.
3. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, et al. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206: 349–54.
4. Sarandakou A, Protonotariou E, Rizos D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007; 44: 151.
5. Yacobozzi M, Nguyen D, et al. Adnexal Masses in Pregnancy. *Semin Ultrasound CT MRI.* 2012; 33: 55–64.
6. National Institute for Health and Clinical Excellence: Ovarian cancer: recognition and initial management. *Clinical guideline.* 2011; 1–20.
7. Diagnostika i lechenie dobrokachestvennykh novobrazovaniy yaichnikov s pozicii profilaktiki raka. *Klinicheskie rekomendatsii (protokol lecheniya).* Pis'mo Minzdrava RF. 2018. № 15-4/10/2-7838. Dostupno po ssylke: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72047432/>. Russian.
8. Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG. A risk of malignancy index incorporating CA125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990; 97 (10): 922–29.
9. Tingulstad S, Hagen B, Skjeldestad FE, Onsrud M, Kiserud T, et al. Evaluation of a risk of malignancy index based on serum CA125, ultrasound findings and menopausal status in the pre-operative diagnosis of pelvic masses. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996; 103 (8): 826–31.
10. Tingulstad S, Hagen B, Skjeldestad FE, Halvorsen T, Nustad K, et al. The risk-of-malignancy index to evaluate potential ovarian cancers in local hospitals. *Obstet Gynecol.* 1999; 93 (3): 448–52.
11. Yamamoto Y, Yamada R, Oguri H, Maeda N, Fukaya T. Comparison of four malignancy risk indices in the preoperative evaluation of patients with pelvic masses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 144 (2): 163–67.
12. Tailor A, Jurcovic D, Bourne T. Sonographic prediction of malignancy in adnexal masses using multivariate logistic regression analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997; 10: 41–47.
13. Timmerman D, Bourne T, Taylor A. A comparison of methods of the pre-operative discrimination between benign and malignant adnexal masses. The development of a new logistic regression model. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 181: 57–65.
14. Timmerman D, Verrelst H, Bourne T. Artificial neural network

- models for the preoperative discrimination between malignant and benign adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999; 13: 17–25.
15. Valentin L, Hagen B, Tingulstad S, Eik-Nes S. Comparison of pattern recognition and logistic regression models for discrimination between benign and malignant pelvic masses. A prospective cross validation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001; 18: 357–65.
 16. Campbell S. Ovarian cancer: role of ultrasound in preoperative diagnosis and population screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012; 40: 245–54.
 17. Gerasimova AA, Gus AI, Klimenko PA. avtory; Gerasimova AA, Gus AI, Klimenko PA, patentoobladateli. Sposob differencial'noj diagnostiki opuxolepodobnyx obrazovanij i opuxolej yaichnikov u beremennyx. Patent RF # 2325118; 05.06.07. Russian.
 18. Gerasimova AA, Shvyrev SL, Solomatina AA, Gus AI, Klimenko PA. Sposob vyavleniya xaraktera yaichnikovyx obrazovanij. *Onkologiya.* 2013; 1: 34–40. Russian.
 19. Yamamoto Y, Tsuchida A, Ushiwaka T, et al. Comparison of 4 risk-of-malignancy index in preoperative evaluation of patients with pelvic masses: a prospective study. *Clinical ovarian and other gynecologic cancer.* 2015; 7 (1): 8–12.
 20. Joshi R, Baral G. Modified Risk of Malignancy Index (RMI 5) in ovarian tumor. *Nep J ObstetGynecol.* 2021; 16 (32): 97–102. DOI: doi.org/10.3126/njog.v16i1.37617.
 21. Egunova MA, Kucenko IG, Dmitrieva AI, Pikalova LV, Kungurova EA, i dr. Sravnitel'naya ehffektivnost' sovremennyx metodov differencial'noj diagnostiki ob'emnyx obrazovanij yaichnikov. *Zh. Mat' i ditya v Kuzbase.* 2018; 3 (74): 16–22. Russian.
 22. Ulyanova AV, Ponomaryova YuN, Ashrafyan LA. Sovershenstvovanie differencial'no-diagnosticskix metodov pri novoobrazovaniyax yaichnikov. *Zh. Ginekologiya. Ehndokrinologiya.* 2018; 6 (150): 40–43. Russian.
 23. Martynov SA, Adamyan LV, Lipatenkova Yul, Kalabuxova EA, Uchevatkina PV, i dr. Vozmozhnosti neinvazivnyx metodov diagnostiki v opredelenii struktury opuxolej i opuxolevidnyx obrazovanij yaichnikov vo vremya beremennosti. *Zh. Ginekologiya.* 2015; 16 (6): 44–48. Russian.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛОМНОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В. Е. Франкевич^{1,2,3}✉, А. В. Новоселова¹, Н. Л. Стародубцева¹, М. Р. Патышева^{2,4}, И. В. Ларионова^{2,3,4}, М. А. Ракина², О. Д. Брагина⁴, Ю. Г. Кзышкowska^{2,3,5,6}

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

² Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, Национальный исследовательский томский государственный университет, Томск, Россия

³ Лаборатория генетических технологий, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

⁵ Институт Трансфузионной медицины и иммунологии, медицинский факультет Маннгейм, университет Гейдельберга, Германия

⁶ Германский Красный Крест Служба крови Баден-Вюртемберг-Гессен, Маннгейм, Германия

Рак молочной железы — ведущая причина смерти от рака среди женщин во всем мире. Опухлеассоциированные макрофаги (ОАМ) представляют собой основной компонент иммунных клеток в ткани при раке молочной железы. Новые подходы к лечению направлены на редактирование эпигенома ОАМ. Для изучения изменений в клетках иммунной системы при репрограммировании необходимы точные методы анализа метаболома. Целью исследования было создать на базе ВЭЖХ-МС/МС аналитический подход для определения особенностей метаболома иммунных клеток человека (ОАМ и моноцитов). Липидные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000, соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с ЭРИ источником ионов. Для количественного анализа 38 аминокислот в клетках использовали набор Jasem Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit и хроматографическую систему ВЭЖХ-МС/МС, состоящую из тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6460 (Agilent) и жидкостного хроматографа Agilent 1260 II (Agilent) с колонкой Amino acids-HPLC Column (Jasem). Модифицированный метод Фолча с двойной экстракцией позволяет одновременно выделить экстракт липидов и водорастворимых веществ, в частности аминокислот. Наиболее информативные данные о липидном составе клеток были получены методом обращенно-фазовой хроматографии по сравнению с гидрофильной хроматографией (HILIC). Для определения метаболома клеток иммунной системы (ОАМ и моноциты) минимальное число клеток оказалось равным 2 млн. Таким образом, разработан подход для определения особенностей липидного и аминокислотного состава ОАМ и моноцитов пациентов с раком молочной железы.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, метаболомика, липидомика, опухолеассоциированные макрофаги

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29 сентября 2021 г. № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

Вклад авторов: В. Е. Франкевич — планирование исследования, обсуждение результатов, редактирование рукописи; А. В. Новоселова — пробоподготовка, проведение ВЭЖХ-МС/МС; Н. Л. Стародубцева — анализ ВЭЖХ-МС/МС данных, написание и редактирование рукописи; М. Р. Патышева, И. В. Ларионова — подготовка и характеристика образцов моноцитов и макрофагов, постановка модельной системы ОАМ, обсуждение результатов; М. А. Ракина — получение кондиционных сред клеточных линий РМЖ; О. Д. Брагина — подбор и клиническая характеристика онкологических пациентов; Ю. Г. Кзышкowska — планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО СИБГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 14 января 2017 г.), федеральных законов Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларации 1964 г.

✉ Для корреспонденции: Владимир Евгеньевич Франкевич
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; vfrankevich@gmail.com

Статья получена: 22.08.2022 Статья принята к печати: 13.09.2022 Опубликовано онлайн: 13.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.049

METHODOLOGY OF DETERMINING THE METABOLOMIC PROFILE OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES AND MONOCYTES IN ONCOLOGICAL DISEASES

Frankevich VE^{1,2,3}✉, Novoselova AV¹, Starodubtseva NL¹, Patysheva MR^{2,4}, Larionova IV^{2,3,4}, Rakina MA², Bragina OD⁴, Kzyshkowska JG^{2,3,5,6}

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

² Laboratory of translational cellular and molecular biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Laboratory of Genetic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

⁵ Institute of Transfusion Medicine and Immunology, MI3, Mannheim Faculty of Medicine, University of Heidelberg, Germany

⁶ German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg-Hessen, Mannheim, Germany

Breast cancer is the leading cause of cancer-related death among women worldwide. Tumor-associated macrophages (TAMs) constitute the primary component of innate immunity in breast cancer tissue. During the development of new approaches for breast cancer treatment aimed at editing the epigenome of TAM, precise methods for the analysis of macrophage metabolome are required to examine the effect on new approaches on macrophage metabolism. Our study aimed to develop an HPLC-MS/MS-based analytical approach to characterize the metabolome of human innate immune cells (TAMs and their precursors, monocytes). Analysis of lipid extracts was conducted on a Dionex UltiMate 3000 liquid chromatograph connected to a Maxis Impact qTOF mass analyzer with an ESI ion source. Quantitative analysis of 38 amino acids in the cells was conducted using the Jasem Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit and an HPLC-MS/MS chromatographic system consisting out of an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometric detector (Agilent), and an Agilent 1260 II liquid chromatograph (Agilent) with Amino acids-HPLC Column (Jasem). The modified Folch method with double extraction was found to be the optimal approached for the sample preparation, since it enables to simultaneously isolate the lipid extract and water-soluble substances, in particular, amino acids. The method of reversed-phase chromatography yielded more useful data on the cell lipid composition than the method of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The minimum number of cells required to determine the metabolome of immune system cells (TAM and monocytes) was identified as 2×10^6 . Thus, we have developed the approach to determine the lipid and amino acid composition of modelled human TAMs and primary monocytes isolated out of breast cancer patients using minimal amount of clinical material.

Keywords: mass spectrometry, metabolomics, lipidomics, tumor-associated macrophages

Funding: the study was financially supported by the Russian Federation represented by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement dated 29 September 2021 № 075-15-2021-1073 on the topic "Genetic and epigenetic editing of tumor cells and the microenvironment in order to block metastasis").

Author contribution: Frankevich VE, Kzyshkowska JG — study planning and coordination, manuscript writing; Bragina OD — cancer patient selection and clinical characteristic preparation; Novoselova AV — sample preparation, HPLC-MS/MS; Larionova IV, Patysheva MR — monocyte and macrophage sample preparation and characterization, model TAM system set-up; Rakina MA — obtaining conditioned media of breast cancer cell lines; Starodubtseva NL — HPLC-MS/MS data analysis, manuscript writing; Frankevich VE, Larionova IV, Patysheva MR — discussion of results; Frankevich VE, Kzyshkowska JG, Starodubtseva NL — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by ethical review board of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (protocol № 7 of 14 January 2017), federal laws of the Russian Federation (№ 152, 323, and others), and the 1964 Declaration of Helsinki.

✉ Correspondence should be addressed: Vladimir E. Frankevich
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; vfrankevich@gmail.com

Received: 22.08.2022 Accepted: 13.09.2022 Published online: 13.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.049

Рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым злокачественным заболеванием и ведущей причиной смерти от рака среди женщин во всем мире [1]. При раке молочной железы микроокружение опухоли играет решающую роль в ее прогрессировании и влияет на рост новообразования, васкуляризацию, метастазирование и реакцию на терапию [2–4]. Опухольассоциированные макрофаги (ОАМ) представляют собой основной компонент иммунной системы в ткани при раке молочной железы, и их роль в его прогрессировании была продемонстрирована на животных моделях [5]. У пациентов с раком молочной железы как количество, так и выявление М2-фенотипа макрофагов являются индикатором плохого прогноза в большинстве исследований, которые не учитывают внутриопухолевую гетерогенность [2, 5, 6]. Наши предыдущие исследования показали, что в определенных внутриопухолевых компартментах макрофаги могут сохранять противоопухолевые свойства, так как была обнаружена отрицательная корреляция ОАМ в ткани молочной железы с локальными метастазами [6]. Макрофаги контролируют рост и метастазирование опухоли за счет секреции цитокинов, компонентов внеклеточного матрикса и факторов роста, а профиль секреторируемых компонентов обусловлен программированием не только на транскрипционном уровне, но и на уровне эпигенетики и метаболизма [2, 9–11].

Первичную опухоль достаточно просто удалить хирургическим путем, не подвергая ее никаким дополнительным воздействиям, поскольку они не уничтожат микрометастазы. Опухольассоциированные макрофаги метаболизируют химиотерапевтические агенты и в ответ на химиотерапию значительно усиливают секрецию ростовых и проангиогенных факторов, стимулирующих процессы роста опухоли и дальнейшего метастазирования [12]. Эпигенетическая программа макрофагов является связующим звеном между генетическим кодом и взаимодействием со стрессовыми, эндогенными патологическими факторами и инфекционными агентами. При патологическом программировании макрофагов микрометастазы, состоящие даже из единичных клеток, способны развиться в убийственную и не поддающуюся ни химиотерапии, ни иммунотерапии вторичную опухоль. Новые подходы к лечению рака молочной железы направлены на редактирование эпигенома опухольассоциированных макрофагов и основаны на передовой технологии CRISPR/dCas для адресной доставки редакторов эпигенома к промоторам целевых генов. Авторами данной статьи была разработана модельная система макрофагов человека *ex vivo*, продемонстрировано долгосрочное программирование макрофагов человека с использованием новой системы высвобождения цитокинов на основе биоматериалов [13].

Для исследования изменений в клетках иммунной системы при репрограммировании необходимы точные методы анализа метаболома, в частности липидов — основной энергетической составляющей и строительного материала мембран, а также мономерных единиц белков — аминокислот. Создание методики анализа метаболома в модельных ОАМ и в моноцитах пациентов с опухолями различной локализации позволит исследовать особенности молекулярного состава моноцитов пациентов с опухолями различной локализации и будет способствовать разработке технологии для их клинического применения. Эти данные представляют

интерес для решения как фундаментальных, так и для прикладных вопросов биологии и медицины, в частности, в исследованиях, посвященных уточнению механизмов патогенеза злокачественных новообразований. Наиболее эффективным подходом к определению молекулярного состава биологических образцов в настоящее время является комбинация жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) [14]. Ключевой проблемой существующих подходов является отсутствие консенсуса о минимальном количестве клеток для анализа, что особенно актуально для моноцитов и ОАМ пациентов с онкологическими заболеваниями. Получение моноцитов и ОАМ сложная процедура, требующая большого количества цельной крови, длительной последующей обработки и культивирования при низком пролиферативном потенциале данных иммунных клеток.

Целью работы было определить минимальное число иммунных клеток человека (ОАМ и моноцитов) методом ВЭЖХ-МС/МС, необходимое для анализа метаболомного профиля данных клеток при онкологических заболеваниях.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для определения оптимального числа клеток, позволяющего получить результаты при исследовании метаболомного спектра, использовали образцы, полученные от здоровых добровольцев. Критериями включения здоровых добровольцев были: отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе; отсутствие хронических заболеваний в фазе обострения. При исследовании группы больных были получены образцы четырех пациентов с раком молочной железы (РМЖ) T1-4N0-3M0 (IIA–IIIB стадии), люминального В-подтипа, проходивших лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в 2021 г. Критериями отбора пациенток были следующие параметры: возраст от 45 до 55 лет; отсутствие онкологического поражения другой локализации в анамнезе; отсутствие наследственной предрасположенности к РМЖ (на основании данных семейного анамнеза и результатов генетического тестирования на наличие мутаций 5382insC, 4153delA, 185delAG в гене BRCA1); состояние менструальной функции — перименопауза либо менопауза; морфологическая верификация диагноза — неспецифическая инвазивная карцинома (согласно классификации ВОЗ 2019 г.); экспрессия рецепторов к эстрогену (ER) — не менее 5 баллов; уровень Ki-67 — не менее 40%; отсутствие гематогенных метастазов. Критерии исключения: возраст моложе 45 либо старше 55 лет; наличие онкологического заболевания в анамнезе; наследственная предрасположенность; состояние менструальной функции — пременопауза; все гистологические подтипы, за исключением неспецифической инвазивной карциномы; экспрессия ER — менее 5 баллов; уровень Ki-67 — меньше 40%; наличие гематогенных метастазов. Перед лечением было проведено иммуногистохимическое исследование для определения молекулярного подтипа опухоли в соответствии с рекомендациями Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских патологов. Для стадирования РМЖ использовали TNM-классификацию AJCC (8-е издание, 2017 г.).

В качестве исследуемого материала использовали модельную систему ОАМ [13], моноциты крови здоровых добровольцев и пациентов с РМЖ, взятые до лечения.

Моноциты были изолированы из цельной крови пациентов либо из лейкоцитарной пленки доноров. Фракцию CD14⁺-клеток получали с помощью позитивной магнитной сепарации с применением протокола Miltenyi Biotec. Для получения модельных дифференцированных M2-макрофагов моноциты здоровых добровольцев культивировали при концентрации 10⁶ клеток на 1 мл макрофагальной среды X-VIVO (Lonza; Германия) с добавлением 1 нг/мл M-CSF (Peprotech; Германия) и 10⁻⁸ М дексаметазона (Sigma-Aldrich; Германия). Для индукции дифференцировки макрофагов в проопухолевые M2-макрофаги использовали 10 нг/мл IL4 (Peprotech; Германия). Для получения модельных ОАМ к полученным макрофагам добавляли кондиционированные среды, полученные от клеток линии карциномы молочной железы MCF7 в объеме 10% от общего количества среды. Макрофаги дифференцировались в течение 6 дней при 7,5% CO₂. По истечении 6 суток макрофаги снимали с культуральных планшетов с помощью резинового скребка на холоде.

Полученные моноциты и макрофаги отмывали трижды в растворе холодного 0,3%-ного ацетата аммония и 0,3%-ного формиата аммония при помощи центрифугирования в режиме 311g в течение 5 мин. После центрифугирования надосадок полностью удаляли, а осадок высушивали в жидком азоте при температуре -197 °C. Образцы хранили при -80 °C до последующего анализа.

Приготовление образцов для ВЭЖХ-МС/МС анализа

Определение метаболома (липидома и аминокислотного состава) ОАМ и моноцитов пациентов с раком молочной железы проводили посредством ВЭЖХ-МС/МС-анализа экстрактов клеток. Экстракцию липидов проводили модифицированным методом Фолча [15–17] с двойной экстракцией: к образцу клеток добавляли 480 мкл хлороформ-метанольной смеси (2 : 1, о/о) с 20 мкл IS (внутренний стандарт) при 4 °C и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин; добавляли 150 мкл воды и центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре; нижний органический слой, содержащий липиды, отбирали и повторяли процедуру экстракции (добавив 250 мкл хлороформ-метанольной смеси (2 : 1, о/о, 10 мин на вихре; центрифугирование при 13 000 g в течение 5 мин); в отдельные пробирки отбирали воднометанольный слой и органический слой соединяли с образцом, полученным на первом этапе, высушивали в потоке азота. Высушенные экстракты липидов (органический слой) перерастворяли в 100 мкл раствора изопропанола с ацетонитрилом (1 : 1, о/о), а экстракты водорастворимых соединений (водно-метанольная фаза) были использованы для анализа профиля аминокислот: их перерастворяли в 100 мкл раствора воды с ацетонитрилом (1 : 1, о/о) и с 1% муравьиной кислоты.

ВЭЖХ-МС/МС анализ

Липидные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific; Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с ЭРИ источником ионов (Bruker Daltonics; Германия). Разделение липидов по методу HILIC выполняли в соответствии с модифицированной процедурой, описанной ранее [18, 19]: 3 мкл образца инжестировали

в систему. Разделение проводили на колонке Spherisorb Si (150 × 2,1 мм, 5 мкм; Waters, США) при скорости потока 50 мкл/мин с использованием ацетонитрила в качестве растворителя А и водного раствора ацетата аммония (5 ммоль/л) в качестве растворителя В линейным градиентом от 6 до 23% (о/о) растворителя В в течение 25 мин. Температура колонки составляла 40 °C. Разделение липидов методом обращенно-фазовой хроматографии осуществляли на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм; Agilent, США) с линейным градиентом от 30 до 90% элюента В (раствор ацетонитрил/изопропанол/вода, 90/8/2 об., с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония) за 20 мин. В качестве элюента А использовали раствор ацетонитрил/вода (60/40 об.) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония. Скорость потока элюирования составила 40 мкл/мин, объем инжеструемого образца — 3 мкл. Масс-спектры получали в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне 100–1700 m/z со следующими установками: напряжение на капилляре — 4,1 кВ, давление распыляющего газа — 0,7 бар, скорость потока осушающего газа — 6 л/мин, температура осушающего газа — 200 °C. Для идентификации липидов выполняли тандемную масс-спектрометрию в режиме независимого сканирования с шириной окна 5 Да.

Для количественного анализа 38 аминокислот в клетках использовали набор Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit (Jasem; Турция) (1-метил-L-гистидин, 3-аминоизобутановая кислота, 3-метил-L-гистидин, β-аланин, DL-5-гидроксилизин, DL-гомоцистин, этаноламин, γ-аминобутановая кислота, L-2-аминоадипиновая кислота, L-2-аминобутановая кислота, L-аланин, L-ансерин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновая кислота, L-карнозин, L-цитруллин, L-цистатинин, L-цистин, L-глутаминовая кислота, L-глутамин, L-глицин, L-гистидин, L-гомоцитруллин, L-лизин, L-норвалин, L-орнитин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин, L-валин, саркозин, таурин, транс-4-гидрокси-L-пролин). К 40 мкл водного экстракта клеток добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта и 300 мкл Reagent № 1 (Jasem; Турция). Полученную смесь тщательно встряхивали в течение 2 мин, затем центрифугировали при скорости вращения 13 000 g в течение 10 мин; 200 мкл супернатанта отбирали в вialу со вставкой, 15 мкл вводили в хроматографическую систему ВЭЖХ-МС/МС, состоящую из тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6460 (Agilent; США), и жидкостного хроматографа Agilent 1260 II (Agilent; США) с колонкой Amino acids-HPLC Column (Jasem; Турция). Условия хроматографического разделения: температура — 30 °C, элюент А: 0,1 об.% муравьиной кислоты в воде; элюент В: ацетонитрил 100%, градиентный режим элюирования с 78% В до 20% В за 4,5 мин; возвращение к 78% В и изократический режим. Для анализа аминокислот использовался Amino Acids LC-MS/MS Analysis Kit (Jasem; Турция). Параметры ионного источника ESI, положительная мода, температура осушающего газа — 150 °C, напряжение на капилляре — 2 кВ. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Идентификация липидов и анализ хромато-масс-спектрометрических данных

Для предобработки хромато-масс-спектрометрических данных использовали программы msConvert из пакета

Proteowizard 3.0.9987 для преобразования файлов в формат MzXml, содержащий информацию о масс-спектре в любой момент времени, и формат ms2, содержащий информацию о тандемных масс-спектрах. Кроме того, использовали программу MzMine для выделения пиков и создания таблицы, содержащей информацию о зарегистрированных ионах: массе иона, площади его хроматографического пика и времени выхода. Для идентификации липидов использовали программу LipidMatch [20], в которой учитывали точную массу (0,01 Да) соответствующего иона, массу ионов-фрагментов из тандемных масс-спектров идентифицируемого иона, попадающих в заданное окно массы (3 Да) и заданную окрестность времени удерживания (0,5 мин). Для полуквантитативного анализа липидов использовали ранее разработанные скрипты на языке R [11–23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для разработки оптимальной методики анализа липидов иммунных клеток человека посредством ЖХ/МС-анализа экстрактов липидов было проведено сравнение нескольких методов экстракции, хроматографического разделения (обращенно-фазовая хроматография и HILIC),

а также определено минимальное необходимое количество клеток. Предварительно сравнивали эффективность трех методов экстракции. Первый метод был адаптирован из более ранней работы [19], в которой использовали модифицированный метод Фолча [2] с двойной экстракцией (см. раздел «Пациенты и методы»). Вторым методом был аналогичен подходу, описанному ранее [15] и тоже основанному на методе Фолча [16] с однократной экстракцией: к образцу клеток добавляли 200 мкл водного раствора ацетата аммония (155 ммоль/л) и 990 мкл холодного раствора хлороформ/метанол (10 : 1, о/о), ультразвуковое воздействие в течение 10 мин, добавляли 150 мкл воды, центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре; нижний органический слой, содержащий липиды, отбирали, высушивали в потоке азота и перерастворяли в 200 мкл раствора изопропанола с ацетонитрилом (1 : 1, о/о). В основу третьего метода легла экстракция Блайя–Дайера [24]: к образцу клеток добавляли 300 мкл смеси хлороформ/метанол (1/2), затем 100 мкл хлороформа и гомогенизировали 1 мин, добавляли 100 мкл воды и дополнительно гомогенизировали 1 мин; затем центрифугировали 10 мин при 1000 g при 4 °C, отбирали органическую фазу, к полярной фазе добавляли 2 мл холодного хлороформа, отбирали образовавшуюся

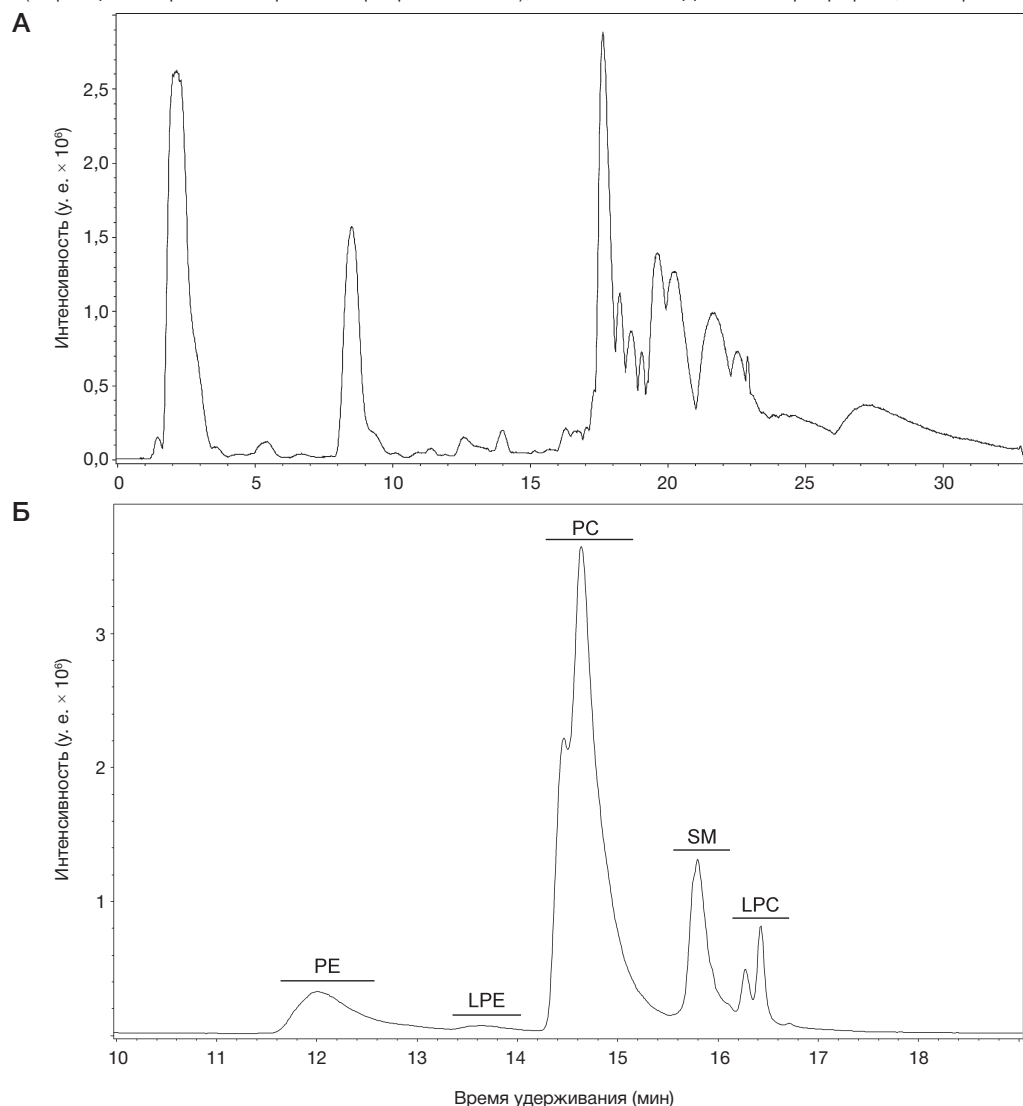


Рис. 1. Характерные хроматограммы полного ионного тока экстрактов липидов из клеток моноцитов, зарегистрированные в режиме положительных ионов. **А.** Обращенно-фазовая хроматография. **Б.** HILIC-хроматография. PC — фосфатидилхолины; PE — фосфатидилэтаноламины; SM — сфингомиелины; LPC — лизофосфатидилхолины; LPE — фосфатидилэтаноламины

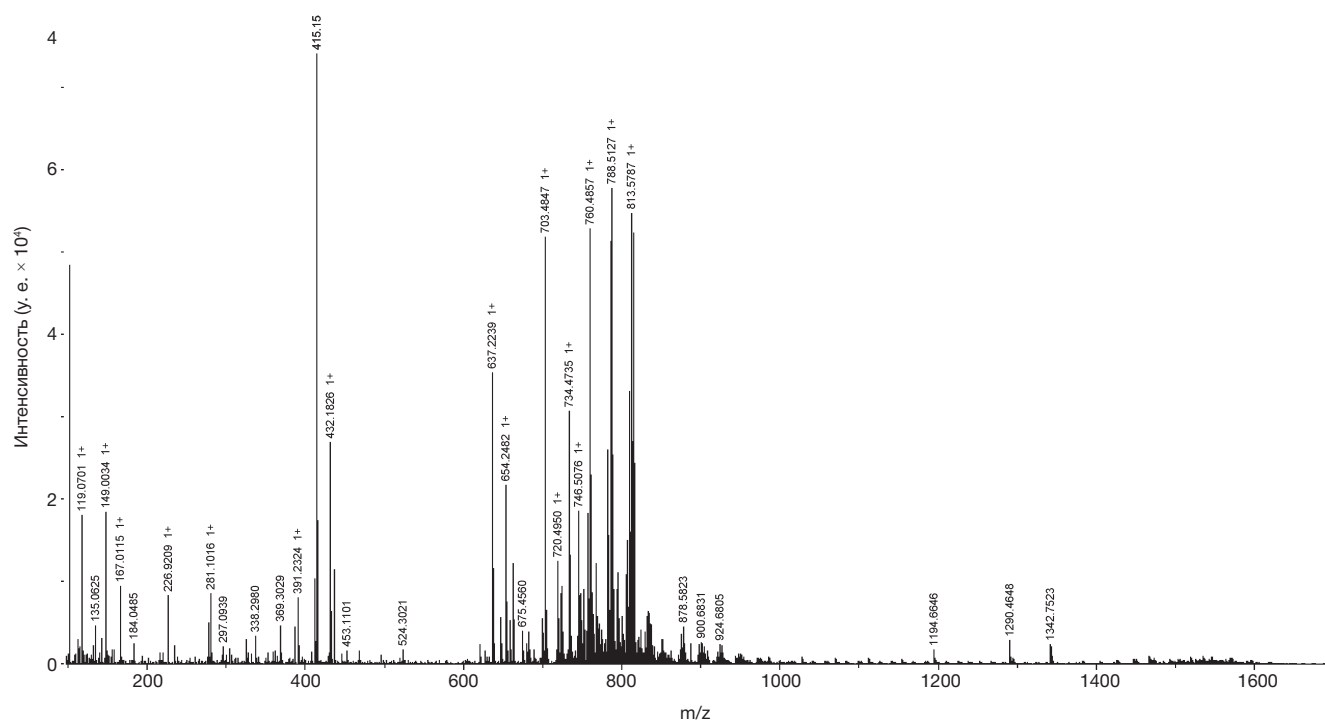


Рис. 2. Усредненный по времени масс-спектр ВЭЖХ-МС положительных ионов одного из исследованных образцов экстракта липидов макрофагов, полученный методом обращенно-фазовой хроматографии

органическую фазу и добавляли к экстракту, полученному на предыдущем шаге. Полученный состав высушивали в потоке азота и перерастворяли в 4 мл холодного раствора хлороформ/метанол (1/1) с добавлением 1,8 мл водного раствора NaCl (20 ммоль/л). Раствор дважды фильтровали через PTFE шприц-фильтр (0,2 мкм).

Второй метод с однократной экстракцией по Фолчу показал низкую эффективность для экстракции слабополярных липидов (триглицеридов, диглицеридов и церамидов). К достоинствам третьего метода относится возможность успешной экстракции кардиолипидов наравне с остальными классами липидов, однако он самый трудоемкий и содержит наибольшее число стадий, что приводит к падению воспроизводимости результатов и производительности экстракции. Наиболее универсальным и оптимальным с точки зрения трудозатрат, воспроизводимости и времени оказался первый метод, использованный далее в работе. Кроме того, анализ водно-метанольной фазы, получаемой в первом методе, позволяет получать информацию о полярных метаболитах, в частности аминокислотном составе образца.

Для определения липида были также опробованы два варианта хроматографического разделения исследуемых смесей: обращенно-фазовая хроматография

и гидрофильная хроматография (HILIC). Характерные хроматограммы и масс-спектры исследованных экстрактов липидов представлены на рис. 1 и 2. В режиме положительных ионов было идентифицировано около 200 липидов с использованием характерных тандемных масс-спектров и около 1000 липидов с идентификацией только по точной массе. В основном идентифицированные липиды относятся к классам моно-, ди- и триглицеридов, церамидов, различным формам фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов, и в том числе к продуктам окисления данных фосфолипидов. К достоинствам метода HILIC следует отнести разделение по классам липидов, однако интенсивность масс-спектрометрических пиков липидов в среднем на 30% ниже, чем при обращенно-фазовой хроматографии. Кроме того, метод HILIC плохо разделяет неполярные липиды (в частности, триглицериды), которые плохо связываются с колонкой и элюируются за время, близкое к мертвому времени колонки. В результате количество идентификаций липидов оказалось на 25% меньше в случае HILIC. Дальнейшие эксперименты были проведены с использованием обращенно-фазовой хроматографии.

В табл. 1 суммирована информация о количестве идентифицированных липидов в проанализированных

Таблица 1. Количество идентифицированных липидов в проанализированных образцах

Тип клеток	Число клеток, млн	Количество липидов, идентифицированных по точной массе и характерному тандемному масс-спектру	Количество липидов, идентифицированных по точной массе
Моноциты	1	80	638
	2	92	701
	5	111	726
	10	183	2727
ОАМ	1	137	825
	2	176	916
	5	194	900
	10	205	933

Таблица 2. Площади хроматографических пиков аминокислот, полученные в результате анализа образцов моноцитов и опухолеассоциированных макрофагов

Образец	Моноциты				OAM			
	1	2	5	10	1	2	5	10
3-Methyl-Histidine	7	2	64	187	4	45	76	169
L-Arginine	167 432	85 895	169 003	261 068	192 217	425 313	775 226	798 153
L-Cystine	496	144	158	423	85	386	184	400
L-asparagine	1199	758	1674	3884	70	1443	1265	3290
L-Glutamine	97 176	39 931	105 365	288 808	53 604	145 366	465 023	472 766
L-Histidine	18 103	8496	17 941	34 787	12 253	33 254	114 909	65 534
L-Lysine	97 176	39 931	105 365	288 808	53 604	145 366	465 023	472 766
L-Ornithine	1354	562	1988	3836	725	2043	2720	1437
L-Phenylalanine	6023	6793	8427	30 896	3393	3052	0	5769
L-Serine	2675	2503	5180	14 425	2658	3134	2617	10421
L-Threonine	2438	1531	2835	8252	1614	2111	2089	7324
L-Tyrosine	646	1038	884	3756	278	326	0	9464
Sarcosine	6044	5857	12 512	34 552	5858	8329	10 555	28 340
Taurine	92	333	462	1311	204	247	201	944

образцах. В экстрактах из 2 млн моноцитов удалось идентифицировать на 15% больше липидов, чем в экстрактах из 1 млн. В 5 млн клеток идентифицировано на 21% больше липидов, чем в 2 млн, а в 10 млн на 65% больше, чем в 5 млн. Для OAM при аналогичном сравнении получены следующие результаты: в 2 млн на 28% больше, чем в 1 млн, в 5 млн на 10% больше, чем в 2 млн, и в 10 млн на 6% больше, чем в 5 млн. Таким образом, при ограниченном количестве клеточного материала (макрофагов) необходимо анализировать не менее 2 млн клеток, поскольку именно при переходе от 1 млн клеток к 2 млн достигается наибольший прирост идентификаций. В случае с моноцитами принципиальной разницы между образцами с 1, 2 или 5 млн клеток нет.

Результаты анализа профиля аминокислот в образцах моноцитов и OAM представлены в табл. 2. Площади хроматографических пиков коррелируют с числом клеток в образцах, за исключением образцов моноцитов, содержащих 1 млн клеток. В данном случае, по всей видимости, накладывается ограничение чувствительности хромато-масс-спектрометрического анализа. Рекомендуется исследовать образцы, содержащие не менее 2 млн клеток.

ВЫВОДЫ

Разработан метод анализа метаболома клеточных культур моноцитов и OAM с помощью ВЭЖХ-МС/МС. В

качестве оптимального метода пробоподготовки выбран модифицированный метод Фолча с двойной экстракцией, позволяющий одновременно выделить экстракт липидов (органическая фаза) и экстракт водорастворимых веществ, в частности аминокислот (водно-метанольная фаза). Наиболее интенсивные пики в масс-спектрах соответствуют липидам и другим метаболитам, что делает данный подход эффективным для получения метаболомного профиля. В рамках данного исследования были проанализированы возможности ВЭЖХ-МС/МС липидных экстрактов клеток с различным хроматографическим разделением: HILIC и обращенно-фазовая хроматография. Наиболее информативные данные получены с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Проведен сравнительный анализ липидома и аминокислотного состава образцов моноцитов и макрофагов, содержащих 1, 2, 5 и 10 млн клеток. Липиды и аминокислоты обнаружены во всех исследованных образцах, но наиболее эффективная идентификация может быть выполнена для образцов, содержащих не менее 2 млн клеток. Разработанный подход для анализа метаболома клеточных культур методом ВЭЖХ-МС будет использован для определения метаболомного состава макрофагов и моноцитов, а также для поиска характерных различий в метаболомном профиле опухолеассоциированных макрофагов и моноцитов при онкологических заболеваниях.

Литература

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017; 3: 524–48.
2. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014; 5 (75).
3. Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The multifaceted role of perivascular macrophages in tumors. *Cancer Cell.* 2016; 30: 18–25.
4. Larionova I, Kazakova E, Gerashchenko T, Kzhyshkowska J. New Angiogenic Regulators Produced by TAMs: Perspective for Targeting Tumor Angiogenesis. *Cancers.* 2021; 13: 3253.
5. Riabov V, Yin S, Song B, Avdic A, Schledzewski K, Ovsy I, et al. Stabilin-1 is expressed in human breast cancer and supports tumor growth in mammary adenocarcinoma mouse model. *Oncotarget.* 2016; 7: 31097.
6. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdynseva N, Pavlov V, Choinzonov E and Kzhyshkowska J. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol.* 2020; 10: 566511.
7. Ding M, Fu X, Tan H, Wang R, Chen Z, Ding S. The effect of vascular endothelial growth factor C expression in tumor-associated macrophages on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Mol Med Rep.* 2012; 6: 1023–9.

8. Mitrofanova I, Zavvalova M, Telegina N, Buldakov M, Riabov V, Cherdyntseva N, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Immunobiology*. 2017; 222: 101–9.
9. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res*. 2016; 39: 1588–96.
10. Liu T, Larionova I, Litviakov N, Riabov V, Zavvalova M, Tsyganov M, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2018; 7 (6): e1436922.
11. Larionova I, Kazakova E, Patysheva M, Kzhyshkowska J. Transcriptional, Epigenetic and Metabolic Programming of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers*. 2020; 12 (6): 1411.
12. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (7): e1596004.
13. Riabov V, Salazar F, Htwe SS, Gudima A, Schmuttermayer C, Barthes J, et al. Generation of anti-inflammatory macrophages for implants and regenerative medicine using self-standing release systems with a phenotype-fixing cytokine cocktail formulation. *Acta biomaterialia*. 2017; 53: 389–98.
14. Nguyen A, Rudge SA, Zhang Q, Wakelam MJ. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2017; 43: 96–103.
15. Cifková E, Holčápek M, Lisa M, Vrána D, Gatěk J, Melichar B. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (3): 991–1002.
16. Folch J. Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226 (1): 497–509.
17. Husen P, Tarasov K, Katafiasz M, Sokol E, Vogt J, Baumgart J, et al. Analysis of Lipid Experiments (ALEX): A Software Framework for Analysis of High-Resolution Shotgun Lipidomics Data. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e79736.
18. Cifkova E, Holcapek M, Lisa M. Nontargeted lipidomic characterization of porcine organs using hydrophilic interaction liquid chromatography and off-line two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Lipids*. 2013; 48 (9): 915–28.
19. Li M, Yang L, Bai Y, Liu H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal Chem*. 2014; 86 (1): 161–75.
20. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18 (1): 1–11.
21. Токарева А. О., Чаровец В. В., Кононихин А. С., Стародубцева Н. Л., Франкевич В. Е., Николаев Е. Н.. Алгоритм обработки масс-спектрометрических данных для получения диагностической панели молекулярных соединений на примере поиска маркеров метастазирования при раке молочной железы. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2021; 4 (3): e00156.
22. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization methods for reducing interbatch effect without quality control samples in liquid chromatography-mass spectrometry-based studies. *Anal Bioanal Chem*. 2021; 413 (13): 3479–86.
23. Tokareva AO, Chagovets VV, Starodubtseva NL, Nazarova NM, Nekrasova ME, Kononikhin AS, et al. Feature selection for OPLS-DA discriminant analysis of cancer tissue lipidomics data. *JMS*. 2019; 55 (1): e4457.
24. Han X, Yang J, Cheng H, Yang K, Abendschein DR, Gross RW. Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*. 2005; 44 (50): 16684–94.

References

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol*. 2017; 3: 524–48.
2. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 2014; 5 (75).
3. Lewis CE, Harney AS, Pollard JW. The multifaceted role of perivascular macrophages in tumors. *Cancer Cell*. 2016; 30: 18–25.
4. Larionova I, Kazakova E, Gerashchenko T, Kzhyshkowska J. New Angiogenic Regulators Produced by TAMs: Perspective for Targeting Tumor Angiogenesis. *Cancers*. 2021; 13: 3253.
5. Riabov V, Yin S, Song B, Avdic A, Schledzewski K, Ovsiiy I, et al. Stabilin-1 is expressed in human breast cancer and supports tumor growth in mammary adenocarcinoma mouse model. *Oncotarget*. 2016; 7: 31097.
6. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, Choinzonov E and Kzhyshkowska J. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 2020; 10: 566511.
7. Ding M, Fu X, Tan H, Wang R, Chen Z, Ding S. The effect of vascular endothelial growth factor C expression in tumor-associated macrophages on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2012; 6: 1023–9.
8. Mitrofanova I, Zavvalova M, Telegina N, Buldakov M, Riabov V, Cherdyntseva N, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Immunobiology*. 2017; 222: 101–9.
9. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res*. 2016; 39: 1588–96.
10. Liu T, Larionova I, Litviakov N, Riabov V, Zavvalova M, Tsyganov M, et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2018; 7 (6): e1436922.
11. Larionova I, Kazakova E, Patysheva M, Kzhyshkowska J. Transcriptional, Epigenetic and Metabolic Programming of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers*. 2020; 12 (6): 1411.
12. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (7): e1596004.
13. Riabov V, Salazar F, Htwe SS, Gudima A, Schmuttermayer C, Barthes J, et al. Generation of anti-inflammatory macrophages for implants and regenerative medicine using self-standing release systems with a phenotype-fixing cytokine cocktail formulation. *Acta biomaterialia*. 2017; 53: 389–98.
14. Nguyen A, Rudge SA, Zhang Q, Wakelam MJ. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2017; 43: 96–103.
15. Cifková E, Holčápek M, Lisa M, Vrána D, Gatěk J, Melichar B. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (3): 991–1002.
16. Folch J. Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226 (1): 497–509.
17. Husen P, Tarasov K, Katafiasz M, Sokol E, Vogt J, Baumgart J, et al. Analysis of Lipid Experiments (ALEX): A Software Framework for Analysis of High-Resolution Shotgun Lipidomics Data. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e79736.
18. Cifkova E, Holcapek M, Lisa M. Nontargeted lipidomic

- characterization of porcine organs using hydrophilic interaction liquid chromatography and off-line two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Lipids*. 2013; 48 (9): 915–28.
19. Li M, Yang L, Bai Y, Liu H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal Chem*. 2014; 86 (1): 161–75.
 20. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, Bowden JA, Patterson RE, Cochran JA, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18 (1): 1–11.
 21. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Frankevich VE, Nikolaev EN. Algoritm obrabotki mass-spektrometricheskix dannyx dlya polucheniya diagnosticheskoy paneli molekulyarnyx soedineniy na primere poiska markerov metastazirovaniya pri rake molochnoj zhelezy. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2021; 4 (3): e00156. Russian.
 22. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization methods for reducing interbatch effect without quality control samples in liquid chromatography-mass spectrometry-based studies. *Anal Bioanal Chem*. 2021; 413 (13): 3479–86.
 23. Tokareva AO, Chagovets VV, Starodubtseva NL, Nazarova NM, Nekrasova ME, Kononikhin AS, et al. Feature selection for OPLS-DA discriminant analysis of cancer tissue lipidomics data. *JMS*. 2019; 55 (1): e4457.
 24. Han X, Yang J, Cheng H, Yang K, Abendschein DR, Gross RW. Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*. 2005; 44 (50): 16684–94.

ЧАСТАЯ АССОЦИАЦИЯ ВИТИЛИГО С ЭНДОКРИННЫМИ АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ: ПЕРВИЧНЫЕ ДАННЫЕ В РОССИЙСКОЙ КОГОРТЕ ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ

Н. Ф. Нуралиева¹✉, М. Ю. Юкина¹, Е. А. Трошина¹, О. В. Жукова^{2,3}, В. А. Петров², В. А. Волнухин²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

² Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

В литературе имеются данные о более частой, чем в популяции, ассоциации витилиго с эндокринными аутоиммунными заболеваниями (ЭАИЗ). В российской когорте полноценных исследований, направленных на оценку частоты встречаемости ЭАИЗ у взрослых пациентов с витилиго, не проводилось. Целью исследования было проанализировать частоту встречаемости ЭАИЗ в когорте российских взрослых пациентов с витилиго. В него вошли пациенты с витилиго, наблюдавшиеся в двух лечебных учреждениях: «НМИЦ эндокринологии» (центр 1; $n = 39$) и в «МНПЦДК ДЭМ» (центр 2; $n = 26$). Всем пациентам наряду с клиническим обследованием проводили скрининговое лабораторное обследование с целью выявления ЭАИЗ. У большинства пациентов (более 95% случаев) установлен несегментарный тип витилиго. Среди пациентов, наблюдавшихся в центре 1, ЭАИЗ диагностированы в 85% случаев: у 39% выявлено одно ЭАИЗ, у 46% — множественные ЭАИЗ. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы встречались в 69% случаев. У 28% пациентов выявлена аутоиммунная надпочечниковая недостаточность, у 21% — сахарный диабет 1-го типа, у 13% — гипопаратиреоз, у 10% — гипергонадотропный гипогонадизм, у 10% — эндокринная офтальмопатия. Среди пациентов, наблюдавшихся в центре 2, ЭАИЗ диагностированы у четырех больных (15% случаев): у троих — выявлен первичный гипотиреоз в исходе в аутоиммунного тиреоидита, у одного — болезнь Грейвса. Таким образом, частота встречаемости ЭАИЗ у пациентов с витилиго может варьировать от 15 до 85%. Наиболее часто (15–69%) витилиго ассоциируется с аутоиммунными тиреопатиями. Пациентам с витилиго показано ежегодное скрининговое обследование с целью выявления аутоиммунной эндокринной патологии, особенно заболеваний щитовидной железы.

Ключевые слова: витилиго, аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет 1-го типа, болезнь Грейвса, аутоиммунная надпочечниковая недостаточность, аутоиммунный полиглангулярный синдром, распространенность

Финансирование: работа поддержана Фондом научно-технологического развития Югры, Соглашение № 2022-05-01/2022.

Вклад авторов: Н. Ф. Нуралиева — эндокринологическое обследование, сбор материала, статистический анализ данных, анализ литературы, написание статьи; М. Ю. Юкина — концепция исследования, эндокринологическое обследование, редактирование статьи; Е. А. Трошина — утверждение концепции исследования, редактирование статьи; О. В. Жукова — редактирование статьи; В. А. Петров — дерматологическое обследование, сбор материала, анализ литературы; В. А. Волнухин — утверждение концепции исследования, дерматологическое обследование, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (протокол № 17 от 27 сентября 2017 г.); все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Нурана Фейзуллаевна Нуралиева
ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, г. Москва, 117292, Россия; nnurana@yandex.ru

Статья получена: 29.09.2022 **Статья принята к печати:** 13.10.2022 **Опубликована онлайн:** 29.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.055

FREQUENT ASSOCIATION OF VITILIGO WITH AUTOIMMUNE ENDOCRINE DISEASES: PRIMARY DATA OF THE RUSSIAN COHORT OF ADULT PATIENTS

Nuralieva NF¹✉, Yukina MYu¹, Troshina EA¹, Zhukova OV^{2,3}, Petrov VA², Volnukhin VA²

¹ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

² Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

There is evidence in the literature about more frequent association of vitiligo with autoimmune endocrine diseases (AEDs) compared to general population. No full-fledged studies aimed at assessing the prevalence of AEDs in the Russian cohort of adult vitiligo patients have been conducted. The study was aimed to assess the prevalence of AEDs in the cohort of Russian adult vitiligo patients. Patients with vitiligo monitored in two clinics, the Endocrinology Research Centre (Clinic 1; $n = 39$) and the Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology (Clinic 2; $n = 26$), were enrolled. Along with clinical examination, screening laboratory tests were performed in all patients in order to reveal AEDs. The majority of patients (more than 95% of cases) had nonsegmental vitiligo. Among patients monitored in Clinic 1, AEDs were diagnosed in 85% of cases: isolated AEDs accounted for 39%, while multiple AEDs were found in 46% of cases. Autoimmune thyroid diseases were diagnosed in 69% of cases. Autoimmune adrenal insufficiency was found in 28% of patients, type 1 diabetes mellitus in 21%, hypoparathyroidism in 13%, hypergonadotropic hypogonadism in 10%, endocrine ophthalmopathy in 10% of patients. Among patients monitored in Clinic 2, AEDs were diagnosed in four patients (15% of cases): three patients had primary hypothyroidism in the outcome of autoimmune thyroiditis, one patient had Graves' disease. Thus, the prevalence of AEDs in patients with vitiligo may vary between 15–85%. Vitiligo is most often associated with autoimmune thyroid diseases (15–69%). Vitiligo patients should undergo annual screening aimed at detection of autoimmune endocrine disorders, especially thyroid diseases.

Keywords: vitiligo, autoimmune thyroiditis, type 1 diabetes mellitus, Graves' disease, autoimmune adrenal insufficiency, autoimmune polyglandular syndrome, prevalence

Funding: this work was supported by Foundation for Scientific and Technological Development of Yurga (agreement No 2022-05-01/2022).

Author contribution: Nuralieva NF — endocrinology examination, data acquisition, statistical analysis, literature analysis, manuscript writing, preparation of the article for publication; Yukina MYu — study concept development, endocrinology examination, manuscript editing; Troshina EA — approval of the study concept and the final text of the manuscript; Zhukova OV — approval of the final text of the manuscript; Petrov VA — dermatology examination, data acquisition, literature analysis; Volnukhin VA — approval of the study concept, dermatology examination, manuscript editing and approval of the final text.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Endocrinology Research Centre (protocol № 17 of 27 September 2017); the informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nurana F. Nuralieva
Dmitriya Ulyanova, 11, Moscow, 117292, Russia; nnurana@yandex.ru

Received: 29.09.2022 **Accepted:** 13.10.2022 **Published online:** 29.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.055

Витилиго — распространенное полигенное аутоиммунное заболевание, для которого характерно появление на различных участках тела очагов депигментации кожи, образующихся в результате гибели или снижения функциональной активности меланоцитов. Различают сегментарное и несегментарное витилиго. Сегментарное витилиго отличается односторонним характером поражения в пределах одного или нескольких сегментов тела. При несегментарном витилиго возникает несколько или множество очагов депигментации, нередко симметрично расположенных [1]. В зарубежной литературе имеются данные о более частом, по сравнению с общей популяцией, развитии у пациентов с витилиго эндокринных аутоиммунных заболеваний (эАИЗ) [1–3]. Наиболее часто (в 0,3–40% случаев) у пациентов с витилиго встречаются аутоиммунные тиреопатии [4–12]: аутоиммунный тиреоидит (АИТ) — в 0,3–31% случаев [9, 13, 14], болезнь Грейвса (БГ) — в 0,3–17,1% случаев [9, 14–16]; носительство антител (АТ) к ткани щитовидной железы (ЩЖ) выявляется в 41,8% случаев [11]. Сахарный диабет 1-го типа (СД1) у пациентов с витилиго встречается в 0,1–25% случаев [4, 5, 8–11, 17], аутоиммунная надпочечниковая недостаточность (АНН) в 0,2–3,2% случаев [4, 5], а АТ к ткани надпочечников обнаружены в 2,5% случаев [18, 19].

Витилиго может не только сочетаться с изолированными эАИЗ, но и быть компонентом аутоиммунного полигландулярного синдрома (АПС) — первичного аутоиммунного поражения двух и более периферических эндокринных желез, приводящего, как правило, к их функциональной недостаточности. Различают АПС 1-го типа (АПС-1) и 2-го типа (АПС-2). Основные компоненты АПС-1 — кандидоз с поражением кожи и слизистых оболочек, гипопаратиреоз и АНН. При АПС-2 развиваются такие основные эАИЗ, как АНН, СД1, аутоиммунные тиреопатии (БГ или АИТ), — в сочетании с другими аутоиммунными заболеваниями [2]. Витилиго нередко является первым компонентом АПС (в 12,6% случаев [2]). У больных витилиго АПС может встречаться в 27,4% случаев [1].

В то же время установлена высокая частота развития витилиго у пациентов с аутоиммунными эндокринопатиями: у 2,6–2,8% пациентов с АИТ [20, 21], у 1,4–2,6% пациентов с БГ [20, 22], у 23,3% пациентов с СД1 [23], у 37% пациентов с АПС-1 [24] и у 20% пациентов с АПС-2 [2].

Результаты опубликованных исследований свидетельствуют о том, что аутоиммунные эндокринопатии развиваются преимущественно у пациентов с несегментарным типом витилиго [1, 6, 7]. Прочие факторы, определяющие риск развития эАИЗ у пациентов с витилиго, в настоящее время не идентифицированы. Согласно некоторым данным [1, 7, 8], пол и раса больных, а также длительность и активность витилиго не определяют частоту манифестации эАИЗ. В то же время в других исследованиях выявлена более частая ассоциация витилиго и эАИЗ у женщин [1, 4, 8, 9], а также при большей площади поражения кожных покровов [4, 8]. Кроме того, сообщалось о более частой встречаемости аутоиммунных тиреопатий при длительном течении витилиго и преимущественном поражении кожи туловища [8]. Эти данные не нашли своего подтверждения в работах, в которых сообщалось о более частом развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (АЗЩЖ) у пациентов с преимущественной локализацией витилиго на коже конечностей и в области суставов [4], а также о преимущественном развитии АПС при акрофациальном витилиго [1]. Результаты некоторых исследований

свидетельствуют о том, что риск манифестации АЗЩЖ увеличивается при позднем дебюте витилиго [10, 25]. Вместе с тем, ассоциация витилиго и БГ наиболее часто встречалась у молодых больных [14].

Полноценных исследований, направленных на оценку частоты встречаемости эАИЗ у взрослых пациентов с витилиго, а также распространенности витилиго при эАИЗ, в российской когорте не проводилось. В единичных работах, посвященных данной проблеме, оценивали частоту развития витилиго у пациентов с СД [26] или носительство антител-маркеров АЗЩЖ и аутоиммунного поражения островкового аппарата поджелудочной железы (ПЖ) у пациентов с витилиго [27].

Целью настоящего исследования было провести анализ частоты встречаемости эАИЗ в когорте российских пациентов с витилиго.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты, включенные в исследование

В первую часть исследования включены пациенты с витилиго, наблюдавшиеся в период с 2019 по 2021 г. в Национальном медицинском исследовательском центре эндокринологии («НМИЦ эндокринологии»). Во вторую часть исследования включены пациенты с витилиго, наблюдавшиеся в период с 2019 по 2021 г. в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии («МНПЦДК ДЗМ»).

Набор пациентов в группы проводили на основании соответствия критериям включения и при отсутствии критериев исключения.

Критерии включения: возраст 18 лет и старше; наличие витилиго; наличие добровольного информированного согласия пациента.

Критерии исключения: беременность, период лактации; острые инфекции; обострение хронических заболеваний; тяжелые, угрожающие жизни состояния; врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния; прием препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (глюкокортикоиды не по жизненным показаниям, интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики), и/или проведение вакцинации/ревакцинации в течение месяца перед включением в исследование.

Дизайн исследования: одномоментное наблюдательное описательное исследование, включавшее 39 участников в первой части исследования и 26 участников во второй части исследования. В работе был использован сплошной способ формирования выборок.

Клиническое обследование

Всех участников осматривали врачи-исследователи с целью уточнения соответствия критериям включения или возможного попадания под критерии исключения. Первичное обследование включало сбор жалоб, всех видов анамнеза, измерение антропометрических параметров, АД и частоты пульса. В рамках сбора анамнеза и осмотра уточняли наследственный анамнез, наличие острых и хронических заболеваний, прием лекарственных препаратов и биодобавок, вредные привычки, у женщин — гинекологический анамнез.

Врач-дерматовенеролог осуществлял детальный визуальный осмотр пациентов с оценкой состояния кожи

Таблица 1. Характеристика участников исследования

Группа	Пациенты				
	n	Возраст (лет)	Пол (Ж/М)		
			n	%	соотношение
Пациенты, исходно наблюдавшиеся в центре 1	39	19–73	26/13	67/33	2,0 : 1
Пациенты, исходно наблюдавшиеся в центре 2	26	19–71	17/9	65/35	1,9 : 1

Примечание: М — мужской пол, Ж — женский пол.

и придатков кожи, а также фотодокументирование очагов поражения при помощи цифровой камеры при видимом свете и в лучах лампы Вуда.

Лабораторные методы обследования

Всем пациентам проводили лабораторное обследование для скрининга основных эАИЗ. Биохимические, иммунологические и гормональные исследования осуществляли в клинико-диагностической лаборатории НМИЦ эндокринологии. Забор крови производили в вакуумные пробирки с инертным гелем и этилендиаминтетрауксусной кислотой из кубитальной вены утром в период с 08:00 до 10:00 в состоянии натощак (голодание в течение 8–14 ч до забора). Полученные пробы центрифугировали не позднее чем через 15 мин после забора и затем они поступали в работу. Общеклинический, биохимический, гормональный и иммунологический (АТ-ТПО, АТ-ТГ) анализы проводили в день забора образцов крови. Образцы сыворотки для последующего определения уровней АТ к 21-гидроксилазе и маркеров аутоиммунного поражения островкового аппарата ПЖ подлежали временной заморозке в микропробирках при температуре -80°C .

Статистический анализ результатов исследования

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием программного обеспечения STATISTICA 13 (StatSoft; США). С целью

сравнения качественных признаков применяли χ^2 -критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика участников исследования представлена в табл. 1.

Распространенность эндокринной аутоиммунной патологии в когорте взрослых пациентов с витилиго, исходно наблюдавшихся в НМИЦ эндокринологии

В обследованной когорте манифестные эАИЗ диагностированы в 85% случаев ($n = 33$). В 38,5% случаев ($n = 15$) диагностировано одно эАИЗ, в 46,1% случаев ($n = 18$) — множественная аутоиммунная эндокринная патология. У остальных 6 пациентов (15,4%) без манифестных эАИЗ выявлено носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения ЩЖ без нарушения функции органа-мишени и/или носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения островкового аппарата ПЖ без нарушений углеводного обмена.

АЗЩЖ встречались в 69% случаев ($n = 27$), из них у 19 (70%) пациентов диагностирован первичный гипотиреоз в исходе АИТ, у 8 (30%) пациентов — БГ. АНН выявлена в 28% случаев ($n = 11$), СД1/LADA (латентный аутоиммунный диабет взрослых) — в 21% случаев ($n = 8$), гипопаратиреоз — в 13% случаев ($n = 5$), гипергонадотропный гипогонадизм (ГГ) — в 10% случаев ($n = 4$), эндокринная офтальмопатия (ЭОП) — в 10% случаев ($n = 4$).

Таблица 2. Частота встречаемости эАИЗ и носительства АТ-маркеров аутоиммунного поражения ЩЖ и островкового аппарата ПЖ у пациентов с витилиго женского и мужского пола, исходно наблюдавшихся в НМИЦ эндокринологии

эАИЗ	Ж $n = 26$	М $n = 13$	p
эАИЗ, n (%)	23 (88)	10 (77)	0,347
АЗЩЖ, n (%)	19 (73)	8 (62)	0,462
Первичный гипотиреоз в исходе АИТ, n (%)	14 (54)	5 (39)	0,365
БГ, n (%)	5 (19)	3 (23)	0,779
АНН, n (%)	11 (42)	0	0,006
СД1/LADA, n (%)	3 (12)	5 (39)	0,0497
Гипопаратиреоз, n (%)	4 (15)	1 (8)	0,498
ГГ, n (%)	4 (15)	0	0,136
ЭОП, n (%)	2 (8)	2 (15)	0,455
АПС-1, n (%)	4 (15)	0	0,136
АПС-2, n (%)	8 (31)	3 (23)	0,615
БГ + ЭОП, n (%)	2 (8)	1 (8)	1
Носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения ЩЖ без нарушения функции органа-мишени, n (%)	5 (19)	1 (8)	0,347
Носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения островкового аппарата ПЖ без нарушения функции органа-мишени, n (%)	5 (19)	4 (31)	0,42

Примечание: М — мужской пол, Ж — женский пол.

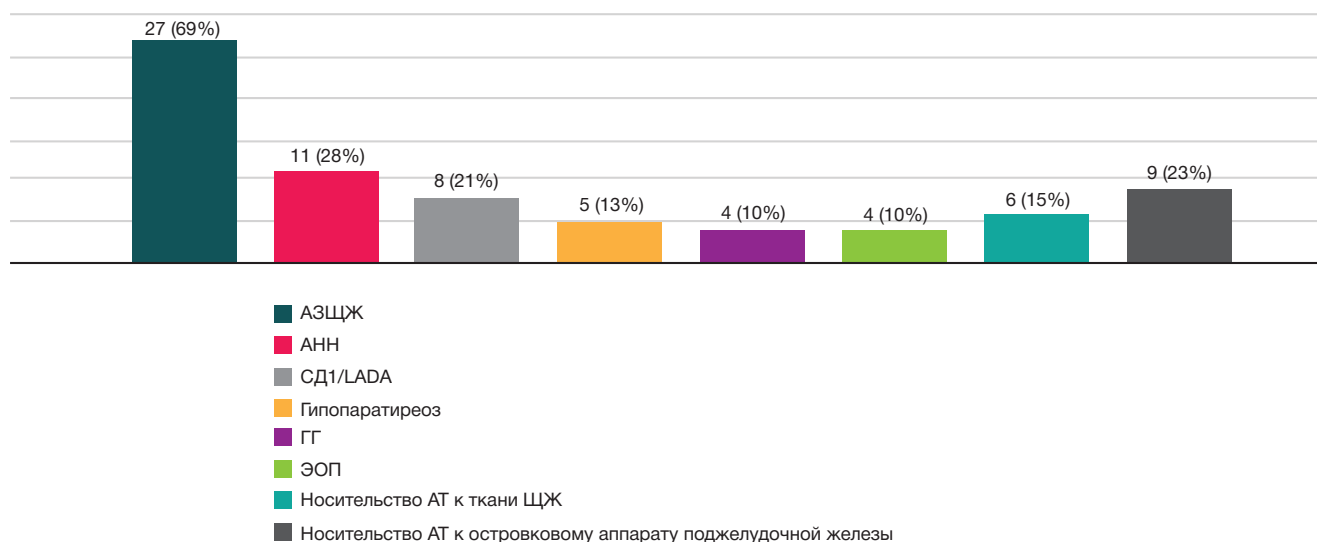


Рис. Распространенность эндокринной аутоиммунной патологии в когорте взрослых пациентов с витилиго, исходно наблюдавшихся в НМИЦ эндокринологии

Множественная аутоиммунная эндокринная патология в 61% случаев ($n = 11$) была представлена АПС-2, в 22% случаев ($n = 4$) — АПС-1; в 17% случаев ($n = 3$) имело место сочетание БГ с ЭОП. Витилиго предшествовало манифестации эАИЗ у 30% пациентов ($n = 10$), развилось одновременно с эАИЗ в 12% случаев ($n = 4$).

Носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения ЩЖ без нарушения функции органа-мишени установлено в 15% случаев ($n = 6$), носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения островкового аппарата ПЖ без нарушений углеводного обмена — в 23% случаев ($n = 9$) (см. рисунок), носительство АТ к 21-гидроксилазе без нарушения функции коры надпочечников не обнаружено.

В 100% случаев у пациентов диагностирован несегментарный тип витилиго. При этом у одного пациента с АПС-2 (АНН, первичный гипотиреоз в исходе АИТ, аутоиммунный гастрит) диагностирован универсальный тип витилиго.

Сравнение частоты встречаемости эАИЗ у пациентов женского и мужского пола представлено в табл. 2.

Распространенность эндокринной аутоиммунной патологии в когорте взрослых пациентов с витилиго, исходно наблюдавшихся в МНПЦДК ДЗМ

эАИЗ диагностированы у четырех (15%) больных. Все выявленные эАИЗ относились к АЗЩЖ, из них у троих выявлен первичный гипотиреоз в исходе в АИТ, у одного — болезнь Грейвса.

Носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения ЩЖ без нарушения ее функции установлено в 15% случаев ($n = 4$).

У 25 пациентов (96%) диагностирован несегментарный тип витилиго. У одного пациента без манифестных эАИЗ или носительства АТ диагностирован сегментарный тип витилиго.

Сравнение частоты встречаемости эАИЗ у пациентов женского и мужского пола представлено в табл. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные о частоте встречаемости эАИЗ у пациентов с витилиго соответствуют результатам других исследований [4, 10, 28]. В то же время есть сообщение всего об одном пациенте с эАИЗ (БГ) из 204 больных витилиго [16]. Наиболее вероятно, столь низкая распространенность эАИЗ в данной работе обусловлена методами исследования, основанными на анализе историй болезни, тогда как мы проводили активный лабораторный скрининг эАИЗ.

Согласно результатам как первой, так и второй части исследования, витилиго наиболее часто ассоциируется с АЗЩЖ, что сопоставимо с данными других исследователей [4, 5, 10, 11]. Вместе с тем, в работе, включавшей 50 пациентов с витилиго [12], манифестное АЗЩЖ не выявлено ни в одном случае, однако ее авторы сообщили о высокой частоте носительства АТ к ТПО (в 50% случаев; в нашем исследовании частота носительства АТ к ТПО и ТГ без нарушения функции ЩЖ была гораздо ниже — 15%).

В отличие от других авторов [1, 4, 8–10, 26], мы не выявили статистически значимого преобладания женщин среди больных с эАИЗ, ассоциированными с витилиго, в том числе множественными, за исключением АНН. В то

Таблица 3. Частота встречаемости эАИЗ и носительства АТ у пациентов с витилиго женского и мужского пола, исходно наблюдавшихся в МНПЦДК ДЗМ

эАИЗ	Ж $n = 17$	М $n = 9$	p
эАИЗ, n (%)	4 (24)	0	0,114
АЗЩЖ, n (%)	4 (24)	0	0,114
Первичный гипотиреоз в исходе АИТ, n (%)	3 (18)	0	0,18
БГ, n (%)	1 (6)	0	0,458
Носительство АТ-маркеров аутоиммунного поражения ЩЖ без нарушения функции органа-мишени, n (%)	1 (6)	3 (33)	0,065

Примечание: М — мужской пол, Ж — женский пол.

же время в обследованной когорте мужчин нами выявлено более частое сочетание витилиго с СД1 по сравнению с женщинами. Однако при интерпретации этих данных необходимо учитывать такие же гендерные различия в общей популяции (более высокую частоту СД1 у мужчин [29] и АНН у женщин [30]).

Кроме того, результаты нашей работы подтверждают некоторые данные [5] о том, что витилиго зачастую предшествует манифестации эАИЗ. Полученные результаты обосновывают необходимость регулярного скрининга эАИЗ у больных с витилиго.

У всех пациентов, наблюдавшихся в НМИЦ эндокринологии, и у 96% пациентов, наблюдавшихся в МНПЦДК ДЗМ, диагностирован несегментарный тип витилиго. Однако необходимо отметить, что несегментарный тип витилиго был установлен как у больных с манифестными эАИЗ или носительством АТ к органам-мишеням, так и у больных без манифестных эАИЗ или носительства АТ к органам-мишеням. Поскольку результаты нашего исследования не позволяют сделать однозначных выводов о риске развития эАИЗ при разных типах витилиго (в связи с небольшим числом пациентов

с сегментарным витилиго), необходимо дальнейшее накопление данных.

ВЫВОДЫ

Частота встречаемости эАИЗ у пациентов с витилиго, по нашим данным, может варьировать от 15 до 85%. Наиболее часто витилиго ассоциируется с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. В 30% случаев развитие витилиго предшествует манифестации эАИЗ. Среди пациентов с витилиго и манифестной эндокринной патологией у женщин чаще встречается АНН, у мужчин — СД1. Пациентам с витилиго показано ежегодное скрининговое обследование с целью выявления аутоиммунной эндокринной патологии, особенно заболеваний щитовидной железы. Необходимо информирование врачей (в первую очередь, дерматологов и эндокринологов, а также терапевтов) о возможности ассоциации витилиго с эндокринной аутоиммунной патологией. Пациентам должна быть разъяснена необходимость проведения ежегодного скрининга и обращения к эндокринологу при развитии клинических проявлений эАИЗ.

Литература

1. Amerio P, Di Rollo D, Carbone A, Auriemma M, Marra ME, De Remigis P, et al. Polyglandular autoimmune diseases in a dermatological clinical setting: vitiligo-associated autoimmune diseases. *Eur J Dermatol.* 2010; 20 (3): 354–8. DOI: 10.1684/ejd.2009.0939.
2. Hansen MP, Matheis N, Kahaly GJ. Type 1 diabetes and polyglandular autoimmune syndrome: A review. *World J Diabetes.* 2015; 6 (1): 67–79. DOI: 10.4239/wjd.v6.i1.67.
3. Perheentupa J. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (8): 2843–50. DOI: 10.1210/jc.2005-2611.
4. Van Geel N, Speckaert M, Brochez L, Lambert J, Speckaert R. Clinical profile of generalized vitiligo patients with associated autoimmune/autoinflammatory diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28 (6): 741–6. DOI: 10.1111/jdv.12169.
5. Korkij W, Solatani K, Simjee S, Marcincin PG, Chuang TY. Tissue-specific autoantibodies and autoimmune disorders in vitiligo and alopecia areata: a retrospective study. *J Cutan Pathol.* 1984; 11 (6): 522–30. DOI: 10.1111/j.1600-0560.1984.tb00413.x.
6. Yuan J, Sun C, Jiang S, Lu Y, Zhang Y, Gao X-H, et al. The prevalence of thyroid disorders in patients with vitiligo: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 9: 803. DOI: 10.3389/fendo.2018.00803.
7. Fan KC, Yang TH, Huang YC. Vitiligo and thyroid disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Dermatol.* 2018; 28 (6): 750–63. DOI: 10.1684/ejd.2018.3449.
8. Gey A, Diallo A, Seneschal J, Léauté-Labrèze C, Boralevi F, Jouary T, et al. Autoimmune thyroid disease in vitiligo: multivariate analysis indicates intricate pathomechanisms. *Br J Dermatol.* 2013; 168 (4): 756–61. DOI: 10.1111/bjd.12166.
9. Chen Y, Chen Y, Hwang C, Lin MW, Chen TJ, Chen CC, et al. Comorbidity profiles in association with vitiligo: a nationwide population-based study in Taiwan. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015; 29 (7): 1362–9. DOI: 10.1111/jdv.12870.
10. Lazzeri L, Colucci R, Cammi A, Dragoni F, Moretti S. Adult onset vitiligo: multivariate analysis suggests the need for a thyroid screening. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 1–5. DOI: 10.1155/2016/8065765.
11. Ingordo V, Cazzaniga S, Raone B, Digiuseppe MD, Musumeci ML, Fai D, et al. Circulating Autoantibodies and autoimmune comorbidities in vitiligo patients: a multicenter Italian study. *Dermatology.* 2014; 228 (3): 240–9. DOI: 10.1159/000357807.
12. Kumar K, Priya S, Sharma R, Kapoor U, Saini M, Bisht YS. Autoimmune thyroid disease in patients with vitiligo: prevalence study in India. *Endocr Pract.* 2012; 18 (2): 194–9. DOI: 10.4158/EP11205.OR.
13. Akay BN, Bozkir M, Anadolu Y, Gullu S. Epidemiology of vitiligo, associated autoimmune diseases and audiological abnormalities: Ankara study of 80 patients in Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010; 24 (10): 1144–50. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03605.x.
14. Bae J, Lee J, Yun J, Han B, Han TY. Vitiligo and overt thyroid diseases: A nationwide population-based study in Korea. *J Am Acad Dermatol.* 2017; 76 (5): 871–8. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.12.034.
15. Hegedus L, Heidenheim M, Gervil M, Hjalgrim H, Høier-Madsen M. High frequency of thyroid dysfunction in patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol.* 1994; 74 (2): 120–3. DOI: 10.2340/0001555574120123.
16. Poojary S. Vitiligo and associated autoimmune disorders: A retrospective hospital-based study in Mumbai, India. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2011; 39 (6): 356–61. DOI: 10.1016/j.aller.2010.12.007.
17. Sivasubramanian A, Ganapathi S. The study on association of co-morbidities in female patients with vitiligo. *Int J Res Dermatol.* 2019; 5 (1): 203. DOI: 10.18203/issn.2455-4529.
18. Liu CW, Huang YC. Vitiligo and autoantibodies: a systematic review and meta-analysis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2018; 16 (7): 845–51. DOI: 10.1111/ddg.13574.
19. Laberge G, Mailloux C, Gowan K, Holland P, Bennett DC, Fain PR, et al. Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment Cell Res.* 2005; 18 (4): 300–5. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2005.00242.x.
20. Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, Holder RL, Carr-Smith JD, Heward JM, et al. Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med.* 2010; 123 (2): 183.e1–9. DOI: 10.1016/j.amjmed.2009.06.030.
21. Ruggeri R, Trimarchi F, Giuffrida G, Certo R, Cama E, Campenni A, et al. Autoimmune comorbidities in Hashimoto's thyroiditis: different patterns of association in adulthood and childhood/adolescence. *Eur J Endocrinol.* 2017; 176 (2): 133–41. DOI: 10.1530/EJE-16-0737.
22. Ferrari S, Fallahi P, Ruffilli I, Elia G, Ragusa F, Benvenega S, et al. The association of other autoimmune diseases in patients with Graves' disease (with or without ophthalmopathy): Review of the

- literature and report of a large series. *Autoimmun Rev.* 2019; 18 (3): 287–92. DOI: 10.1016/j.autrev.2018.10.001.
23. Nederstigt C, Uitbeijerse B, Janssen L, Corssmit EPM, de Koning EJP, Dekkers OM. Associated autoimmune disease in type 1 diabetes patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2019; 180 (2): 135–44. DOI: 10.1530/EJE-18-0515.
 24. Ferre E, Rose S, Rosenzweig S, Burbelo PD, Romito KR, Niemela JE, et al. Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *JCI Insight.* 2016; 1 (13): e88782. DOI: 10.1172/jci.insight.88782.
 25. Nicolaidou E, Antoniou C, Miniati A, Lagogianni E, Matekovits A, Stratigos A, et al. Childhood- and later-onset vitiligo have diverse epidemiologic and clinical characteristics. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 66 (6): 954–8. DOI: 10.1016/j.jaad.2011.07.010.
 26. Туриев Г. С. Аутоиммунные заболевания у больных сахарным диабетом взрослых. Владикавказский медико-биологич. вестн. 2013; 17 (26): 74–80.
 27. Ломоносов К. М., Симонова Н. И., Ломоносов М. К. Сравнительный анализ сыровоточного содержания аутоантител у больных витилиго. Рос. журн. кожных и венерических болезней. 2013; 2: 35.
 28. Agarwala S, Malkud S. A study on the clinico-epidemiological profile of vitiligo patients and its association with endocrine, audiological and ocular abnormalities. *Iran J Dermatol.* 2020; 23: 155–162. DOI: 10.22034/ijd.2020.120835.
 29. Carstensen B, Rønn PF, Jørgensen ME. Prevalence, incidence and mortality of type 1 and type 2 diabetes in Denmark 1996–2016. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020; 8 (1): e001071. DOI: 10.1136/bmjdr-2019-001071.
 30. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: Autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev.* 2002; 23 (3): 327–364. DOI: 10.1210/er.23.3.327.
 1. Amerio P, Di Rollo D, Carbone A, Auriemma M, Marra ME, De Remigis P, et al. Polyglandular autoimmune diseases in a dermatological clinical setting: vitiligo-associated autoimmune diseases. *Eur J Dermatol.* 2010; 20 (3): 354–8. DOI: 10.1684/ejd.2009.0939.
 2. Hansen MP, Matheis N, Kahaly GJ. Type 1 diabetes and polyglandular autoimmune syndrome: A review. *World J Diabetes.* 2015; 6 (1): 67–79. DOI: 10.4239/wjd.v6.i1.67.
 3. Perheentupa J. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (8): 2843–50. DOI: 10.1210/jc.2005-2611.
 4. Van Geel N, Speeckaert M, Brochez L, Lambert J, Speeckaert R. Clinical profile of generalized vitiligo patients with associated autoimmune/autoinflammatory diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28 (6): 741–6. DOI: 10.1111/jdv.12169.
 5. Korkij W, Solatani K, Simjee S, Marcincin PG, Chuang TY. Tissue-specific autoantibodies and autoimmune disorders in vitiligo and alopecia areata: a retrospective study. *J Cutan Pathol.* 1984; 11 (6): 522–30. DOI: 10.1111/j.1600-0560.1984.tb00413.x.
 6. Yuan J, Sun C, Jiang S, Lu Y, Zhang Y, Gao X-H, et al. The prevalence of thyroid disorders in patients with vitiligo: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 9: 803. DOI: 10.3389/fendo.2018.00803.
 7. Fan KC, Yang TH, Huang YC. Vitiligo and thyroid disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Dermatol.* 2018; 28 (6): 750–63. DOI: 10.1684/ejd.2018.3449.
 8. Gey A, Diallo A, Seneschal J, Léauté-Labrèze C, Boralevi F, Jouary T, et al. Autoimmune thyroid disease in vitiligo: multivariate analysis indicates intricate pathomechanisms. *Br J Dermatol.* 2013; 168 (4): 756–61. DOI: 10.1111/bjd.12166.
 9. Chen Y, Chen Y, Hwang C, Lin MW, Chen TJ, Chen CC, et al. Comorbidity profiles in association with vitiligo: a nationwide population-based study in Taiwan. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015; 29 (7): 1362–9. DOI: 10.1111/jdv.12870.
 10. Lazzeri L, Colucci R, Cammi A, Dragoni F, Moretti S. Adult onset vitiligo: multivariate analysis suggests the need for a thyroid screening. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 1–5. DOI: 10.1155/2016/8065765.
 11. Ingordo V, Cazzaniga S, Raone B, Digioseppe MD, Musumeci ML, Fai D, et al. Circulating Aautoantibodies and autoimmune comorbidities in vitiligo patients: a multicenter Italian study. *Dermatology.* 2014; 228 (3): 240–9. DOI: 10.1159/000357807.
 12. Kumar K, Priya S, Sharma R, Kapoor U, Saini M, Bisht YS. Autoimmune thyroid disease in patients with vitiligo: prevalence study in India. *Endocr Pract.* 2012; 18 (2): 194–9. DOI: 10.4158/EP11205.OR.
 13. Akay BN, Bozkir M, Anadolu Y, Gullu S. Epidemiology of vitiligo, associated autoimmune diseases and audiological abnormalities: Ankara study of 80 patients in Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010; 24 (10): 1144–50. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03605.x.
 14. Bae J, Lee J, Yun J, Han B, Han TY. Vitiligo and overt thyroid diseases: A nationwide population-based study in Korea. *J Am Acad Dermatol.* 2017; 76 (5): 871–8. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.12.034.
 15. Hegedus L, Heidenheim M, Gervil M, Hjalgrim H, Høier-Madsen M. High frequency of thyroid dysfunction in patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol.* 1994; 74 (2): 120–3. DOI: 10.2340/0001555574120123.
 16. Poojary S. Vitiligo and associated autoimmune disorders: A retrospective hospital-based study in Mumbai, India. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2011; 39 (6): 356–61. DOI: 10.1016/j.aller.2010.12.007.
 17. Sivasubramanian A, Ganapathi S. The study on association of co-morbidities in female patients with vitiligo. *Int J Res Dermatol.* 2019; 5 (1): 203. DOI: 10.18203/issn.2455-4529.
 18. Liu CW, Huang YC. Vitiligo and autoantibodies: a systematic review and meta-analysis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2018; 16 (7): 845–51. DOI: 10.1111/ddg.13574.
 19. Laberge G, Mailloux C, Gowan K, Holland P, Bennett DC, Fain PR, et al. Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment Cell Res.* 2005; 18 (4): 300–5. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2005.00242.x.
 20. Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, Holder RL, Carr-Smith JD, Heward JM, et al. Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med.* 2010; 123 (2): 183.e1–9. DOI: 10.1016/j.amjmed.2009.06.030.
 21. Ruggeri R, Trimarchi F, Giuffrida G, Certo R, Cama E, Campenni A, et al. Autoimmune comorbidities in Hashimoto's thyroiditis: different patterns of association in adulthood and childhood/adolescence. *Eur J Endocrinol.* 2017; 176 (2): 133–41. DOI: 10.1530/EJE-16-0737.
 22. Ferrari S, Fallahi P, Ruffilli I, Elia G, Ragusa F, Benvenega S, et al. The association of other autoimmune diseases in patients with Graves' disease (with or without ophthalmopathy): Review of the literature and report of a large series. *Autoimmun Rev.* 2019; 18 (3): 287–92. DOI: 10.1016/j.autrev.2018.10.001.
 23. Nederstigt C, Uitbeijerse B, Janssen L, Corssmit EPM, de Koning EJP, Dekkers OM. Associated autoimmune disease in type 1 diabetes patients: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2019; 180 (2): 135–44. DOI: 10.1530/EJE-18-0515.
 24. Ferre E, Rose S, Rosenzweig S, Burbelo PD, Romito KR, Niemela JE, et al. Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *JCI Insight.* 2016; 1 (13): e88782. DOI: 10.1172/jci.insight.88782.
 25. Nicolaidou E, Antoniou C, Miniati A, Lagogianni E, Matekovits A, Stratigos A, et al. Childhood- and later-onset vitiligo have diverse epidemiologic and clinical characteristics. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 66 (6): 954–8. DOI: 10.1016/j.jaad.2011.07.010.
 26. Туриев Г. С. Аутоиммунные заболевания у больных сахарным диабетом взрослых. Владикавказский медико-биологич. вестн. 2013; 17 (26): 74–80. Russian.
 27. Lomonosov KM, Simonova NI, Lomonosov MK. Sravnitel'nyy

- analiz syvorotochnogo sodержaniya autoantitel u bol'nyx vitiligo. Ros. zhurn. kozhnyx i venericheskix boleznej. 2013; 2: 35. Russian.
28. Agarwala S, Malkud S. A study on the clinico-epidemiological profile of vitiligo patients and its association with endocrine, audiological and ocular abnormalities. Iran J Dermatol. 2020; 23: 155–162. DOI: 10.22034/ijd.2020.120835.
 29. Carstensen B, Rønn PF, Jørgensen ME. Prevalence, incidence and mortality of type 1 and type 2 diabetes in Denmark 1996–2016. BMJ Open Diabetes Res Care. 2020; 8 (1): e001071. DOI: 10.1136/bmjdr-2019-001071.
 30. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: Autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. Endocr Rev. 2002; 23 (3): 327–364. DOI: 10.1210/er.23.3.327.

ТРОМБОЗ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ИНСУЛЬТА

Е. В. Орлова ✉, А. Б. Бердалин, В. Г. Лелюк

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

Тромбоз вен нижних конечностей, развивающийся после перенесенного инсульта, может быть причиной эмболических осложнений и летального исхода. Целью исследования было изучить влияние провоцирующих факторов, частоту и локализацию острого тромбоза и посттромботических изменений вен нижних конечностей в восстановительном периоде инсульта. У 1315 пациентов в раннем и позднем восстановительном периоде инсульта проведено дуплексное сканирование вен нижних конечностей, их которых 885 (67,3%) мужчин и 430 (32,7%) женщин в возрасте 18–94 года, средний возраст $59,23 \pm 13,7$ года. Показано, что выявление признаков тромбоза и/или его последствий не взаимосвязано с патогенетическим вариантом ишемического инсульта. Достоверно чаще ($p < 0,05$) острый тромбоз глубоких вен отмечен в раннем восстановительном периоде инсульта. Частота острых тромбозов вен нижних конечностей составила 7,8%, посттромботических изменений — 5,6%. Наиболее часто (49,6%) среди поражений глубоких вен наблюдали изолированное поражение вен голени. Обнаружена достоверная взаимосвязь между стороной пареза (плегии) нижней конечности и стороной тромбоза глубоких вен ($p < 0,001$). Взаимосвязи между тромбозом поверхностных и глубоких вен нижних конечностей и приемом антикоагулянтов и дезагрегантов выявлено не было ($p > 0,05$). Избыточная масса тела была ассоциирована с поражением проксимальных отделов вен нижних конечностей ($p < 0,05$). У женщин тромбоз вен нижних конечностей наблюдали достоверно чаще ($p < 0,05$). Результаты повторного дуплексного сканирования вен нижних конечностей при поступлении в реабилитационный стационар позволили снизить риск венозных тромбоэмболических осложнений у пациентов в восстановительном периоде инсульта.

Ключевые слова: инсульт, реабилитация, венозные тромбоэмболические осложнения, тромбоз вен нижних конечностей, восстановительный период, инсульт, иммобилизация

Финансирование: исследование выполнено в рамках Государственного задания №388-00083-22-00 от 30.12.2021, регистрационный номер НИР 122022100113-7 от 21 февраля 2022 г.

Вклад авторов: Е. В. Орлова — обзор литературы, работа с базой данных, написание статьи; А. Б. Бердалин — работа с базой данных, статистическая обработка данных, написание статьи; В. Г. Лелюк — планирование и руководство исследованием, поиск финансовых источников для проекта, редактирование и согласование финального варианта рукописи.

Соблюдение этических стандартов: проведение исследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России (протокол заседания № 01/19-09-22 от 19 сентября 2022 г.); все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Владимировна Орлова
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, 117513, г. Москва, Россия; ekaterina.shlyk@gmail.com

Статья получена: 29.09.2022 **Статья принята к печати:** 14.10.2022 **Опубликована онлайн:** 27.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.053

LOWER EXTREMITY VEIN THROMBOSIS AND ITS CONSEQUENCES IN STROKE RECOVERY PERIOD

Orlova EV ✉, Berdalin AB, Lelyuk VG

Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Post-stroke lower extremity vein thrombosis can be the reason behind complications of embolic nature and death. This study aimed to investigate the influence of provoking factors, frequency and localization of acute thrombosis, post-thrombotic changes in the lower extremity veins during stroke recovery period. The study involved 1315 patients, 885 (67.3%) male and 430 (32.7%) female, ages 18–94 years, mean age 59.23 ± 13.7 years. All participants underwent lower extremity venous duplex scanning in the early and late stages of stroke recovery period. We found no evidence of interconnections between presence of signs of thrombosis and/or its consequences and the pathogenetic variant of stroke the patient had. Acute deep vein thrombosis was diagnosed significantly more often ($p < 0.05$) in the early stage of stroke recovery period. The frequency of acute lower extremity vein thrombosis was 7.8%, post-thrombotic changes — 5.6%. Isolated lesion of the lower leg veins was the most common complication associated with deep veins (49.6%). We have discovered a significant relationship between the side of lower extremity paresis (plegia) of and the side of deep vein thrombosis ($p < 0.001$). No relationship was found between lower extremity superficial and deep vein thrombosis and use of anticoagulants and antiplatelet agents ($p > 0.05$). Excess body weight was associated with damage to the lower extremity proximal veins ($p < 0.05$). Women had lower extremity vein thrombosis significantly more often ($p < 0.05$). Repeated lower extremity venous duplex scanning upon admission to the rehabilitation hospital allowed reducing the risk of venous thromboembolic complications that may develop during the stroke recovery period.

Keywords: stroke, rehabilitation, venous thromboembolic complications, vein thrombosis of lower extremities, stroke recovery period, immobilization.

Funding: the study was conducted under the State Order #388-00083-22-00 of December 30, 2021, NIR (research effort) registration number 122022100113-7 of February 21, 2022.

Author contribution: Orlova EV — literature review, work with the database, article authoring; Berdalin AB — work with the database, statistical data processing, article authoring; Lelyuk VG — research planning and management, search for project funding, editing and approval of the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia (Minutes of the Meeting #01/19-09-22 of September 19, 2022); All participants of the study signed a voluntary informed consent form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina V. Orlova
Ostrovityanova, 1, str. 10, 117513, Moscow, Russia; ekaterina.shlyk@gmail.com

Received: 29.09.2022 **Accepted:** 14.10.2022 **Published online:** 27.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.053

Венозные тромбозомболические осложнения (ВТЭО), развивающиеся в остром периоде инсульта, ухудшают его течение и могут стать причиной летального исхода. Риск ВТЭО у пациентов с инсультом признан одним из самых высоких среди лиц с соматической патологией [1–4].

В восстановительном периоде инсульта ВТЭО не менее значимы, но изучены в меньшей степени, несмотря на то что проведение активных реабилитационных мероприятий в случаях с недиагностированными тромбозами, прежде всего, глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей, может быть небезопасным [5].

Одной из важных причин замедления тока крови в венах у перенесших инсульт служит иммобилизация, приводящая к нарушению функции мышечно-венозной помпы голени. Ограничение подвижности в таких случаях обусловлены тяжестью состояния и (или) постинсультными параличами и парезами, обуславливающими ТГВ нижних конечностей [2, 6, 7]. Установлено также, что риск ВТЭО повышается в первые три месяца после развития инсульта, а основным предрасполагающим фактором признается иммобилизация [8, 9]. Необходимо также учитывать, что в период пандемии SARS-CoV-2, который частично совпал с периодом включения пациентов в исследование, наблюдается общее увеличение частоты тромбозов, в том числе в венах нижних конечностей [10, 11], но если заболевание было перенесено без проведения ПЦР-тестирования, факт заражения не может быть установлен. К настоящему времени имеются ограниченные сведения, касающиеся эпидемиологии, особенностей локализации и факторов, влияющих на развитие тромбозов в восстановительном периоде инсульта [12, 13].

Несмотря на то что клинические данные подтверждают связь между фактом перенесенного инсульта и ВТЭО, силу и зависимость ее от времени еще предстоит уточнить [8, 14].

В целом, дальнейшее изучение взаимосвязи анамнестических, конституциональных и клинко-диагностических показателей с тромбозом вен нижних конечностей (и ВТЭО), а также его распространенности и особенностей локализации у перенесших инсульт лиц продолжает оставаться актуальной задачей.

Целью настоящего исследования было изучить влияние провоцирующих факторов, частоту и локализацию острого тромбоза и посттромботических изменений вен нижних конечностей в восстановительном периоде инсульта.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены сведения о 1315 пациентах в раннем и позднем восстановительном периоде инсульта, которые проходили стационарное обследование и лечение в отделениях медицинской реабилитации ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России, из них 885 (67,3%) мужчин и 430 (32,7%) женщин в возрасте 18–94 года, средний

возраст $59,23 \pm 13,7$ года. Критерии включения в исследование: перенесенный инсульт давностью до года; выраженность неврологического дефицита — 3 балла по шкале Рэнкин; предоставление результатов дуплексного сканирования, выполненного в сторонних медицинских учреждениях, и заключения, подтверждающего отсутствие нарушения проходимости вен нижних конечностей для исключения рисков ВТЭО при проведении активных реабилитационных мероприятий. Включение пациентов в исследование проводили в период с 2019 по 2021 г. Критерии исключения: отсутствие подтвержденного выписным эпикризом диагноза «инсульт»; наличие признаков острого тромбоза вен нижних конечностей, выявленных до госпитализации в отделения реабилитации; выраженность неврологического дефицита более 3 баллов по шкале Рэнкин.

В первые дни госпитализации в отделения медицинской реабилитации всем пациентам проводили дуплексное сканирование вен нижних конечностей на сканерах Epiq 5 и Epiq 7 (Philips; США) широкополосным мультимодальным линейным датчиком с частотой 3–12 МГц. Ввиду иммобилизации части пациентов, связанной с перенесенным инсультом, все исследования проводили в горизонтальном положении. Для выявления тромбоза или посттромботических изменений в просветах вен осуществляли компрессионные тесты с шагом 1–2 см во всех доступных сегментах поверхностных и глубоких вен обеих нижних конечностей. При выявлении признаков тромбоза и (или) посттромботических изменений вен нижних конечностей учитывали сторону поражения, в поверхностных венах — локализацию поражения (большая/малая подкожные вены и их притоки), в глубоких венах — локализацию поражения по следующим сегментам: наружная подвздошная вена (НПВ) и/или общая бедренная вена (ОБВ), подколенная (ПКОВ) и/или бедренная вена (БВ), глубокие вены голени. При выявлении признаков острого тромбоза также анализировали наличие флотации и при наличии — длину флотирующей верхушки тромба.

Всем включенным в исследование лицам проводили трансторакальную эхокардиографию (ЭхоКГ) на сканере Epiq 7 (Philips; США) широкополосным мультимодальным секторным датчиком с частотой 1–5 МГц.

Помимо обозначенных выше в программу исследования были также включены комплекс нейровизуализирующих методов, ультразвуковых исследований сосудов мозга, функциональных диагностических обследований, результаты которых в настоящей работе не описаны.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программных пакетов SPSS Statistics версии 26.0 (IBM; США) и R software версии 4.0.2. (R Core Team; Австрия). Нулевую гипотезу отвергали при уровне значимости $p \leq 0,05$. Для описания качественных и количественных переменных

Таблица 1. Частота типов ОНМК и патогенетических вариантов ишемического инсульта (по классификации TOAST [15]) у включенных в исследование лиц

Тип инсульта		Частота, человек	Доля, %
Геморрагический инсульт		8	0,6
Ишемический инсульт (ИИ)	атеротромботический	465	35,4
	кардиоэмболический	171	13
	лакунарный	33	2,5
	криптогенный	623	47,4
	другой установленной этиологии	15	1,1
Всего		1315	100

Таблица 2. Частота острого тромбоза и посттромботических изменений глубоких и поверхностных вен нижних конечностей

Характер изменения вен нижних конечностей		Частота, человек	Доля, %
Острый тромбоз поверхностных вен	Нет	1293	98,3
	Есть	22	1,7
Острый тромбоз глубоких вен	Нет	1234	93,8
	Есть	81	6,2
Посттромботические изменения глубоких вен	Нет	1279	97,3
	Есть	36	2,7
Посттромботические изменения поверхностных вен	Нет	1278	97,2
	Есть	37	2,8
Общее число пациентов		Всего	1315
			100

использовали частоту и долю (в процентах). Для сравнения частот качественных зависимых переменных между категориями независимых (группирующих) переменных применяли критерий χ^2 Пирсона или точный критерий Фишера. Для количественных зависимых переменных сравнение осуществляли при помощи критерия Манна–Уитни. Совместный анализ влияния пола и индекса массы тела (ИМТ) на признаки острого тромбоза глубоких и поверхностных вен проводили при помощи смешанной линейной модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все пациенты, включенные в исследование, перенесли инсульт, в 193 (13,8%) случаях — повторный. В зависимости от времени, прошедшего от момента развития острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), распределение анализируемых случаев было следующим: в раннем восстановительном периоде инсульта (до 6 месяцев) — 882 человека (67%), в позднем восстановительном периоде (до 2 лет) — 433 человека (33%). Характеристика типов инсульта представлена в табл. 1.

По результатам дуплексного сканирования вен нижних конечностей у 176 (13,4%) пациентов были выявлены эхографические признаки тромбозов глубоких и поверхностных вен нижних конечностей и их последствий (табл. 2).

Достоверной взаимосвязи патогенетического варианта ИИ и частоты диагностированного поражения вен нижних конечностей выявлено не было ($p > 0,05$).

Частота выявления острого тромбоза глубоких и поверхностных вен нижних конечностей постепенно убывала по мере увеличения срока от момента развития инсульта (рис. 1 и 2).

При проведении теста Манна–Уитни различия в группах с наличием и отсутствием острого тромбоза глубоких вен нижних конечностей в зависимости от сроков от начала инсульта оказались достоверными ($p < 0,05$) (рис. 3), для острого тромбоза поверхностных вен достоверных различий выявлено не было.

Для анализа локализации поражений глубоких и поверхностных вен нижних конечностей, а также взаимосвязи локализации поражения с различными факторами, острые и посттромботические изменения рассматривали в совокупности.

Всего было выявлено 117 (8,9%) случаев поражения глубоких вен нижних конечностей (острых тромбозов и посттромботических изменений).

Наиболее часто (49,6%) среди поражений глубоких вен нижних конечностей встречалось изолированное

поражение глубоких вен голени (задних большеберцовых, малоберцовых, суральных вен) (табл. 3). Поражения передних большеберцовых вен в нашей выборке отсутствовали.

С флотацией верхушки тромба было выявлено 7 (6,8%) из 103 случаев острого тромбоза, длина флотирующей головки — 7–45 мм, среднее значение — 29 мм.

С помощью критерия χ^2 была выявлена достоверная взаимосвязь между стороной пареза (плегии) нижней конечности и стороной возникновения тромбоза глубоких вен ($p < 0,001$), для поверхностных вен такая взаимосвязь не выявлена ($p > 0,05$).

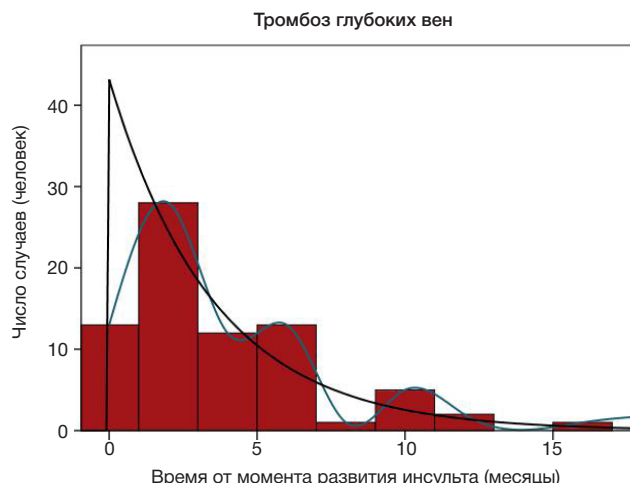


Рис. 1. Время от момента развития ОНМК до регистрации признаков острого тромбоза глубоких вен нижних конечностей

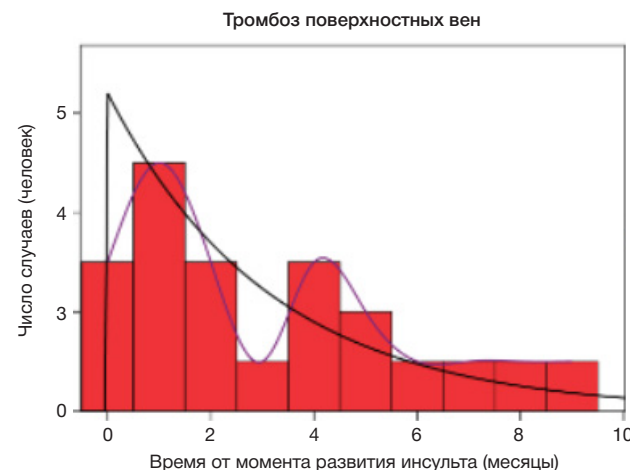


Рис. 2. Время от момента развития ОНМК до регистрации признаков острого тромбоза поверхностных вен нижних конечностей

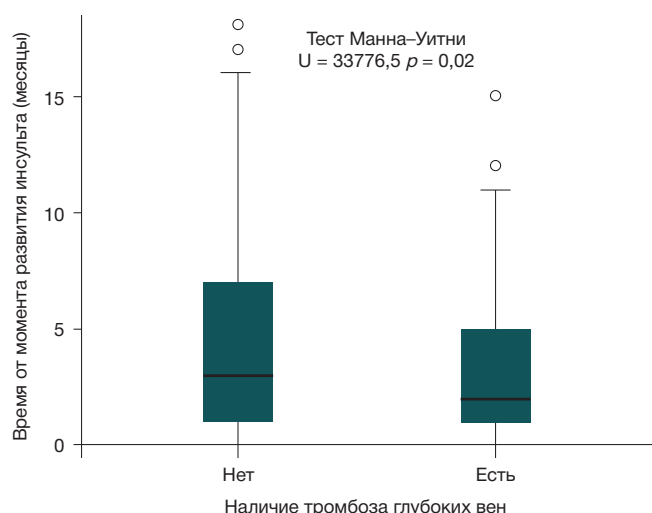


Рис. 3. Наличие признаков тромбоза глубоких вен нижних конечностей в зависимости от времени, прошедшего от момента развития инсульта

При разделении пациентов на группы с дистальным и проксимальным поражением глубоких вен с помощью точного Т-критерия были выявлены достоверные различия по массе тела. Достоверно чаще ($p < 0,05$) поражение проксимальных сегментов вен отмечено у лиц с большей массой тела (рис. 4).

Всего было выявлено 59 (4,5%) случаев поражения магистральных поверхностных вен (острого тромбоза и посттромботических изменений). Распределение частоты поражения отдельных магистральных поверхностных вен представлено в табл. 4.

При использовании корреляционного анализа не было выявлено достоверной взаимосвязи тромбоза поверхностных и глубоких вен нижних конечностей и приема антикоагулянтов ($r_s = 0,045$ при $p = 0,103$; $r_s = 0,154$ при $p = 0,113$) и дезагрегантов ($r_s = -0,036$ при $p = 0,195$; $r_s = -0,058$ при $p = 0,067$).

При сравнении групп без эхографических признаков поражения вен нижних конечностей и с признаками острых тромбозов или посттромботических изменений в поверхностных и глубоких венах в зависимости от пола, с использованием критерия χ^2 было выявлено достоверно более частое ($p < 0,05$) поражение вен нижних конечностей у женщин (рис. 5 и 6).

Среднее значение ИМТ при регистрации признаков тромбоза глубоких вен составило 25,68 у мужчин и 28,44 у женщин, при выявлении тромбоза поверхностных вен — 27,01 и 29,08 соответственно, при этом различия между ИМТ мужчин и женщин были недостоверными ($p > 0,05$). При проведении двухфакторного анализа, учитывающего пол и ИМТ в зависимости от наличия

признаков острого тромбоза глубоких и поверхностных вен, достоверных различий также выявлено не было ($p > 0,05$), однако на уровне тенденции ($p = 0,095$) установлено, что с увеличением ИМТ у женщин частота тромбоза как глубоких, так и поверхностных вен нижних конечностей увеличивается, а у мужчин прослеживается обратная зависимость.

По данным ЭхоКГ (и КТ) в исследуемой когорте был выявлен случай ТГВ с признаками субклинической ТЭЛА без летального исхода.

После выявления признаков острого тромбоза вен нижних конечностей пациентам была назначена или скорректирована антикоагулянтная терапия, ограничены активные реабилитационные мероприятия, связанные с движениями нижних конечностей, отменена (в случае ее проведения до получения результатов исследования) перемежающаяся пневматическая компрессия, которая могла способствовать миграции тромба.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование содержит сведения об искусственной выборке лиц, госпитализированных в специализированные реабилитационные отделения для осуществления восстановительного лечения. Подавляющее число пациентов при отборе на реабилитацию должны были отвечать ряду требований (см. критерии включения в исследование). Таким образом, исследуемая когорта, несмотря на свою многочисленность, не отражает всю постинсультную популяцию и популяционно ограниченно репрезентативна.

Наличие острого тромбоза глубоких и поверхностных вен нижних конечностей при этом являлось одним из противопоказаний к госпитализации. Тем не менее, по результатам проведенного после госпитализации в условиях отдела ультразвуковой и функциональной диагностики ФГБУ ФЦМН ФМБА России дуплексного сканирования вен нижних конечностей, число случаев с зарегистрированными признаками острых тромбозов оказалось значительным, что обосновывает необходимость ультразвукового исследования (УЗИ) вен нижних конечностей в восстановительном периоде инсульта, особенно при госпитализации с целью проведения активных реабилитационных процедур, что может вызвать возражения в связи с их экономической «неэффективностью».

При анализе экономической эффективности рутинного УЗИ вен нижних конечностей для диагностики тромбоза [5] при поступлении на стационарную реабилитацию ВТЭО были диагностированы у 6,6% больных, при этом бессимптомные пациенты с диагностированным

Таблица 3. Локализация поражения глубоких вен нижних конечностей

Локализация	Частота, человек	Доля, %
ОБВ/НПВ/НПВ	1	0,8
Сочетание поражения ОБВ/ПВ/НПВ с подколенной и бедренной веной	2	1,7
Подколенная и бедренная вена	17	14,5
Сочетание поражения подколенной и бедренной вены с венами голени	16	13,7
Изолированное поражение вен голени (задние большеберцовые, малоберцовые и суральные вены)	58	49,6
Сочетание поражения ОБВ/ПВ/НПВ с подколенной и бедренной венами, а также венами голени	9	7,7
Локализация поражения не уточнена	14	12
Всего	117	100

Примечание: ОБВ — общая бедренная вена; ПВ — подвздошные вены; НПВ — нижняя подвздошная вена; НПВ — нижняя полая вена.

ТГВ при скрининговом УЗИ имели более короткую продолжительность стационарной реабилитации ($p = 0,045$), более низкую частоту ТЭЛА ($p < 0,001$) и неотложной госпитализации ($p = 0,002$), чем лица, у которых тромбоз был диагностирован после развития клинических симптомов. Авторами был сделан вывод, что проведение рутинного УЗИ вен нижних конечностей при поступлении в реабилитационное стационарное отделение способствует улучшению результатов лечения без дополнительных затрат на госпитализацию и, таким образом, обоснованно.

Опубликованные сведения, касающиеся частоты ТГВ у лиц с острым инсультом, а также в раннем и позднем восстановительном периодах инсульта, вариабельны. Так, клинические признаки ТГВ имели место в среднем у 12–15% больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения [2, 16]. Имеются сведения о том, что ТГВ возникал у менее 10% пациентов с острым инсультом и не оказывал значительного влияния на исход через три месяца [7]. В другом исследовании ТГВ был частым осложнением острого инсульта, а геморрагический инсульт был связан с более высокой частотой поражения глубоких вен (ТГВ выявлен в 21,1% случаев среди лиц с ишемическим инсультом и в 28,5% случаев — с геморрагическим) [12]. Частота ТГВ нижних конечностей у пациентов с внутримозговым кровоизлиянием, хотя и достоверно, была выше, чем при ишемическом инсульте [6].

При анализе результатов настоящего исследования частота поражения глубоких вен (как острых, так и хронических) составила 8,9%, поверхностных вен — 4,5% (в совокупности — 13,4%), для острых тромбозов вен нижних конечностей частота составила 7,8% (103 случая), что в целом ниже опубликованных ранее данных [2, 7, 12, 16], однако совместимо с данными по исследованию частоты ТГВ у больных с острым инсультом [7], согласно которым у 8,7% пациентов с ишемическим инсультом наблюдали ТГВ. Выявление острых тромбозов вен нижних конечностей при проведении повторного дуплексного сканирования может быть связано с длительной транспортировкой и с вынужденной иммобилизацией больных на догоспитальном этапе; не исключается также влияние на распространенность венозных тромбозов в системе нижней полой вены в период пандемии SARS-CoV-2, в том числе внезапность характера их возникновения [10, 11]. Кроме того, нельзя отрицать вероятность диагностических ошибок при первичном исследовании в сторонних медицинских учреждениях. Во всех случаях выявленного в нашем исследовании острого тромбоза могли возрастать риски возникновения ВТЭО, однако после изменения тактики реабилитационных мероприятий и корректировки схем лечения из 103 случаев острого тромбоза признаки

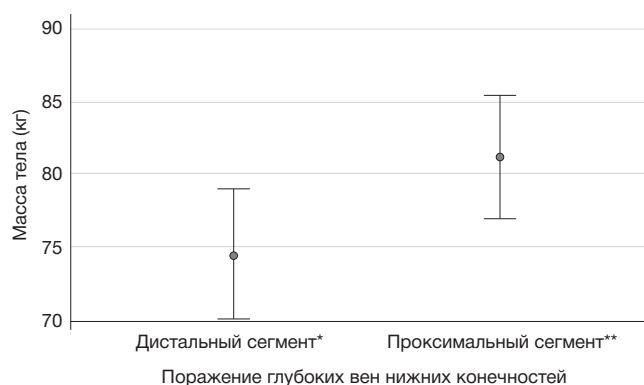


Рис. 4. Масса тела пациентов в зависимости от поражения проксимального и дистального сегментов глубоких вен нижних конечностей. Дистальный сегмент* — поражение глубоких вен голени, проксимальный сегмент** — поражение подколенной, бедренных и (или) подвздошных вен с поражением (без поражения) вен голени

субклинической ТЭЛА по данным ЭхоКГ (и КТ) имели место лишь в одном случае, летальных исходов не было.

Известно, что пациенты с более длительным пребыванием в стационаре и более тяжелым инсультом, имеют больший риск возникновения ТГВ [9, 17]. Это особенно актуально в связи с особенностями нашей выборки — степень выраженности неврологического дефицита по шкале Рэнкин составляла 3 балла, что тоже могло оказывать влияние на частоту возникновения тромбоза вен нижних конечностей.

По данным литературы, бессимптомный ТГВ был обнаружен у 11,5% пациентов с инсультом и 85,9% тромбов были выявлены в дистальных сегментах вен нижних конечностей [9, 12, 13]. У подавляющего большинства пациентов (81%) тромбоз локализовался изолированно в венах голени [6]. Полученные в нашем исследовании данные тоже свидетельствуют об относительно более высокой частоте изолированного поражения глубоких вен голени (49,6%) (дополнительно в сочетании с поражениями других сегментов — 7,7%) по сравнению с ТГВ другой локализации (0,8–14,5%).

У больных с ишемическим инсультом ТГВ чаще развивается и преобладает в парализованной ноге, однако при длительной иммобилизации возникает риск двустороннего поражения [2, 4]. По некоторым данным, восходящий тромбоз и наличие флотации представлены в основном в паретичных конечностях [6]. По результатам нашего исследования, также выявлена достоверная взаимосвязь между стороной пареза нижней конечности и стороной тромбоза глубоких вен.

Достоверной взаимосвязи патогенетического варианта инсульта и частоты поражения вен нижних конечностей

Таблица 4. Частота острых тромбозов и посттромботических изменений магистральных поверхностных вен нижних конечностей различной локализации

Локализация	Частота, человек	Доля, %
Большая подкожная вена (одностороннее поражение)	19	32,2
Малая подкожная вена (одностороннее поражение)	18	30,5
Большая подкожная вена (двустороннее поражение)	3	5
Малая подкожная вена (двустороннее поражение)	8	13,6
Большая и малая подкожная вена	2	3,4
Большая подкожная вена (двустороннее поражение) и малая подкожная вена	1	1,7
Поражение поверхностных вен (неуточненной локализации) в сочетании с глубокими венами	8	13,6
Всего	59	100

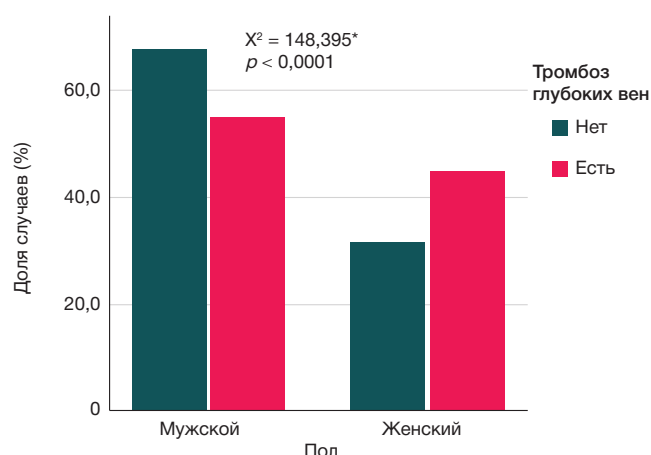


Рис. 5. Частота острого тромбоза глубоких вен нижних конечностей в зависимости от пола

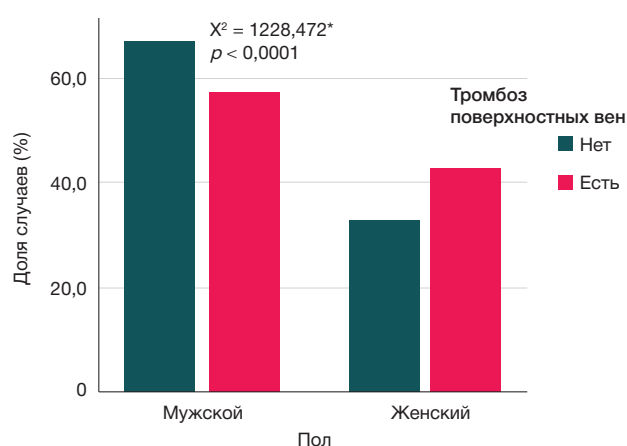


Рис. 6. Частота острого тромбоза поверхностных вен нижних конечностей в зависимости от пола

выявлено не было, что согласуется с полученными ранее данными [6].

По мере увеличения времени от момента развития инсульта частота тромбоза глубоких и поверхностных вен в исследуемой когорте снижалась, что, вероятно, связано с особенностями распределения случаев в выборке с преобладанием лиц в раннем восстановительном периоде инсульта. На выявленную особенность могла также повлиять большая обездвиженность пациентов в первые недели и месяцы после ОНМК до начала проведения активных реабилитационных мероприятий.

По данным ряда исследований последних лет было установлено, что длительный профилактический прием прямых оральных антикоагулянтов (ПОАК) не приводил к развитию рецидивов ВТЭО и декомпенсированных форм венозной недостаточности по сравнению с комбинированным низкомолекулярным гепарином и пероральным антагонистом витамина К [18–20]. Однако описаны единичные случаи неэффективности лечения ПОАК, в основном из-за индивидуальных различий концентрации препарата в плазме крови [21]. Результаты настоящего исследования показывают отсутствие взаимосвязи развития тромбоза вен нижних конечностей и приема антикоагулянтов и дезагрегантов. Вероятнее всего, это связано с тем, что большинство включенных в исследование после перенесенного ОНМК в рамках вторичной профилактики инсульта уже принимали дезагреганты, а также в рамках стандартной терапии ишемического инсульта им проводили антикоагулянтную

терапию низкомолекулярными гепаринами, т. е. пациенты находились в относительно равных условиях, либо начинали лечение антикоагулянтами, в том числе ПОАК, уже после возникновения признаков тромбоза вен нижних конечностей.

Доказанными факторами риска венозного тромбоза при инсульте являются иммобилизация, пожилой возраст, ожирение, сахарный диабет, ТГВ в анамнезе, наследственные коагулопатии [9, 22, 23]. В рамках настоящего исследования было выявлено, что у пациентов с большей массой тела достоверно чаще вовлекались проксимальные сегменты вен. Вероятно, в механизм тромбообразования в таких случаях дополнительно включаются факторы, связанные с повышением внутрибрюшного давления, обусловленного гипертрофией висцерального жира. Эти факторы могут приводить к компрессии илеофemorального сегмента с развитием гипертензии в бедренных венах и нарушению оттока венозной крови от нижней конечности [22, 23].

Имеются противоречивые сведения о частоте тромбоза вен нижних конечностей у мужчин и женщин. Так, в 2020 г. было показано, что, если не принимать во внимание факторы, связанные с репродуктивной функцией женщин, риск первого венозного тромбоза был в два раза выше у мужчин, чем у женщин [24]. Несмотря на изучение различных факторов, объяснения парадокса половых различий в риске как впервые возникшего, так и повторного венозного тромбоза найти не удалось. По данным другого исследования, мужчины также имели более высокий риск первого и повторных венозных тромбозов, чем женщины [25]. Было предложено несколько объяснений половых различий. Основным фактором, объясняющим около 20% различий в популяционно-приписываемой доле, был рост. Кроме того, были выдвинуты гипотезы альтернативных объяснений половых различий, включая наличие X- или Y-сцепленных мутаций или мутацию гена с специфичным для пола эффектом [25]. Однако в исследовании, включавшем 323 пациента с острым инсультом, проведенном в 2012 г., ТГВ достоверно чаще выявляли у женщин (71,4% против 49,5%) [7]. Согласно результатам исследования 2021 г., женский пол и высокий уровень D-димера у пациентов с ОНМК были независимыми значимыми факторами, обуславливающими различия частоты ТГВ [26].

В нашей когорте было выявлено достоверно более частое поражение вен нижних конечностей у лиц женского пола, при этом, учитывая средний возраст пациентов ($59,23 \pm 13,7$ лет), можно не принимать во внимание факторы, связанные с репродуктивной системой. Вероятно, одно из объяснений данного факта в том, что ИМТ у женщин по результатам двухфакторного анализа на уровне тенденции оказался выше среди тех, у кого выявлены признаки тромбоза вен нижних конечностей. Можно предположить, что повышенная масса тела могла сыграть определенную роль в половом распределении. Нельзя исключить, что более высокая частота тромбоза у женщин может быть ассоциирована с повышением уровня эстрогенов, особенно у тех, кто имеет избыточную массу тела, что снижает тонус вен, а также может повышать объем циркулирующей крови [27]. Кроме того, более частое поражение вен нижних конечностей у лиц женского пола может быть связано с синдромом Мэя–Турнера (синдром сдавления общей подвздошной вены (чаще левой) общей подвздошной артерией). Данный синдром в популяции встречается с частотой до 20%, причем чаще у женщин [28].

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволяет констатировать следующее. Частота острых тромбозов вен нижних конечностей в исследуемой когорте составила 7,8%, посттромботических изменений — 5,6%. Выявление признаков тромбоза и (или) его последствий не было взаимосвязано с патогенетическим вариантом ишемического инсульта, а частота острых тромбозов снижалась с увеличением времени от момента развития инсульта. Изолированные поражения глубоких вен голени

были обнаружены чаще в сравнении с таковыми другой локализации. Достоверно чаще тромбоз вен нижних конечностей выявлен у женщин. Избыточная масса тела ассоциирована с поражением проксимальных отделов вен нижних конечностей. Благодаря повторному дуплексному сканированию вен нижних конечностей при поступлении в реабилитационный стационар получены результаты, которые повлияли на тактику лечебно-профилактических и реабилитационных мероприятий, в том числе для снижения вероятности ВТЭО в восстановительном периоде инсульта.

Литература

1. Гусев Е. И., Коновалов А. Н., Скворцова В. И., редакторы. Неврология. Национальное руководство. Том 1. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018; 880 с.
2. Фонякин А. В., Гераскина Л. А. Факторы риска, диагностика, лечение и профилактика венозных тромбозов и тромбоемболий при остром инсульте. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013; 5(4): 4–9.
3. Константинова Г. Д., Зубарев А. Р., Градусов Е. Г. Флебология. М.: Изд. дом Видар-М, 2000; 160 с.
4. Парфенов В. А. Венозные тромбоемболические осложнения при ишемическом инсульте и их профилактика. Неврологический журнал. 2012; 17 (5): 4–9.
5. Pinto SM, Yassin M, Galang G. Cost-Effectiveness Analysis of Routine Venous Doppler Ultrasound for Diagnosis of Deep Venous Thrombosis at Admission to Inpatient Rehabilitation. *Am J Phys Med Rehabil*. 2018; 97 (10): 747–53. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000961.
6. Кунцевич Г. И., Максимова М. Ю., Попова Л. А., Рябинкина Ю. В., Гнедовская Е. В., Пирадов М. А. Тромбоз вен нижних конечностей в динамике острых нарушений мозгового кровообращения. Ангиология и сосудистая хирургия. 2012; 18 (2): 77–81.
7. Bembek JP, Karlinski M, Kobayashi A, Czlonkowska A. Deep venous thrombosis in acute stroke patients. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012; 18(3): 258–64. DOI: 10.1177/1076029611424575. Epub 2011 Nov 8.
8. Rinde LB, Småbrekke B, Mathiesen EB, et al. Ischemic stroke and risk of venous thromboembolism in the general population: the tromsø study. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5 (11): e004311. DOI: 10.1161/JAHA.116.004311
9. Wang Y, Shi Y, Dong Y, Dong Q, Ye T, Fang K. Clinical Risk Factors of Asymptomatic Deep Venous Thrombosis in Patients With Acute Stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019; 25: 1–7. DOI: 10.1177/1076029619868534. PMID: 31434499.
10. Obi AT, Barnes GD, Napolitano LM, et al. Venous thrombosis epidemiology, pathophysiology, and anticoagulant therapies and trials in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2021; 9 (1): 23–35. DOI: 10.1016/j.jvsv.2020.08.030. Epub 2020 Sep 8.
11. Zdanyte M, Rath D, Gawaz M, et al. Venous Thrombosis and SARS-CoV-2. *Hamostaseologie*. 2021. DOI: 10.1055/a-1661-0283. Epub ahead of print.
12. Liu XC, Chen XW, Li ZL, Wang SC, Chen C. Anatomical distribution of lower-extremity deep venous thrombosis in patients with acute stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020; 29 (7): 1–5. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104866. Epub 2020 May 11.
13. Valentin ML, Clemens R, Thalhammer C. Duplexsonografie der tiefen Beinvenenthrombose [Duplex ultrasound of deep vein thrombosis of the leg]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2016; 141 (13): 946–9. DOI: 10.1055/s-0042-108930. Epub 2016 Jun 30. German.
14. Kearon C, Salzman EW, Hirsh J. Epidemiology, pathogenesis, and natural history of venous thrombosis. In: George JN, editor. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; p. 1153–77.
15. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24 (1): 35–41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35.
16. Kelly J, Rudd A, Lewis RR, et al. Venous thromboembolism after acute ischemic stroke a prospective study using magnetic resonance direct thrombus imaging. *Stroke*. 2004; 35: 2320–6.
17. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2008; 133: 454–545.
18. Полянцева А. А., Фролов Д. В., Линченко Д. В., Щелокова И. В., Литвинова Т. А., Дзячкова Ю. А. Результаты лечения пероральными антикоагулянтами пациентов с тромбозами глубоких вен нижних конечностей. Ангиология и сосудистая хирургия. 2020; 26 (2): 42–51. DOI: 10.33529/ANGIO2020208.
19. Hekman KE, Chao CL, Morgan CE, Helenowski IB, Eskandari MK. Direct oral anticoagulants decrease treatment failure for acute lower extremity deep venous thrombosis [published online ahead of print, 2021 Sep 26]. *Vascular*. 2021; OnlineFirst. DOI: 10.1177/17085381211042231.
20. Sharifi M, Freeman W, Bay C, Sharifi M, Schwartz F. Low incidence of post-thrombotic syndrome in patients treated with new oral anticoagulants and percutaneous endovenous intervention for lower extremity deep venous thrombosis. *Vasc Med*. 2015; 20 (2): 112–6. DOI: 10.1177/1358863X14553882
21. Sharma M, Ramanathan S, Khalighi K. Development of new deep venous thrombosis while on apixaban. *Case Rep Cardiol*. 2017; 2017: 1–3. DOI: 10.1155/2017/2842935.
22. Шевела А. И., Усов С. А., Маркина В.А. Ожирение и хроническая венозная недостаточность: от факторов риска к патогенезу. Флебология. 2019; 13 (3): 220–6.
23. Seidel AC, Belczak CEQ, Campos MB, Campos RB, Harada DS. The impact of obesity on venous insufficiency Phlebology. 2015; 30: 475–80.
24. Eichinger S, Kyrle PA. Sex, age and venous thrombosis-Are men and women indeed from different planets? *Eur J Intern Med*. 2021; 84: 16–17. DOI: 10.1016/j.ejim.2020.12.022.
25. Roach RE, Cannegieter SC, Lijfering WM. Differential risks in men and women for first and recurrent venous thrombosis: the role of genes and environment. *J Thromb Haemost*. 2014; 12 (10): 1593–600. DOI: 10.1111/jth.12678.
26. Mori T, Yoshioka K, Tanno Y. Frequency of deep vein thrombosis at admission for acute stroke and associated factors: a cross-sectional study. *Thromb J*. 2021; 19 (1): 62. DOI: 10.1186/s12959-021-00315-5.
27. Hunt BJ. The effect of BMI on haemostasis: Implications for thrombosis in women's health. *Thromb Res*. 2017; 151 Suppl 1: 53–55. DOI: 10.1016/S0049-3848(17)30068-3.
28. Kiernan TJ, Yan BP, Cubeddu RJ, Rengifo-Moreno P, Gupta V, Inglessis I, et al. May-Thurner syndrome in patients with cryptogenic stroke and patent foramen ovale: an important clinical association. *Stroke*. 2009; 40 (4): 1502–4. PMID: 19182088. Available from: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.527366>.

References

- Gusev EI, Konovalov AN, Skvortsova VI, redaktory. *Nevrologiya. Nacional'noe rukovodstvo*. Tom 1. M.: GEOTAR-Media, 2018; 880 s. Russian.
- Fonyakin AV, Geraskina LA. Faktory riska, diagnostika, lechenie i profilaktika venoznyx trombozov i tromboembolij pri ostrom insul'te. *Nevrologiya, neiropsixiatriya, psixosomatika*. 2013; 5 (4): 4–9. Russian.
- Konstantinova GD, Zubarev AR, Gradusov EG. *Flebologiya*. M.: Izd. dom Vidar-M, 2000; 160 s. Russian.
- Parfenov VA. Venoznye tromboembolicheskie oslozhneniya pri ishemičeskom insul'te i ix profilaktika. *Nevrologičeskij žurnal*. 2012; 17 (5): 4–9. Russian.
- Pinto SM, Yassin M, Galang G. Cost-Effectiveness Analysis of Routine Venous Doppler Ultrasound for Diagnosis of Deep Venous Thrombosis at Admission to Inpatient Rehabilitation. *Am J Phys Med Rehabil*. 2018; 97 (10): 747–53. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000961.
- Kuncevich GI, Maksimova MYu, Popova LA, Ryabinkina YuV, Gnedovskaya EV, Piradov MA. Tromboz ven nizhnix konechnostej v dinamike ostryx narushenij mozgovogo krovoobrashheniya. *Angiologiya i sosudistaya xirurgiya*. 2012; 18 (2): 77–81. Russian.
- Bembenek JP, Karlinski M, Kobayashi A, Czlonkowska A. Deep venous thrombosis in acute stroke patients. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012; 18(3): 258–64. DOI: 10.1177/1076029611424575. Epub 2011 Nov 8.
- Rinde LB, Småbrekke B, Mathiesen EB, et al. Ischemic stroke and risk of venous thromboembolism in the general population: the tromsø study. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5 (11): e004311. DOI: 10.1161/JAHA.116.004311
- Wang Y, Shi Y, Dong Y, Dong Q, Ye T, Fang K. Clinical Risk Factors of Asymptomatic Deep Venous Thrombosis in Patients With Acute Stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019; 25: 1–7. DOI: 10.1177/1076029619868534. PMID: 31434499.
- Obi AT, Barnes GD, Napolitano LM, et al. Venous thrombosis epidemiology, pathophysiology, and anticoagulant therapies and trials in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2021; 9 (1): 23–35. DOI: 10.1016/j.jvsv.2020.08.030. Epub 2020 Sep 8.
- Zdanyte M, Rath D, Gawaz M, et al. Venous Thrombosis and SARS-CoV-2. *Hamostaseologie*. 2021. DOI: 10.1055/a-1661-0283. Epub ahead of print.
- Liu XC, Chen XW, Li ZL, Wang SC, Chen C. Anatomical distribution of lower-extremity deep venous thrombosis in patients with acute stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020; 29 (7): 1–5. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104866. Epub 2020 May 11.
- Valentin ML, Clemens R, Thalhammer C. Duplexsonografie der tiefen Beinvenenthrombose [Duplex ultrasound of deep vein thrombosis of the leg]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2016; 141 (13): 946–9. DOI: 10.1055/s-0042-108930. Epub 2016 Jun 30. German.
- Kearon C, Salzman EW, Hirsh J. Epidemiology, pathogenesis, and natural history of venous thrombosis. In: George JN, editor. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; p. 1153–77.
- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24 (1): 35–41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35.
- Kelly J, Rudd A, Lewis RR, et al. Venous thromboembolism after acute ischemic stroke a prospective study using magnetic resonance direct thrombus imaging. *Stroke*. 2004; 35: 2320–6.
- Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2008; 133: 454–545.
- Polyancev AA, Frolov DV, Linchenko DV, Shhelokova IV, Litvinova TA, Dyachkova YuA. Rezul'taty lecheniya peroral'nymi antikoagulyantami pacientov s trombozami glubokix ven nizhnix konechnostej. *Angiologiya i sosudistaya xirurgiya*. 2020; 26 (2): 42–51. DOI: 10.33529/ANGIO2020208. Russian.
- Hekman KE, Chao CL, Morgan CE, Helenowski IB, Eskandari MK. Direct oral anticoagulants decrease treatment failure for acute lower extremity deep venous thrombosis [published online ahead of print, 2021 Sep 26]. *Vascular*. 2021; OnlineFirst. DOI: 10.1177/17085381211042231.
- Sharifi M, Freeman W, Bay C, Sharifi M, Schwartz F. Low incidence of post-thrombotic syndrome in patients treated with new oral anticoagulants and percutaneous endovenous intervention for lower extremity deep venous thrombosis. *Vasc Med*. 2015; 20 (2): 112–6. DOI: 10.1177/1358863X14553882
- Sharma M, Ramanathan S, Khalighi K. Development of new deep venous thrombosis while on apixaban. *Case Rep Cardiol*. 2017; 2017: 1–3. DOI: 10.1155/2017/2842935.
- Shevela AI, Usov SA, Markina VA. Ozhirenie i xronicheskaya venoznaya nedostatochnost': ot faktorov riska k patogenezu. *Flebologiya*. 2019; 13 (3): 220–6. Russian.
- Seidel AC, Belczak CEQ, Campos MB, Campos RB, Harada DS. The impact of obesity on venous insufficiency *Phlebology*. 2015; 30: 475–80.
- Eichinger S, Kyrle PA. Sex, age and venous thrombosis-Are men and women indeed from different planets? *Eur J Intern Med*. 2021; 84: 16–17. DOI: 10.1016/j.ejim.2020.12.022.
- Roach RE, Cannegieter SC, Lijfering WM. Differential risks in men and women for first and recurrent venous thrombosis: the role of genes and environment. *J Thromb Haemost*. 2014; 12 (10): 1593–600. DOI: 10.1111/jth.12678.
- Mori T, Yoshioka K, Tanno Y. Frequency of deep vein thrombosis at admission for acute stroke and associated factors: a cross-sectional study. *Thromb J*. 2021; 19 (1): 62. DOI: 10.1186/s12959-021-00315-5.
- Hunt BJ. The effect of BMI on haemostasis: Implications for thrombosis in women's health. *Thromb Res*. 2017; 151 Suppl 1: 53–55. DOI: 10.1016/S0049-3848(17)30068-3.
- Kiernan TJ, Yan BP, Cubeddu RJ, Rengifo-Moreno P, Gupta V, Inglessis I, et al. May-Thurner syndrome in patients with cryptogenic stroke and patent foramen ovale: an important clinical association. *Stroke*. 2009; 40 (4): 1502–4. PMID: 19182088. Available from: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.527366>.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПСИХОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА НА ОСОБЕННОСТИ СХЕМЫ ТЕЛА ПРИ НАРУШЕНИИ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ

И. В. Запесоцкая¹, М. В. Сокольская¹, Т. Н. Разуваева², С. Л. Борисова¹✉¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Исследование нейропсихологических особенностей, обуславливающих нарушение пищевого поведения, может дать отправную точку для построения комплексных исследований, позволяющих осуществить интегральную оценку внутренних и внешних механизмов и закономерностей нарушения пищевого поведения. Целью работы было выявить влияние нейропсихологического статуса на особенности схемы тела при нарушении пищевого поведения. Обследовали 51 женщину в возрасте 20–35 лет. Оценку субъективных и объективированных показателей образа тела проводили с помощью проб на воспроизведение положения руки по отношению к лицу, методики «Силуэт» и изображения диаметра указательного пальца правой руки и длины стопы, опросника образа собственного тела. Качественную и количественную оценку нейропсихологического статуса осуществляли с помощью Лурьевской тестовой батареи. Для анализа управляющих функций использовали Висконсинский тест сортировочных карточек, «Cantidad-Numer interference task» (Canum), «Block span». По результатам исследования было установлено, что у женщин с выраженными типами пищевого поведения, рассматриваемыми как граница нормы, отмечены особенности, связанные с субъективным отношением к собственному телу: с одной стороны, преобладает неудовлетворенность, которая включает в себя эмоциональную оценку, чувства, связанные с внешностью, и убеждения и представления об идеальной внешности; с другой стороны, отсутствуют нарушения, связанные с объективирующими представлениями о собственном теле (вес, размер, пропорции). Выявлены модально-неспецифичные дефициты управляющих функций, характерные для разных типов нарушений пищевого поведения.

Ключевые слова: нейропсихологический статус, нарушение пищевого поведения, схема тела

Вклад авторов: все авторы внесли одинаковый вклад в планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретацию данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (протокол № 211 от 18 октября 2021 г.), проведено в соответствии с требованиями основ законодательства «Об охране здоровья граждан»; все участники подписали добровольное информированное согласие на обследование.

✉ **Для корреспонденции:** София Леонидовна Борисова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; petrash@mail.ru

Статья получена: 26.09.2022 **Статья принята к печати:** 12.10.2022 **Опубликована онлайн:** 27.10.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.051

INFLUENCE OF NEUROPSYCHOLOGICAL STATUS ON BODY SCHEMA IN EATING DISORDERS

Zapesotskaya IV¹, Sokolyskaya MV¹, Razuvaeva TN², Borisova SL¹✉¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Belgorod State University, Belgorod, Russia

The study of neuropsychological features that cause eating disorders may provide a starting point for planning complex studies that allow for integral assessment of the internal and external mechanisms and patterns of eating disorders. The work aims to evaluate the influence of the neuropsychological status on features of the body schema in eating disorders. We conducted an analysis of the subjective and objective indicators of the body image on 51 women aged 20–35 years using face-relative hand position reproduction tests, the "Silhouette" method, measurement of the right hand index finger diameter and of the foot length, and a self-image questionnaire. We carried out qualitative and quantitative assessment of the neuropsychological status using the Luriev test battery. For the analysis of control functions, we used the Wisconsin sorting card test, Cantidad-Numer interference task (Canum), and "Block Span". We found that women with atypical eating behaviors noted the following features associated with a subjective attitude towards their own body: prevalence of dissatisfaction in one's emotional evaluation due to the perception of one's own appearance, stemming from the beliefs and ideas about one's ideal appearance, despite the absence of the abnormalities associated with the objectified ideas of one's own body (weight, size, body proportions). We identified modal-nonspecific control function deficiencies characteristic of different types of eating disorders.

Keywords: neuropsychological status, eating disorder, body schema

Author contribution: all authors contributed equally to study design, literature review, data collection, analysis, and interpretation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics review board of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of Russia (protocol # 211 of 18 October 2021) and carried out in accordance with the requirements of the Fundamentals of Legislation "On the protection of the health of citizens"; All participants signed a voluntary informed consent for the examination.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sofia L. Borisova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; petrash@mail.ru

Received: 26.09.2022 **Accepted:** 12.10.2022 **Published online:** 27.10.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.051

Необходимость качественной квалификации нарушений пищевого поведения заставляет рассматривать данный феномен в континууме границ нормы и патологии. Полусом патология являются понятия «расстройство приема пищи» (F50, МКБ-10) или «расстройства питания и пищевого поведения» (6B8, МКБ-11), понимаемые как класс психогенно обусловленных поведенческих синдромов,

представляющих собой нарушения в приеме пищи и связанные с физиологическими симптомами. Определение полюса границы нормы вызывает значительно большие трудности, связанные с необходимостью дефиниции понятий «нарушение», «предболезнь», «донозоология» и соотнесения их с качественными и количественными особенностями, проявляющимися в пищевом поведении.

Помимо закономерных и очевидных резонансов подобного подхода, связанных с исследовательским и практическим смыслом, можно обозначить еще один: при состояниях, относимых к границе нормы, наибольший успех будет иметь клинко-психологическая помощь, интервентивный характер которой опирается на понимание психологических факторов и детерминант, обуславливающих психогенный характер пищевого поведения как развивающуюся систему феноменов психофизиологического, нейропсихологического, личностного, социально-психологического уровней. Таким образом, ставя целью исследовать нейропсихологический статус в контексте границ нормы различных типов пищевого поведения, мы пытаемся определить дефициты высших психических функций, осуществить их качественный и количественный анализ для выявления системных характеристик нарушений пищевого поведения, позволяющих в дальнейшем осуществить факторный (с нейропсихологической точки зрения) анализ.

Решая задачу определения степени выраженности нарушения в границах нормы, ряд авторов выделяет промежуточные состояния, получившие название «донозонология» [1]. Под донозонологией понимается изменение иммунологической резистентности под воздействием производственных и бытовых факторов малой интенсивности. Это не больные люди, их рекомендуют относить к группе с предпатологическими состояниями, из которой могут, но не обязательно, формироваться контингенты больных [2].

Задача специалистов состоит в необходимости своевременного выявления состояния донозонологии с целью оказания помощи в повышении устойчивости организма к неблагоприятным условиям [3].

И. И. Брехман выделяет третье состояние как неполное здоровье, которое может длиться очень долго и которое нельзя отождествлять с преморбидными состояниями [4]. Причем, в этом состоянии находится до половины всей популяции людей [3].

Нарушенное пищевое поведение — широкий термин, включающий как содержательные, так и структурные характеристики. К содержательным проявлениям относят переизбыток, компенсаторные энергозатратные формы поведения (вызывание рвоты, злоупотребление слабительным, таблетками для похудения, диуретиками и компульсивными упражнениями для похудения) [1]. Эти проявления носят характер привычек, что не позволяет классифицировать их как настоящие расстройства, такие как нервная анорексия, нервная булимия, атипичные

нарушения пищевого поведения (или нарушения пищевого поведения, нигде более не классифицируемые) [5].

Традиционно нарушения пищевого поведения рассматривают как расстройство, включающее следующие признаки:

- явное изменение пищевых привычек или поведения, связанных с контролем массы тела;
- изменение поведения приводит к клинически значимому повреждению соматического здоровья или психосоциального функционирования (кардинальные симптомы нарушенного пищевого поведения включают нарушение питания и сопутствующую переоценку формы или массы тела);
- поведенческие нарушения не должны быть следствием любых соматических или иных психических расстройств [6].

Анализируя структурный характер пищевого поведения как сложноорганизованную систему с позиций определения сохранности—нарушения системы, в качестве критериев можно рассматривать дивергентность, когерентность, организованность, предложенные в рамках метасистемного подхода к пониманию особенностей развития и функционирования сложноорганизованных систем, а также их структурно-уровневой организации [7]. Рассматривая в качестве элементов системы на разных уровнях конкретные формы поведения, стратегии поведения, поведенческие паттерны, низкую дивергентность можно определить как жесткую фиксацию на ограниченном числе поведенческих пищевых типов и стратегий, низкую когерентность — как снижение взаимосвязей как горизонтальных, так и вертикальных элементов системы, что приводит к затруднению или отсутствию гибкого переключения между ними. Дезорганизованность пищевого поведения как системы проявляется в трудностях, связанных с планированием, контролем и произвольной регуляцией пищевого поведения [7].

Выделяют, как правило, три основных типа пищевого поведения: экстернальное пищевое поведение как реакция на внешние стимулы, эмоциогенное пищевое поведение как гиперфагическая реакция на стрессовые ситуации и ограничительное пищевое поведение как избыточные самоограничения и сверхконтроль [8], анализ выраженности и устойчивости которых принято рассматривать как основу для диагностики выраженности нарушений.

Нарушенным считают поведение, когда один из типов пищевого поведения [9] начинает заметно преобладать над другими, что ведет к серьезным нарушениям пищевого поведения [6].

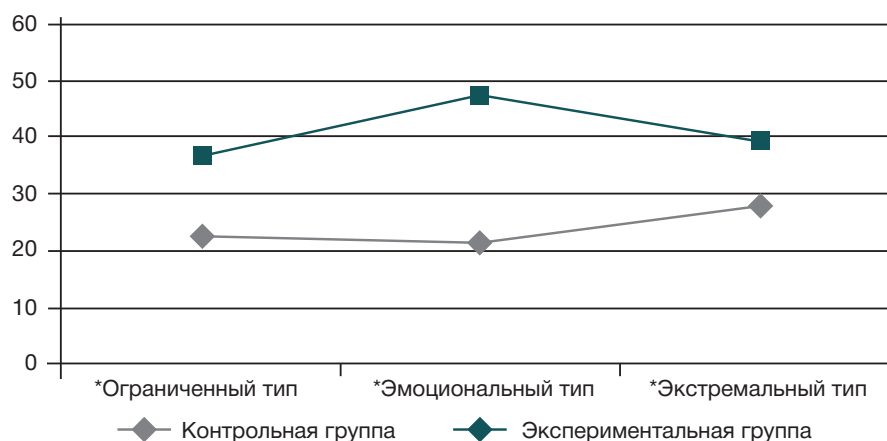


Рис. 1. Диаграмма показателей средних значений выраженности типов пищевого поведения в эмпирических группах. * — значимые различия, при $p \leq 0,05$

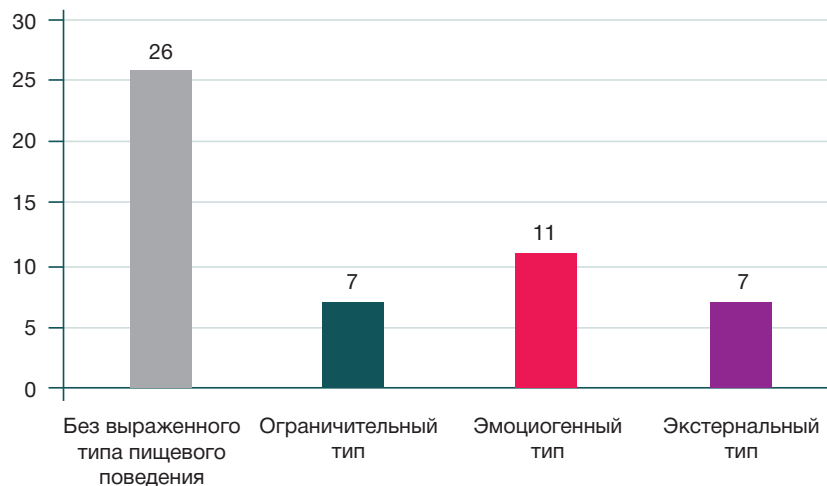


Рис. 2. Диаграмма показателей распределения эмпирической выборки в группах

В исследовании прием определение схемы тела как неосознаваемого внутреннего представления, комплекса информации о структурной организации тела, его динамических характеристиках, текущем и изменяющемся положении его частей относительно друг друга, а также в горизонтальной плоскости [10]. Схема тела является динамичным субъективным образованием, поскольку она формируется самим человеком в процессе его активной деятельности [11]. Схему тела человек создает из различных проявлений телесного осознания в разнообразных жизненных ситуациях [12]. Базой схемы тела является комплекс организованной информации о динамической системе [13].

В нейропсихологическом аспекте схему тела можно рассматривать как функциональную систему, которую составляют проприоцептивные, гностические, антипационно-прогностические и управляющие функции.

На проприоцептивном уровне схема тела представлена суставно-мышечным чувством и понимается как сложный вид чувствительности, создающий основу ощущению взаиморасположения и соотношения размеров частей собственного тела; структура психики, отражающая устройство собственного тела человека; гибкое, динамичное представление субъекта о собственном теле, которое непрерывно создается и меняется у человека в

течение его жизни [14]. Гностический уровень схемы тела представлен тактильными, мышечными, зрительными образами. Некоторые авторы дают следующее определение: «активно организующие и модифицирующие впечатления, производимые входящими сенсорными сигналами/стимулами таким образом, что конечное переживание положения тела или его локализации входит в сознание, связываясь с тем, что происходило раньше» [15].

Антипацию понимают как способность личности с высокой вероятностью предвосхищать ход событий, прогнозировать развитие ситуаций и собственные реакции на них, действовать с временно-пространственным упреждением [16]. Управляющие функции обеспечивают произвольные способы управления поведением: программирование, регуляцию и контроль [17]. Описываемый уровень позволяет осуществлять максимально широкий анализ и синтез представлений о собственном теле в контексте текущей физической и социальной ситуации.

Таким образом, ставя целью исследование нейропсихологического статуса в контексте границ нормы различных типов пищевого поведения, попытаемся определить дефициты высших психических функций, осуществить их качественный и количественный анализ для выявления системных характеристик нарушений

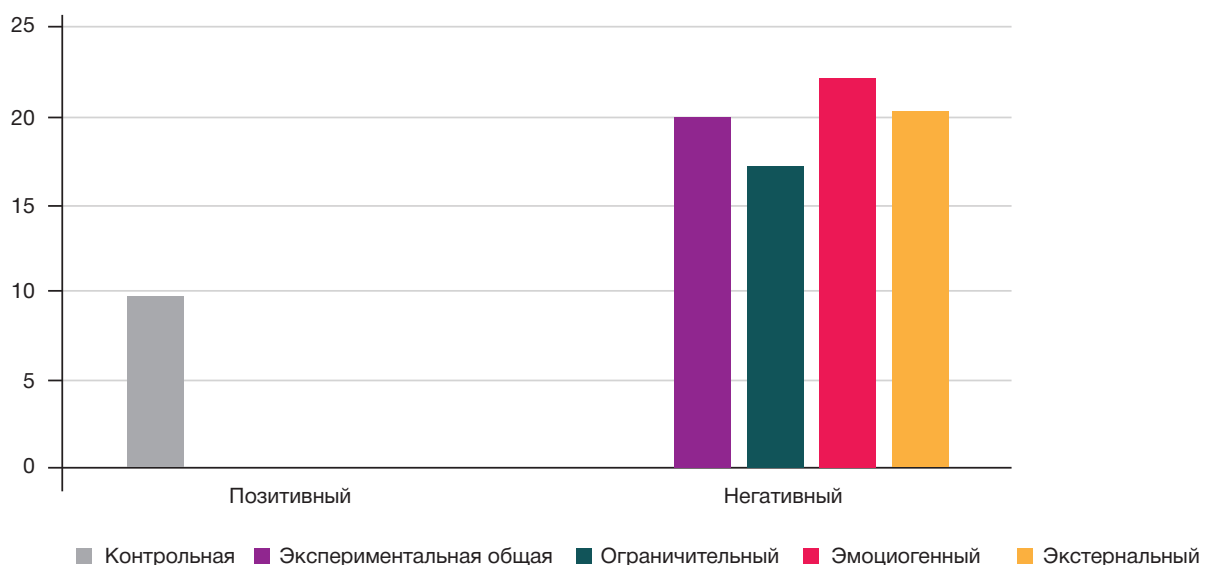


Рис. 3. Диаграмма средних значений показателей образа собственного тела в эмпирических группах

Таблица 1. Выраженность средних значений показателей нейропсихологического статуса (гнозис, праксис, слухоречевая память) в эмпирических группах

	Зрительный предметный гнозис			Астереогноз			Динамический праксис «Кулак-ребро-ладонь»			Динамический праксис графическая проба «Заборчик»			Оральный праксис			Слухоречевая память	
	Темп	Точность	Дифференцированность	Темп	Точность	Дифференцированность	Темп	Точность	Дифференцированность	Темп	Точность	Дифференцированность	Темп	Точность	Дифференцированность	Темп	Точность
Контрольная группа (n = 26)	12,4	4	4	4	4	4	3,1	4	4	4,6	4	4	2,8	4	4	3,6	3,5
Ограничительный тип (n = 7)	16,7	4	4	4	4	4	5,8	4	3,5	4,9	3	4	5,8	4	4	9,3	2,5
Эмоциогенный тип (n = 11)	13,4	4	4	4	4	4	3,2	3	3	4,8	2,5	3	3,1	3	3	4,2	3
Экстернальный тип (n = 7)	14,01	4	4	4	4	4	3,6	3	2,5	4,8	2,5	2,5	3,2	2,5	3	5,3	3

пищевого поведения, позволяющих, в дальнейшем, осуществить факторный (с нейропсихологической точки зрения) анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленных задач были использованы следующие методы: Голландский опросник пищевого поведения (Dutch Eating Behavior Questionnaire) [8]; проба на воспроизведение положения руки по отношению к лицу [18]; методика «Силуэт» [18]; изображение диаметра указательного пальца правой руки и длины стопы [19]; опросник образа собственного тела [20]; Луриевская тестовая батарея [10]; Висконсинский тест сортировочных карточек [21]; «Cantidad-Numer interference task» (Canum) [22]; «Block span» [23].

Эмпирическое исследование проводили в период с сентября по декабрь 2021 г. Объем выборки составил 51 человек: женщины, возраст 20–35 лет, условно здоровые. Все испытуемые принимали участие в исследовании добровольно при информированном согласии. Критерии включения в экспериментальную группу: высокие показатели (более 35 баллов) выраженности хотя бы одного из типов пищевого поведения по результатам применения Голландского опросника пищевого поведения: среднее значение по ограничительному типу пищевого поведения — 36,7 баллов; по эмоциогенному типу пищевого поведения — 47,7 баллов; по экстернальному типу пищевого поведения — 39,5 баллов. В контрольной группе (n = 26) средние значения не превышают 27 баллов (рис. 1).

Таким образом, общая выборка была распределена следующим образом: экспериментальная группа 1 (n = 7) — участники с ограничительным типом пищевого поведения; экспериментальная группа 2 (n = 11) — участники с эмоциогенным типом пищевого поведения; экспериментальная группа 3 (n = 7) — участники с экстернальным типом пищевого поведения; в контрольную группу (n = 26) вошли участники без выраженного типа пищевого поведения (рис. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате исследования особенностей схемы тела при нарушении пищевого поведения были выявлены статистически значимые различия в эмпирических группах по показателям образа собственного тела.

Отношение к собственному телу у испытуемых с нарушением пищевого поведения носит характер неудовлетворенности, которая включает в себя две составляющие: оценочный компонент, включающий эмоциональную оценку; чувства, связанные с внешностью, и когнитивный компонент — это убеждения и представления об идеальной внешности, когнитивное представление о схеме тела. Неудовлетворенность собственным телом имеет связь с реальным изменением веса и ощущениями, порождаемыми этим процессом. С позиции авторов методики, опросник направлен на диагностику глобальной оценки тела, куда относится удовлетворенность или неудовлетворенность своим весом, формой тела в целом и отдельными его частями.

При сравнении результатов опроса в группе без выраженного типа пищевого поведения и в объединенной группе с различной выраженностью типов (рис. 3) были получены следующие средние значения ($p \leq 0,05$): в контрольной группе $X_{cp} = 9,76$ балла, т. е. в среднем в группе наблюдается принятие образа своего тела и позитивное к нему отношение. В экспериментальной группе $X_{cp} = 19,81$ балла, т. е. выражена неудовлетворенность собственным телом, что приводит к значимому снижению оценки своего внешнего вида ($p \leq 0,05$).

При определении различий в каждой из эмпирических групп выявлено значимое ($p \leq 0,01$) снижение показателей, связанных с удовлетворенностью собственным телом в группах с эмоциогенным ($X_{cp} = 22,08$) и экстернальным ($X_{cp} = 20,2$) типами пищевого поведения, в группе с ограничительным типом пищевого поведения также отмечено снижение удовлетворенности ($X_{cp} = 17,6$) на уровне тенденции.

По показателям методик, объективирующих представление о собственном теле, значимых различий в эмпирических группах не выявлено.

Таблица 2. Выраженность средних значений показателей нейропсихологического статуса (гнозис, праксис, слухоречевая память) в эмпирических группах

	Зрительная рабочая память				Когнитивная гибкость									Исполнительное внимание		
	Размер блока	Общий счет	Число правильных испытаний	Объем памяти	Правильные ответы	Общее число ошибок	Персеверативные ответы	Персеверативные ошибки	Неперсеверативные ошибки	Уникальные ошибки	Неспособность к поддержанию набора	Способность к обучению	Ответы на концептуальном уровне	Ошибки	Темп	Концентрация
Контрольная группа (n = 26)	6,5	48	9,6	7,2	36	8,1	0*	0	0,7*	0	0	1,29	49,3*	0	8,6	0,67
Ограничительный тип (n = 7)	5,4	32	4,1	6,4	45	19	17,4*	6,1	16,4*	0	0	-9,01	26,7*	16,4*	19,2*	0,3
Эмоциогенный тип (n = 11)	5,3	26	4,6	6,1	53	11	16,2*	7,4	11,8*	1	0	-8,17	21,6*	11,2*	11,4	0,12*
Экстернальный тип (n = 7)	3,8	34	5,1	3,9	47	17	16,6*	5,8	13,5*	0	0	-14,9	18,8*	15,6*	13,1	0,19*

Для решения задачи выявления нейропсихологических особенностей, обуславливающих особенности схемы тела, было проведено нейропсихологическое исследование, включающее анализ состояния базовых высших психических функций (праксис, гнозис, память, речь), а также функций программирования, регуляции и контроля — управляющих функций (зрительная рабочая память, когнитивная гибкость, исполнительное внимание).

Анализируя в целом результаты нейропсихологической диагностики высших психических функций в эмпирических группах, следует отметить их сохранный характер для всех испытуемых (табл. 1). Все показатели находятся в границах нормы. Однако на уровне тенденций следует отметить устойчивое снижение скорости в выполнении проб, направленных на исследование особенностей динамического праксиса ($X_{cp.} = 5,8$) и гнозиса ($X_{cp.} = 16,7$) для испытуемых с ограничительным типом пищевого поведения, а также более быструю истощаемость в исследовании слухоречевой памяти. Необходимо также указать на ряд случаев влияния гомогенной интерференции при отсроченном воспроизведении. Особенностью выполнения нейропсихологических проб испытуемых в группах с эмоциогенным и экстернальным типами пищевого поведения оказались ошибки, связанные с точностью и дифференцированностью выполнения проб, направленных на исследование серийного воспроизведения: графическая проба «Заборчик», оральный, динамический праксис.

По результатам исследования зрительной рабочей памяти и исполнительного внимания у испытуемых в эмпирических группах статистически значимых различий выявлено не было (табл. 2). Вместе с тем выявлены более высокие показатели параметра «общий счет» в контрольной группе, что свидетельствует о высоком объеме и устойчивости рабочей памяти. Необходимо также отметить у испытуемых с эмоциогенным типом нарушений большой разброс средних значений показателей зрительной рабочей памяти по сравнению с остальными эмпирическими группами. Для испытуемых с ограничительным типом пищевого поведения характерна монотонно убывающая кривая работоспособности, что согласуется с предыдущими результатами исследования высших психических функций. Для испытуемых группы с экстернальным типом поведения характерен устойчивый более низкий показатель длины удерживаемой в зрительном поле цепочки стимулов, что свидетельствует о сниженном объеме зрительной памяти.

Исследование когнитивной гибкости, по результатам выполнения методики «Висконсинский тест сортировочных карточек», показало статистически значимые различия контрольной группы по сравнению с экспериментальными по параметрам «персеверативные ответы» ($p \leq 0,05$), «неперсеверативные ошибки» ($p \leq 0,05$) и «ответы на концептуальном уровне» ($p \leq 0,05$). В эмпирических группах число персеверативных реакций значимо выше, чем в контрольной. Наибольшее число персеверативных ответов наблюдается в группе с ограничительным типом пищевого поведения. Характерной особенностью всех эмпирических групп является также отрицательный показатель способности к обучению.

Исследование исполнительного внимания позволяет сделать вывод о значимо сниженных показателях темпа и продуктивности внимания в группе с ограничительным типом поведения. Для групп с эмоциогенным и экстернальным типами поведения характерно значимое снижение концентрации внимания и показателя продуктивности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У испытуемых с выраженными типами пищевого поведения, рассматриваемыми как граница нормы, отмечены особенности, связанные с субъективным отношением к собственному телу: с одной стороны, преобладает неудовлетворенность, которая включает в себя эмоциональную оценку, чувства, связанные с внешностью и убеждения и представления об идеальной внешности, с другой стороны, отсутствуют нарушения, связанные с объективирующими представлениями о собственном теле (вес, размер, пропорции). Нейропсихологический статус испытуемых в группе с ограничительным типом пищевого поведения характеризуется модально-неспецифическими дефицитами: снижением скорости в выполнении проб, истощаемостью и влиянием гомогенной интерференции при отсроченном воспроизведении, а также устойчивым снижением работоспособности, инертности, значимо сниженных показателях темпа и продуктивности внимания. Выявленные особенности позволяют сделать вывод о преобладании модально-неспецифического фактора, связанного со снижением динамических характеристик управляющих функций при ограничительном типе пищевого поведения. В группе с эмоциогенным типом нарушения пищевого поведения наиболее часто проявляются особенности нейропсихологического статуса, связанные с точностью и дифференцированностью

выполнения проб, а также дефицитами, связанными с удержанием двигательной программы, серийных движений. Зрительная рабочая память характеризуется неустойчивостью, исполнительное внимание — снижением концентрации и продуктивности. Выявленные особенности позволяют сделать вывод о преобладании модально-неспецифического фактора, связанного со снижением контролирующих характеристик управляющих функций при эмоциогенном типе пищевого поведения. У испытуемых в группе с экстернальным типом нарушения пищевого поведения, наряду со снижением точности и дифференцированности выполнения проб, отмечается выраженное снижение объема зрительной рабочей памяти, а также значительное число персеверативных ошибок и персеверативных ответов, что свидетельствует о снижении когнитивной гибкости. Исполнительное внимание характеризуется снижением концентрации и продуктивности. Выявленные особенности позволяют сделать вывод о преобладании модально-неспецифического фактора,

связанного со снижением программирования психической активности при экстернальном типе пищевого поведения.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование можно рассматривать в качестве поискового этапа изучения более широкой проблемы: построение нейropsychологической модели управляющих функций, обуславливающих особенности схемы тела при нарушении пищевого поведения. Результаты исследования позволяют квалифицировать выявленные нейropsychологические особенности как тонкие дефициты в работе третьего функционального блока мозга, выполняющего функции программирования, регуляции и контроля за протекающей деятельностью, проявляющихся в работе модально-неспецифического фактора, что может быть использовано при определении мишеней программ клинико-психологической профилактики и коррекции нарушений пищевого поведения.

Литература

- Брехман И. И. Введение в валеологию — науку о здоровье. Л.: Наука, 1987; 123 с.
- Вознесенская Т. Г., Сафонова В. А., Платонова Н. М. Нарушения пищевого поведения коморбидные симптомы при ожирении и методы их коррекции. Журн. неврол. и психиатр. 2000; 1: 49–52.
- Залевский Г. В. Избранные труды: в 6 т. Т. 3: Клиническая психология и психология здоровья. Томск: Изд-во ТГУ, 2013; 352 с.
- Каминская Н. А., Айламазян А. М. Исследования образа физического «Я» в различных психологических школах. Национальный психологический журнал. 2015; 3 (19): 45–55.
- Карпов А. А. Возрастная динамика структурной организации метакогнитивной сферы личности. Российский психологический журнал. 2018; 15 (2): 108–32.
- Косолапова К. Н., Колупаева Ю. А. Особенности формирования схемы тела дошкольников с нарушением функций опорно-двигательного аппарата. Научно-методический электронный журнал «Концепт». 2016; 17: 887–92. Доступно по ссылке: <http://e-koncept.ru/2016/46352.htm>.
- Левик Ю. С. Использование дополнительных афферентных сигналов системой регуляции вертикальной позы человека. Физиология человека. 2007; 1 (34): 1–5.
- Лурия А. Р. Высшие корковые функции человека. СПб.: Питер, 2008; 624 с.
- Менделевич В. Д., Соловьева С. Л. Антиципационная концепция неврозогенеза. В книге: Неврология и психосоматическая медицина. М.: МЕДпресс-информ, 2002; 608: 45–98.
- Никишина В. Б., Петраш Е. А. Модификация методики «Автопортрет» с целью изучения диссоциации образа «Я». Вопросы психологии. 2016; 3: 156–66.
- Никишина В. Б., Лазаренко В. А., Петраш Е. А., Ахметзянова А. И. Нарушение схемы тела при менингиомах теменно-затылочной области. Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова: Научно-практический рецензируемый журнал. 2016; 116 (12): 20–24.
- Полунина А. Г., Давыдов Д. М. Висконсинский тест сортировки карточек как инструмент оценки когнитивных функций. В книге: Т. Б. Дмитриева, редактор. Социальная психиатрия. М.: Изд. ГНЦ ССП им. В. П. Сербского, 2004; с. 217–36.
- Скугаревский О. А., Сивуха С. В. Образ собственного тела: разработка инструмента для оценки. Психологический журнал. 2006; 2 (10): 40–48.
- Тхостов А. Ш. Психология телесности. М.: Смысл. 2002. 287.
- Хомская Е. Д. Проблема факторов в нейropsychологии. В книге: Е. Д. Хомская, редактор. Нейropsychологический анализ межполушарной асимметрии мозга. М.: «Наука», 1986; 23–33.
- Щедрина А. Г. Здоровый образ жизни: методологические, социальные, биологические, медицинские, психологические, педагогические, экологические аспекты. Новосибирск: «Альфа-Виста», 2007; 144 с.
- Button EJ, Sonuga-Barke EJ, Davies J, Thompson M. A prospective study of self-esteem in the prediction of eating problems in adolescent schoolgirls: questionnaire findings. Br J Clin Psychol. 1996; 35 (2): 193–203. DOI: 10.1111/j.2044-8260.1996.tb01176.x. PMID: 8773797.
- Isaacs E, Vargha-Khadem F. Differential course of development of spatial and verbal memory span: A normative study. British Journal of Developmental Psychology. 2011; 7: 377–80. DOI: 10.1111/j.2044-835X.1989.tb00814.x.
- Gutiérrez-Martínez F, Ramos-Ortega M, Vila-Chaves J-Ó. Executive Effectiveness On Stroop Type Interference Tasks. A Validation Study of a Numerical and Manual Version (CANUM). Anales De Psicología. 2018; 34 (1). DOI: 10.6018/analesps.34.1.263431.
- Laureys F, Middelbos L, Rommers N, et al. The effects of age, biological maturation and sex on the development of executive functions in adolescents. Frontiers in Physiology. 2021; (12). Art. 1453. DOI: 10.3389/fphys.2021.703312.
- Mairs R, Nicholls D. Assessment and treatment of eating disorders in children and adolescents. Arch Dis Child. 2016; 101 (12): 1168–75. DOI: 10.1136/archdischild-2015-309481. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27381185.
- Stuss DT, Knight RT, editors. Principles of Frontal Lobe Function. New York. 2002. online edn, Oxford Academic. 1 May 2009. Available from: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195134971.001.0001>.
- Van Strien T, Oosterveld P. The children's DEBQ for assessment of restrained, emotional, and external eating in 7- to 12-year-old children. Int J Eat Disord. 2008; 41 (1): 72–81. DOI: 10.1002/eat.20424. PMID: 17634965.

References

1. Brexman II. Vvedenie v valeologiyu — nauku o zdorov'e. L.: Nauka, 1987; 123 s. Russian.
2. Voznesenskaya TG, Safonova VA, Platonova NM. Narusheniya pishhevogo povedeniya komorbidnye simptomy pri ozhireni i metody ix korrekci. Zhurn. nevrol. i psixiatr. 2000; 1: 49–52. Russian.
3. Zalevskij GV. Izbrannye trudy: v 6 t. T. 3: Klinicheskaya psixologiya i psixologiya zdorov'ya. Tomsk: Izd-vo TGU, 2013; 352 s. Russian.
4. Kaminskaya NA, Ajlamazyan AM. Issledovaniya obraza fizicheskogo «Ya» v razlichnyx psixologicheskix shkolax. Nacional'nyj psixologicheskij zhurnal. 2015; 3 (19): 45–55. Russian.
5. Karpov AA. Vozrastnaya dinamika strukturnoj organizatsii metakognitivnoj sfery lichnosti. Rossijskij psixologicheskij zhurnal. 2018; 15 (2): 108–32. Russian.
6. Kosolapova KN, Kolupaeva YuA. Osobennosti formirovaniya sxemy tela doskol'nikov s narusheniem funkci oporno-dvigatel'nogo apparata. Nauchno-metodicheskij ehlektronnyj zhurnal «Koncept». 2016; 17: 887–92. Dostupno po ssylke: <http://e-koncept.ru/2016/46352.htm>. Russian.
7. Levik YuS. Ispol'zovanie dopolnitel'nyx afferentnyx signalov sistemoy regulyatsii vertikal'noj pozy cheloveka. Fiziologiya cheloveka. 2007; 1 (34): 1–5. Russian.
8. Luriya AR. Vysshie korkovyie funkci cheloveka. SPb.: Piter, 2008; 624 s. Russian.
9. Mendelevich VD. Soloveva SL. Anticipacionnaya koncepciya nevrozogeneza. V knige: Nevrozologiya i psixosomaticheskaya medicina. M.: MEDpress-inform, 2002; 608: 45–98. Russian.
10. Nikishina VB, Petrash EA. Modifikatsiya metodiki «Avtoportret» s cel'yu izucheniya dissotsiatsii obraza «Ya». Voprosy psixologii. 2016; 3: 156–66. Russian.
11. Nikishina V. B., Lazarenko V. A., Petrash E. A., Axmetzyanova A. I. Narushenie sxemy tela pri meningiomax temenno-zatylochnoj oblasti. Zhurnal nevrologii i psixiatrii imeni S. S. Korsakova: Nauchno-prakticheskij recenziruemyj zhurnal. 2016; 116 (12): 20–24. Russian.
12. Polunina AG, Davydov DM. Viskonsinskij test sortirovki kartochek kak instrument ocenki kognitivnyx funkci. V knige: TB. Dmitrieva, redaktor. Social'naya psixiatriya. M.: Izd. GNC SSP im. V. P. Serbskogo, 2004; s. 217–36. Russian.
13. Skugarevskij OA, Sivuxa SV. Obraz sobstvennogo tela: razrabotka instrumenta dlya ocenki. Psixologicheskij zhurnal. 2006; 2 (10): 40–48. Russian.
14. Txostov AS. Psixologiya telesnosti. M.: Smysl. 2002. 287. Russian.
15. Xomskaya ED. Problema faktorov v nejropsixologii. V knige: ED. Xomskaya, redaktor. Nejropsixologicheskij analiz mezhpolutsharnoj asimmetrii mozga. M.: «Nauka», 1986; 23–33. Russian.
16. Shhedrina AG. Zdorovyj obraz zhizni: metodologicheskie, social'nye, biologicheskie, medicinskie, psixologicheskie, pedagogicheskie, ehkologicheskie aspekty. Novosibirsk: «Al'fa-Vista», 2007; 144 s. Russian.
17. Button EJ, Sonuga-Barke EJ, Davies J, Thompson M. A prospective study of self-esteem in the prediction of eating problems in adolescent schoolgirls: questionnaire findings. Br J Clin Psychol. 1996; 35 (2): 193–203. DOI: 10.1111/j.2044-8260.1996.tb01176.x. PMID: 8773797.
18. Isaacs E, Vargha-Khadem F. Differential course of development of spatial and verbal memory span: A normative study. British Journal of Developmental Psychology. 2011; 7: 377–80. DOI: 10.1111/j.2044-835X.1989.tb00814.x.
19. Gutiérrez-Martínez F, Ramos-Ortega M, Vila-Chaves J-Ó. Executive Effectiveness On Stroop Type Interference Tasks. A Validation Study of a Numerical and Manual Version (CANUM). Anales De Psicología. 2018; 34 (1). DOI: 10.6018/analesps.34.1.263431.
20. Laureys F, Middelbos L, Rommers N, et al. The effects of age, biological maturation and sex on the development of executive functions in adolescents. Frontiers in Physiology. 2021; (12). Art. 1453. DOI: 10.3389/fphys.2021.703312.
21. Mairs R, Nicholls D. Assessment and treatment of eating disorders in children and adolescents. Arch Dis Child. 2016; 101 (12): 1168–75. DOI: 10.1136/archdischild-2015-309481. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27381185.
22. Stuss DT, Knight RT, editors. Principles of Frontal Lobe Function. New York. 2002. online edn, Oxford Academic. 1 May 2009. Available from: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195134971.001.0001>.
23. Van Strien T, Oosterveld P. The children's DEBQ for assessment of restrained, emotional, and external eating in 7- to 12-year-old children. Int J Eat Disord. 2008; 41 (1): 72–81. DOI: 10.1002/eat.20424. PMID: 17634965.