

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, к. б. н.; Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Евгений Лукьянов

ПЕРЕВОДЧИКИ Надежда Тихомирова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
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 2022: 0,6

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.2024-03

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

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

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



Подписано в печать 30.06.2024
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

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

EDITORS Valentina Geidebrekht, PhD; Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobrinskii 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 2022: 0.6

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.2024-03

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

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

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



Approved for print 30.06.2024
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	4
Анализ экспрессии ИФН-стимулированных генов как инструмент для оптимизации терапии системной красной волчанки Т. О. Наконежная, И. А. Шагина, М. Ю. Мышкин, З. Ю. Мутовина, Е. В. Рязанцева, Д. М. Чудаков, М. А. Турчанинова, О. В. Британова	
Interferon signature in the development of SLE: molecular mechanisms, approaches to diagnosis and treatment Nakonechnaya TO, Shagina IA, Myshkin MYu, Mutovina ZYu, Ryazantseva EV, Chudakov DM, Turchaninova MA, Britanova OV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	13
Выявление микроглии и макрофагов с использованием антител к различным последовательностям белка Iba-1 В. А. Разенкова, О. В. Кирик, В. С. Павлова, Д. Э. Коржевский	
Identification of microglia and macrophages using antibodies to various sequences of the Iba-1 protein Razenkova VA, Kirik OV, Pavlova VS, Korzhevskii DE	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	20
Влияние туберкулеза на формирование иммунного ответа к SARS-CoV-2 Г. С. Шепелькова, Н. А. Черных, В. К. Косякова, С. С. Садовникова, А. Эргешов, В. В. Еремеев	
The impact of tuberculosis on the development of immune response to SARS-CoV-2 Shepelkova GS, Chernyh NA, Kosiakova VK, Sadovnikova SS, Ergeshov A, Yermeev VV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	27
Терапия рассеянного склероза препаратами первой линии: уровень цитокинов и влияние герпетической инфекции Н. С. Баранова, М. С. Грис, А. А. Баранов, Н. Н. Спирин, А. С. Артохов, Д. В. Киселев	
First line therapy for multiple sclerosis: cytokine levels and the impact of herpesvirus infection Baranova NS, Gris MS1, Baranov AA, Spirin NN, Artyuhov AS, Kiselev DV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	37
Когерентность ЭЭГ у детей с ДЦП на фоне реабилитации с применением нейроинтерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти» В. Б. Павленко, С. В. Власенко, Е. Н. Чуян, Д. В. Павленко, Л. С. Орехова, Е. А. Бирюкова	
EEG coherence in children with cerebral palsy against the background of rehabilitation employing a brain-computer-hand exoskeleton neurointerface Pavlenko VB, Vlasenko SV, Chuyan EN, Pavlenko DV, Orekhova LS, Birukova EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	44
Орфанная патология в Республике Северная Осетия – Алания: структура, популяционно-генетические особенности, проблемы и перспективы Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, Ю. В. Габисова, Е. Ю. Шукан, А. В. Хохова, А. В. Марахонов, С. И. Куцев	
Orphan diseases in the Republic of North Ossetia–Alania: structure, population genetic features, issues and prospects Zinchenko RA, Tebieva IS, Gabisova YuV, Shukan EYu, Khokhova AV, Marakhonov AV, Kutsev SI	
МНЕНИЕ	53
Потенциал неклассических клеточных культур для производства биотерапевтических белков М. А. Добронос, З. М. Осипова, Н. М. Мышкина	
Potential of non-traditional cell cultures for production of biotherapeutic proteins Dobronos MA, Osipova ZM, Myshkina NM	
МНЕНИЕ	58
Аспекты химии и патохимии хрусталика С. В. Смирнов, О. Ю. Кузнецова, М. А. Постников	
Aspects of the lens chemistry and pathochemistry Smirnov SV, Kuznetsova OYu, Postnikov MA	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	63
Тиамин-зависимая мегалобластная анемия (синдром Роджерса) у ребенка трех лет Т. В. Конюхова, Е. В. Трухина	
Thiamine responsive megaloblastic anemia (Rogers syndrome) in a three-year-old child Konyukhova TV, Trukhina EV	

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ИФН-СТИМУЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕРАПИИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

Т. О. Наконечная¹, И. А. Шагина^{2,3}, М. Ю. Мышкин^{2,3}, З. Ю. Мутвина⁴, Е. В. Рязанцева⁴, Д. М. Чудаков^{1,2}, М. А. Турчанинова^{2,3}, О. В. Британова^{2,3}✉

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

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

³ ООО МайЛаборатори, Москва, Россия

⁴ Отделение ревматологии Городской клинической больницы № 52 Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением соединительной ткани и поражением различных органов, включая суставы, кожу, почки и сердце. Заболевание демонстрирует значительную гендерную предрасположенность, чаще встречается у женщин. В основе патогенеза СКВ лежит нарушение иммунологической толерантности, сопровождающееся активацией В-лимфоцитов и продукцией аутоантител. Достижения последних лет в фундаментальных исследованиях значительно углубили понимание иммунопатогенетических механизмов СКВ, что обосновывает применение новых фармакотерапевтических подходов, в том числе использование биологических препаратов, направленных на блокировку активности интерферона (ИФН) типа I или его рецепторов. В статье рассмотрены молекулярные механизмы активации интерфероновой реакции при СКВ, современные методы диагностики интерфероновой сигнатуры и новые подходы к лечению, направленные на блокировку интерфероновой реакции. Обсуждается возможная роль интерфероновой сигнатуры для стратификации пациентов с СКВ. Стратификация позволит более точно подбирать терапевтические схемы, учитывая индивидуальные особенности иммунного ответа каждого пациента. Такой подход может повысить эффективность лечения, снизить вероятность развития побочных эффектов и улучшить прогноз для пациентов с СКВ.

Ключевые слова: системная красная волчанка, интерфероновая сигнатура, анифролумаб

Финансирование: исследование выполнено на средства гранта Правительства Москвы (НИР № 2412-63/22-1 НИР от 13.05.2022), спонсор — АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении».

Вклад авторов: М. Ю. Мышкин — анализ литературы; З. Ю. Мутвина, И. А. Шагина — сбор данных в сфере ревматологии и медицины; Д. М. Чудаков — концепция, М. А. Турчанинова — анализ и интерпретация данных; О. В. Британова, Т. О. Наконечная — анализ литературы и подготовка рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Владимировна Британова
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, 117997, г. Москва, Россия; olbritan@gmail.com

Статья получена: 24.06.2024 **Статья принята к печати:** 28.06.2024 **Опубликована онлайн:** 30.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.027

INTERFERON SIGNATURE IN THE DEVELOPMENT OF SLE: MOLECULAR MECHANISMS, APPROACHES TO DIAGNOSIS AND TREATMENT

Nakonechnaya TO¹, Shagina IA^{2,3}, Myshkin MYu^{2,3}, Mutovina ZYu⁴, Ryazantseva EV⁴, Chudakov DM^{1,2}, Turchaninova MA^{2,3}, Britanova OV^{2,3}✉

¹ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ LLC MiLaboratory, Moscow, Russia

⁴ Department of Rheumatology, City Clinical Hospital No. 52 of the Department of Health, Moscow, Russia

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterized by inflammation of connective tissue and damage to various organs, including joints, skin, kidneys and heart. The disease has a significant gender predisposition and is more common in women. The pathogenesis of SLE is based on a violation of immunological tolerance, accompanied by activation of B lymphocytes and the production of autoantibodies. Recent advances in basic research have significantly deepened the understanding of the immunopathogenetic mechanisms of SLE, which justifies the use of new pharmacotherapeutic approaches. These approaches involve the use of biological drugs aimed at blocking the activity of type I interferon (IFN) or its receptors. The article discusses the molecular mechanisms of activation of the interferon response in SLE, modern methods for diagnosing the interferon signature, and new approaches to treatment aimed at blocking the interferon pathway. The possible role of the interferon signature in the stratification of SLE patients is also discussed. Such stratification will make it possible to more effectively select treatment regimens taking into account the individual characteristics of the immune response of each patient. This may increase the effectiveness of treatment, reduce the likelihood of side effects and improve the prognosis for patients with SLE.

Keywords: systemic lupus erythematosus, interferon signature, anifrolumab

Financing: the study was supported by a grant from the Moscow Government (NIP No. 2412-63/22-1 dated May 13, 2022), sponsored by the Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare.

Author contribution: Myshkin MYu — literature analysis; Mutovina ZYu, Shagina IA — data collection in the field of rheumatology and medicine; Chudakov DM — concept, Turchaninova MA — analysis and interpretation of scientific data; Ryazantseva EV, Kazhdan MA — manuscript proofreading, Britanova OV, Nakonechnaya TO — literature analysis and manuscript preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Britanova.
Miklouho-Maklaya, s. 16/10, 117997, Moscow, Russia; olbritan@gmail.com

Received: 24.06.2024 **Accepted:** 28.06.2024 **Published online:** 30.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.027

Эпидемиологическая актуальность

Заболеваемость СКВ варьирует от 4 до 250 случаев на 100 000 населения, отмечается значительная зависимость

заболеваемости от региона, этнического состава населения, пола и возраста [1, 23].

Риск заболевания СКВ у женщин выше, чем у мужчин, в 8–10 раз, у женщин риск более высокий в репродуктивном



Рис. 1. Схема развития системной красной волчанки

возрасте 16–25 лет, при этом активность СКВ повышается во время беременности и в послеродовом периоде [1–3].

Смертность при СКВ в 4–5 раза выше, чем у популяции в целом, основными причинами смерти пациентов с СКВ выступают инфекции (30%), нервно-психические нарушения (15%), почечная недостаточность (14%) и сердечно-легочное поражение (8%) [1].

Краткий обзор заболевания

Системная красная волчанка (СКВ) — это аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система человека воспринимает клетки соединительной ткани хозяина как чужеродные [4]. Центральный механизм иммунопатологии СКВ — нарушение иммунологической толерантности, приводящей к неконтролируемой активации В-клеточного иммунного ответа, развитие которой определяется комбинацией генетической и эпигенетической предрасположенности, факторов внешней среды (ультрафиолетовое облучение, вирусные инфекции и др.) и кишечного дисбиоза [5]. Дендритные клетки играют центральную роль в выработке интерферона I типа и влияют на клиренс и чувствительность нуклеиновых кислот (НК) и иммунных комплексов, известных аутоантигенов при волчанке (рис. 1). Фактически, эндогенные и внешние нуклеиновые кислоты являются основным антигенным стимулом при волчанке. Аутоантитела, нацеленные на антигены, связанные с нуклеиновыми кислотами, являются одним из отличительных признаков заболевания. Апоптоз и нетоз (NET) могут быть основным источником таких антигенов. Избыточная и нарушенная деградация NET связана с тяжестью волчанки, волчаночным нефритом, антителами против дцДНК и потреблением комплемента.

Стратегической целью лечения СКВ является достижение состояния ремиссии или низкой активности [6–8].

Несмотря на увеличение продолжительности жизни пациентов с СКВ, связанной в первую очередь с совершенствованием тактики применения глюкокортикоидов (ГК) и иммуносупрессивных препаратов, частота летальных исходов остается высокой, а адекватный контроль активности заболевания достигается не более чем у половины пациентов [9]. Прогресс фундаментальных исследований, способствующий лучшему пониманию механизмов патогенеза СКВ, послужил теоретическим обоснованием для разработки широкого спектра новых подходов к фармакотерапии СКВ [8, 10, 11].

Диагностика СКВ

В клинической практике для диагностики СКВ оцениваются клинические жалобы и проявления в совокупности с гематологическими и иммунологическими нарушениями [12].

В 2012 г. были разработаны диагностические критерии SLICC/ACR для СКВ: диагноз считается установленным при наличии четырех критериев, из которых один критерий должен быть обязательно клиническим и один — иммунологическим.

Для классификации СКВ используют критерии EULAR/ACR (2019 г.) [13], чувствительность и специфичность которых к СКВ составляет 96,1% на 93,4% [14].

Участие Т- и В-лимфоцитов в патогенезе СКВ

Причины, вызывающие СКВ у взрослых, могут быть различными, в том числе генетические, гормональный сбой, перенесенная инфекция и влияние факторов окружающей среды. Часто при СКВ наблюдается повышенная циркуляция апоптотических телец, образующихся после клеточной гибели. Поглощение телец дендритными

или В-клетками может приводить к представлению аутоантигенов на их поверхности в комплексе МНС класса II, что в результате вызывает нарушение толерантности Т-клеток и усиливает воспаление.

В исследовании с участием 41 пациента с активной формой СКВ и 101 здорового донора было показано, что при СКВ значительно повышена доля Т-клеток как $CD4^+CD28^-$, так и $CD8^+CD38^+HLA-DR^+$, обладающих эффекторной активностью [15]. Наблюдается сдвиг в сторону Th17-воспалительного ответа [16] с понижением доли Treg [16, 17].

В мононуклеарной фракции крови обнаруживается повышенный уровень экспрессии интерферон-индуцированных генов или интерфероновой «сигнатуры» I типа, что подтверждает ключевую роль врожденной иммунной системы в патогенезе СКВ [18, 19]. По некоторым данным, повышенная интерфероновая (ИФН) сигнатура типа I обнаруживается примерно у 75% взрослых пациентов и 90% педиатрических пациентов [20].

Роль интерферонов в развитии заболевания

В последнее время особое внимание при развитии СКВ уделяется нарушениям регуляции продукции интерферонов [12, 21, 22].

Интерферон — это цитокин, вырабатываемый в нормальных условиях в ответ на вирусную инфекцию и обладающий различными эффектами, такими как регулирование иммунитета, противовирусная и противоопухолевая активность. В зависимости от последовательности первичного белка, родственного рецептора, локуса гена и типа клеток, ответственных за его продукцию, ИФН в основном подразделяются на три типа:

- ИФН типа I (ИФН- α и ИФН- β , - ϵ , - κ и - ω);
- ИФН типа II (ИФН- γ);
- ИФН типа III (ИФН- λ).

Многие исследования показали доминирование ИФН- α при СКВ, но есть данные, что сигнатура ИФН- γ может возникать на ранних стадиях СКВ и играть важную роль в развитии волчаночного нефрита (ВН) [23], и в целом уровень ИФН- γ в сыворотке больных СКВ выше, чем у здоровых лиц [24, 25], а в организме происходит аномальное накопление ИФН- γ задолго до диагностики СКВ и до появления аутоантител к ИФН- α .

Также показано, что уровни ИФН- γ и связанных с ним генов тесно связаны с активацией ИФН типа I у пациентов с СКВ [26, 27].

ИФН- γ представляет собой плейотропный ИФН типа II, который в основном продуцируется эффекторными Th1 $CD4^+$ -Т-клетками, цитотоксическими $CD8^+$ -Т-клетками и NK-клетками и в меньшей степени другими типами клеток, такими как дендритные клетки (ДК), макрофаги и В-клетки [28]. ИФН- γ связывается с рецептором ИФН- γ (ИФНГ- R), который экспрессируется на большинстве клеток и активирует янус-киназу 1 (JAK1) и JAK2 по каноническому пути, что приводит к фосфорилированию гомодимеров STAT1 и связыванию с сайтом активации ИФН- γ (GAS) с последующей транскрипцией гена [29]. Кроме того, ИФН- γ также может играть роль в передаче сигнала неканоническими путями. Существует значительное перекрытие (перекрестные помехи) между индуцируемыми генами типа I и типа II, и сигнальные пути могут быть общими между ними. Каждый тип интерферона индуцирует выработку другого, что в

конечном счете приводит к стимуляции с обеих сторон и смешанной сигнатуре [29].

ИФН- α представляют собой плейотропные цитокины, относящиеся к ИФН типа I, широко используемые при лечении пациентов с некоторыми видами рака и вирусными заболеваниями. ИФН- α может влиять на функции опухолевых клеток посредством нескольких механизмов. Кроме того, эти цитокины могут способствовать дифференцировке и активности иммунных клеток хозяина.

ИФН типа I имеет критическое значение для организма. В регуляции сигнатуры ИФН типа I принимают участие не менее чем 10% генов организма человека, экспрессия которых зависит от типа клеток, распределения клеточных рецепторов и характера активационных стимулов [30]. В то время как на фоне вирусных инфекций контролируемый синтез ИФН типа I участвует в поддержании иммунного гомеостаза через индукцию дифференцировки В-клеток в плазматические клетки, синтезирующих антивирусные антитела и генерацию В-регуляторных клеток, при СКВ отмечается перманентная гиперпродукция ИФН типа I.

Плазмацитоидные дендритные клетки (пДК) находятся в центре внимания при СКВ [31]. Хотя практически все ядросодержащие клетки обладают способностью синтезировать и активироваться под действием ИФН типа I, его основным источником являются именно пДК, которые генерируют его в 1000 раз сильнее, чем другие клетки. Каждая пДК может продуцировать до 10^9 молекул ИФН- α за 12 ч. Эта поразительная особенность, наряду с перекосом ИФН I типа крови в сторону ИФН- α по сравнению с ИФН- β при СКВ, что подтверждает пДК как основные клеточные источники ИФН- α при СКВ. Соответственно, было показано, что дефицит пДК улучшает течение заболевания на мышиных моделях [32, 33]. Хотя другие типы клеток, включая макрофаги и фибробласты, также являются источником ИФН I типа, эти клетки преимущественно синтезируют ИФН- β . Однако выделение ИФН- α -продуцирующих пДК из крови и тканей пациентов с СКВ остается сложной задачей.

Ведущий механизм активации синтеза ИФН типа I при СКВ связан с нарушением клиренса нуклеиновых кислот (НК).

Продукция ИФН типа I в основном запускается активацией рецепторов, связывающихся с НК, которые высвобождаются из подвергнутых апоптозу и некрозу (NET) клеток. Группа НК-связывающих рецепторов включает эндосомальные toll-подобные рецепторы (TLR) 3, 4, 7 и 9, цитозольную сенсорную циклическую GMP-AMP-синтазу (сGAS) и PHK-сенсорные RIG-I-подобные рецепторы (RLR)-MAVS34. В нормальных условиях эти пути детекции НК подлежат строгой регуляции и необходимы для формирования соответствующего противовирусного ответа [34, 35], однако у многих больных СКВ наблюдается хроническая гиперактивность этих путей. НК и сами по себе могут вызывать продукцию ИФН, а могут включаться в так называемые «интерферогенные» иммунные комплексы (ИК). Интерферогенные ИК — это комплексы, состоящие из НК, НК-связывающих белков и антиядерных антител.

Нарушению клиренса и образованию комплексов способствует как усиление NETs, весьма характерное для СКВ, так и ослабление функции внеклеточной ДНКазы I. В свою очередь НК и ИК, связываясь с TLR7 и TLR9, локализованными в эндосомах пДК, индуцируют синтез ИФН типа I (рис. 2). Роль TLR7 при СКВ хорошо известна, поскольку его сверхэкспрессия связана с тяжелой формой волчанки у мышей, а ингибирование TLR7 является защитным [36].

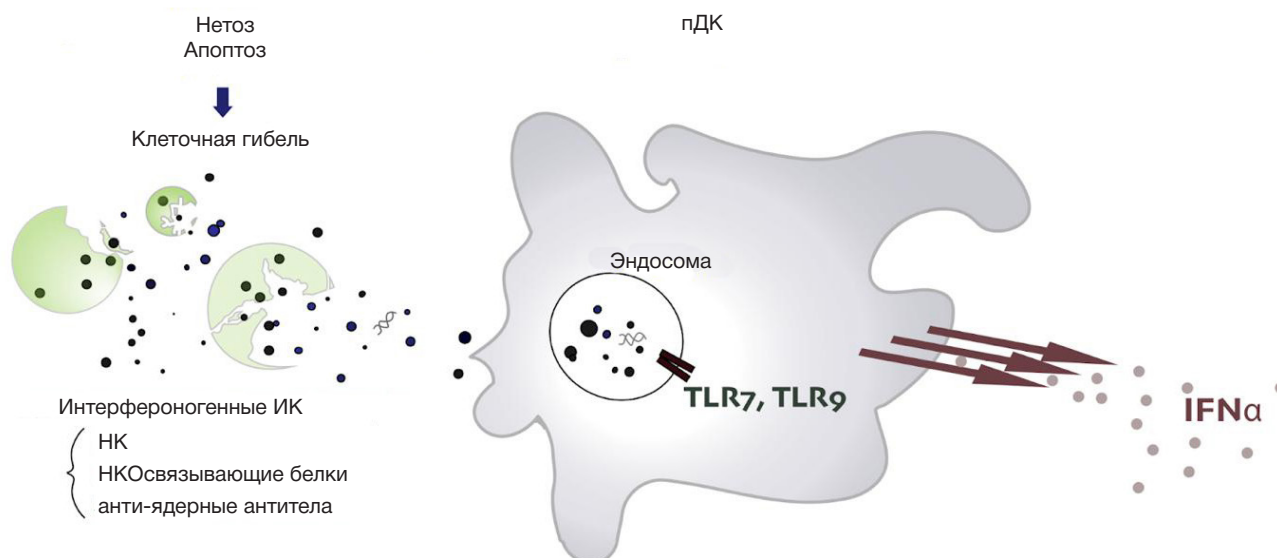


Рис. 2. Схема выработки интерферона типа I

В качестве дополнительных стимулов для синтеза ИФН типа I выступают митохондриальная ДНК, комплекс, состоящий из катионного антимикробного пептида LL37 и ДНК, и белок HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1).

Исследование интерферонов и интерфероновых сигнатур в клинике

Разработаны высокочувствительные методы определения самого ИФН-α в сыворотке крови, результаты которого в целом коррелируют с параметрами экспрессии генов ИФН типа I [34, 37].

В клинических исследованиях оценка гиперпродукции ИФН типа I основывается на анализе интерфероновых сигнатур [38] по экспрессии определенного спектра генов (IFI27, IFI44, IFI44L, RSAD2 и др.) с использованием ПЦР в реальном времени. Среди других распространенных подходов измерения интерфероновой сигнатуры можно отметить технологии микрочипов и высокочувствительной системы NanoString с использованием зондов, что позволяет провести анализ десятков генов [39].

Так как гиперактивация сигнальной системы ИФН типа I является показателем не только СКВ, ведутся разработки оценки ИФН сигнатуры и в РФ [40–42].

Запатентована многопараметрическая диагностическая тест-система, которая может быть использована для количественного определения уровня экспрессии генов RIG-1, IFIT-1, IFIH-1 человека в биологическом образце [43].

Остается нерешенным вопрос о необходимом и достаточном наборе генов, уровень экспрессии которых стоит оценивать, а также унифицированный способ подсчета интерферонового индекса.

Следует подчеркнуть, что результаты методов определения интерфероновой сигнатуры зависят от композиции исследуемых клеток (цельная кровь, отдельные клеточные популяции) и числа исследуемых генов ИФН типа I. Кроме того, отмечается значительный перекрест экспрессии генов, индуцируемых ИФН типа I, II и III.

Имеются данные о том, что экспрессия некоторых ИФН-отвечающих генов может отражать активность СКВ [44, 45], но это не нашло подтверждения в более поздних исследованиях [46]. Установлено, что гиперпродукция

ИФН-α ассоциируется с обнаружением «волчаночных» аутоантител, в первую очередь к РНК-содержащим антигенам [47–51], но их уровень не коррелирует с активностью СКВ и не меняется на фоне терапии.

Примечательно, что при СКВ присутствуют естественные аутоантитела к ИФН типа I — как правило, у пациентов с низкой активностью заболевания [52], а при COVID-19 — напротив, у пациентов с тяжелым течением инфекции [53]. Эти данные отражают важную роль ИФН типа I в развитии эффективного противовирусного иммунного ответа у пациентов с COVID-19 и создают предпосылки для расшифровки механизмов взаимосвязи между вирусной инфекцией и аутоиммунитетом в целом.

Примечательно, что гиперпродукцию ИФН типа I при СКВ ассоциируют с развитием широкого спектра клинических проявлений, с одной стороны, наблюдаемых при вирусных инфекциях, а с другой стороны — характерных для СКВ. К ним относятся лихорадка, слабость, миалгии, артралгии, головные боли, плеврит, а также гематологические нарушения (анемия, нейтропения, лимфопения, тромбоцитопения), поражение кожи, суставов, почек и центральной нервной системы (ЦНС). Например, при исследовании биопатов органов-мишеней, полученных от пациентов с СКВ, оказалось, что повышенная ИФН сигнатура коррелирует с активностью поражения кожи [54, 55], выявляется в синовиальной ткани у пациентов с артритом [56], в ткани почек при волчаночном нефрите [57], а увеличение концентрации ИФН-α в спинномозговой жидкости отмечено у пациентов с поражением центральной нервной системы [58].

В недавнем международном исследовании SPOCS (SLE Prospective Observational Cohort Study) были охарактеризованы пациенты с высокой активностью заболевания и/или повышенным уровнем ИФН типа I. Было показано, пациенты с высоким уровнем ИФН сигнатуры, во-первых, моложе по возрасту и относятся к недавно диагностированным пациентам, а во-вторых, у таких пациентов преобладали кожные, иммунологические и гематологические проявления по сравнению с пациентами с низким уровнем ИФН типа I [59].

Интерфероны в фармакотерапии СКВ

Комплекс данных, полученных в процессе фундаментальных и клинических исследований, послужил основанием для

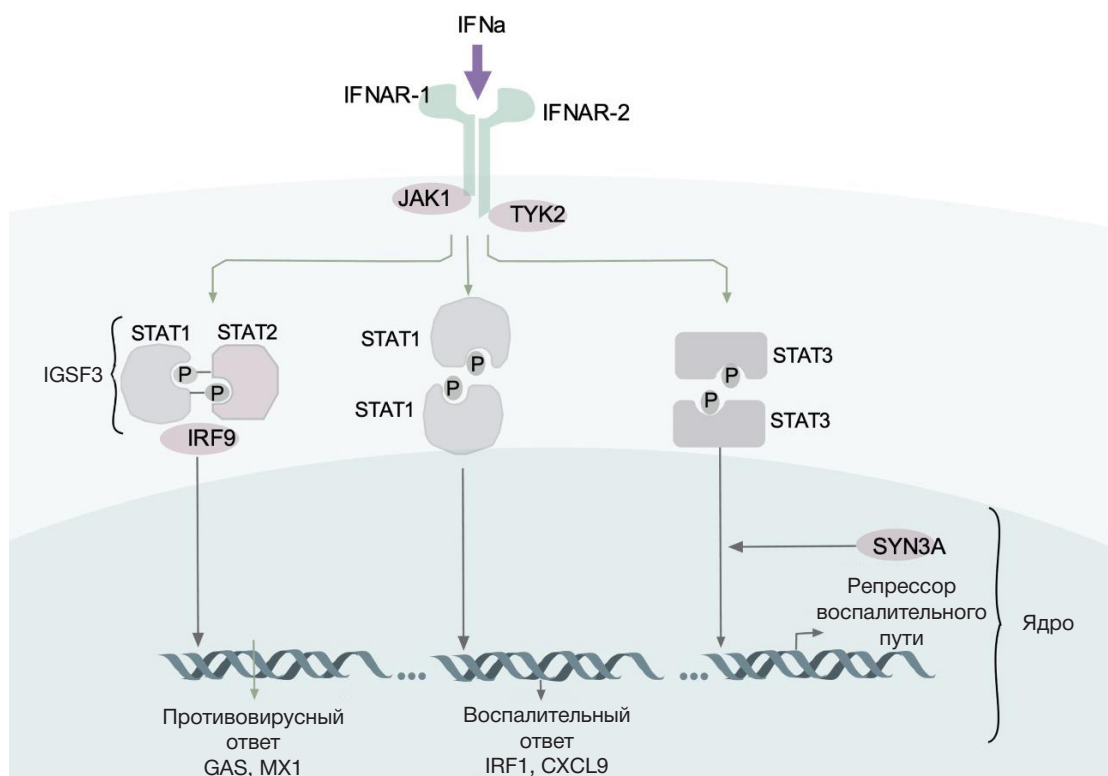


Рис. 3. Сигнальный путь ИФН типа I: IGSF3 — ИФН-стимулированный фактор 3; ISRE — ИФН-стимулированный ответ; IRF9 — ИФН-регулирующий фактор 9; GAS — гамма-активированная последовательность; SIN3A-SIN3 — гомолог регулятора транскрипции; CXCL9 — лиганд 9 CXC хемокинов; JAD — 2'5'-олигоденилатсинтетаза; MX1 — ИФН-индуцированный GTP-связывающий белок 1; P — фосфат [66]

разработки нового подхода к фармакотерапии СКВ, связанного с использованием моноклональных антител (мАТ), блокирующих активность ИФН типа I или его рецепторов [60–62] (рис. 3).

В настоящее время для блокировки ИФН типа I при СКВ используется несколько биологических препаратов. Перечислим основные из них.

1. Анакинра (Anakinra): Рекомбинантный антагонист рецепторов интерлейкина-1 (IL1), может ингибировать сигнальные пути, активируемые интерферонами. Клинические данные по его эффективности при СКВ ограничены, но в некоторых исследованиях отмечается улучшение у пациентов с рефрактерными формами заболевания. Ответ на терапию может варьироваться.

2. Анаксифумаб (Anifrolumab): моноклональное антитело, блокирует рецептор интерферона I типа (IFNAR1 (Interferon Alpha And Beta Receptor Subunit 1)). Анаксифумаб предназначен для снижения активности сигнального пути интерферонов I типа. В исследованиях фазы III (TULIP-1 и TULIP-2) анаксифумаб продемонстрировал значительное улучшение у пациентов с СКВ. В TULIP-2 улучшение по индексу SRI-4 (Systemic Lupus Erythematosus Responder Index) наблюдалось у 47,8% пациентов, получавших анаксифумаб, по сравнению с 31,5% в группе плацебо.

3. Белимумаб (Belimumab): хотя белимумаб в первую очередь направлен на ингибирование В-лимфоцитов, он также оказывает влияние на сигнальные пути, связанные с интерферонами, и может снижать их активность. Белимумаб получил широкое признание и одобрение для лечения СКВ. В клинических исследованиях фазы III (BLISS-52 и BLISS-76) примерно 43–58% пациентов показали значительное улучшение по сравнению с 34–44% в группе плацебо.

В ряду этих препаратов особое место занимают анифролумаб (АФМ) [63, 64] и белимумаб [65].

АФМ индуцирует интернализацию IFNAR1, тем самым снижая его мембранную экспрессию, необходимую для сборки функционального ИФН-рецептора, состоящего из двух субъединиц — IFNAR1 и IFNAR2. Молекула АФМ специально сконструирована с тройной мутацией L234F/L235E/P331S в гене тяжелой цепи иммуноглобулина, что приводит к снижению связывания молекул АФМ с мембранными клеточными Fc-рецепторами. В результате при введении в организм человека АФМ не обладает способностью индуцировать антитело-зависимую и комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность, что снижает риск развития инфузионных реакций.

При изучении механизмов действия АФМ было показано, что блокада IFNAR1-опосредованной сигнализации ассоциируется с широким спектром молекулярных и клеточных эффектов: подавление экспрессии ИФН-индуцированных генов; фосфорилирование STAT I (signal transducer and activator of transcription); синтез ИФН типа I и провоспалительных цитокинов; гиперэкспрессия молекул ко-стимуляции на мембране пДК; дифференцировка пДК и В-клеток [66]. Отмечено снижение концентрации TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), увеличение которого ранее обнаружено при СКВ [67], а также IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) и програнулина (регулируют рекрутирование иммунных клеток в зону воспаления), ассоциирующихся с активностью СКВ [68, 69].

К другим важным эффектам АФМ следует отнести нормализацию концентрации В-клеточных цитокинов, таких как BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family), в регуляции синтеза которого участвует ИФН типа I [70]. На фоне лечения АФМ у пациентов с СКВ наблюдается быстрая нормализация уровня лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и тромбоцитов, циркулирующих CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток и В-клеток памяти. Примечательно, что мАТ к BAFF (белимумаб), которые с успехом применяются

при СКВ [65], вызывают снижение уровня наивных и «переключенных» В-клеток, но не влияют на В-клетки памяти [71]. Отмечена тенденция к нормализации уровня антител к двуспиральной (дс) ДНК (анти-дсДНК) и компонентов комплемента (С3, С4, СН50).

Кроме того, у подавляющего большинства пациентов с СКВ лечение АФМ ассоциировалось с подавлением базальной экспрессии ИФН сигнатуры. Так, через 24 недели средний уровень индекса супрессии 21 гена, характеризующих сигнатуру, составил 89,7% при дозе АФМ 300 мг каждые 4 недели и 91,7% при дозе АФМ 1000 мг каждые 4 недели. При этом подавление сигнатуры ИФН типа I у пациентов с исходной гиперэкспрессией этих генов выявлялось уже через 12 недель и сохранялось в течение 52 недель [72]. В дополнение к стандартному лечению АФМ может снизить потребность в кортикостероидах

и снизить активность волчанки, особенно кожных и скелетно-мышечных проявлений, и при этом препарат имеет приемлемый профиль безопасности [73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В совокупности, полученные на сегодняшний день данные указывают на целесообразность исследования уровня экспрессии ИФН-индуцированных генов, например, с помощью ПЦР тест-системы, как в случае СКВ, так и при некоторых других системных воспалительных заболеваниях. Такое исследование должно существенно оптимизировать стратификацию пациентов с СКВ, позволяя заменить другие терапевтические подходы таргетной блокадой ИФН типа I для пациентов с высокой ИФН сигнатурой, а также расширить спектр заболеваний для применения такой терапии.

Литература

1. Попкова Т. В., Панафидина Т. А., Герасимова Е. В., Лиля А. М. Системная красная волчанка: диагностика, лечение, мониторинг для специалистов первичного звена: врач-терапевтов, врачей общей практики. Методические рекомендации ФГБУ Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой. 2022.
2. Tian J, Zhang D, Yao X, Huang Y, Lu, Q. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Ann Rheum Dis.* 2023; (82): 351–56.
3. Izmirly PM, et al. Incidence rates of systemic lupus erythematosus in the USA: estimates from a meta-analysis of the Centers for Disease Control and Prevention national lupus registries. *Lupus Sci Med.* 2021; (8): e000614.
4. Kaul A, Gordon C, Crow MK, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2: 16039
5. Kiriakidou M, Ching CL. Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Intern Med.* 2020; (172): ITC81–ITC96.
6. Fanouriakis A, Bertsias G. Changing paradigms in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med.* 2019; (6): e000310.
7. Durcan L, O'Dwyer T, Petri, M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. *The Lancet.* 2019; (393): 2332–43.
8. Соловьев С. К., Асеева Е. А., Попкова Т. В., Лиля А. М., Мазуров В. И., Насонов Е. Л. Системная красная волчанка: новые горизонты диагностики и терапии. *Научно-практическая ревматология.* 2020; 58 (1): 5–14.
9. Jorge AM, Lu N, Zhang Y, Rai SK, Choi HK. Unchanging premature mortality trends in systemic lupus erythematosus: a general population-based study (1999–2014). *Rheumatology.* 2018; (57): 337–44.
10. Gatto M, Zen M, Iaccarino L, Doria A. New therapeutic strategies in systemic lupus erythematosus management. *Nat Rev Rheumatol.* 2019; (15): 30–48.
11. Dörner T, Furie R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. *The Lancet.* 2019; (393): 2344–58.
12. Nasonov EL, Avdeeva AS. Immunoinflammatory rheumatic diseases associated with type I interferon: new evidence. *Rheumatology Science and Practice.* 2019; (57): 452–61.
13. Aringer M, et al. 2019 European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2019; (78): 1151–9.
14. Siegel CH, Sammaritano LR. Systemic Lupus Erythematosus. *JAMA.* 2024; (331): 1480.
15. Yuan S, et al. Phenotypical changes and clinical significance of CD4+/CD8+ T cells in SLE. *Lupus Sci Med.* 2022; (9): e000660.
16. Shan J, Jin H, Xu Y. T Cell Metabolism: A New Perspective on Th17/Treg Cell Imbalance in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2020; (11).
17. Tsai Y-G, et al. Pathogenesis and novel therapeutics of regulatory T cell subsets and interleukin-2 therapy in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2023; (14).
18. Baechler EC, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003; (100): 2610–5.
19. Kirou KA, et al. Coordinate overexpression of interferon- α -induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004; (50): 3958–67.
20. Londe AC, Fernandez-Ruiz R, Julio PR, Appenzeller S, Niewold TB. Type I Interferons in Autoimmunity: Implications in Clinical Phenotypes and Treatment Response. *J Rheumatol.* 2023; (50): 1103–13.
21. Crow MK, Olieriev M, Kirou KA. Type I Interferons in Autoimmune Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2019; (14): 369–93.
22. Rönnblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Sci Med.* 2019; (6): e000270.
23. Fava A, et al. Integrated urine proteomics and renal single-cell genomics identify an IFN- γ response gradient in lupus nephritis. *JCI Insight.* 2020; (5).
24. Viallard JF, et al. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 2001; (115): 189–95.
25. Yang B-C, Wang Y-S, Lin L-C, Liu M-F. Induction of Apoptosis and Cytokine Gene Expression in T-ell Lines by Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Immunol.* 1997; (45): 96–102.
26. Greene JA, DeVecchio JL, Gould MP, Auletta JJ, Heinzel FP. In vivo and In vitro Regulation of Type I IFN Synthesis by Synergistic Effects of CD40 and Type II IFN. *The Journal of Immunology.* 2006; (176): 5995–6003.
27. Weihua X, Ling W, Kalvakolanu D. Regulation of interferon- α/β -stimulated gene expression through the gamma-activated transcriptional element. *Antiviral Res.* 1990; (40): 145–53.
28. Tan EM, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; (25): 1271–7.
29. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; (40): 1725.
30. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol.* 2019; (6): 567–84.
31. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity.* 2019; (50): 37–50.
32. Baccala R, et al. Essential requirement for IRF8 and SLC15A4 implicates plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013; (110): 2940–5.

33. Sisirak V, et al. Genetic evidence for the role of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine*. 2014; (211): 1969–76.
34. Crowl JT, Gray EE, Pestal K, Volkman HE, Stetson DB. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2017; (35): 313–36.
35. Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol*. 2016; (16): 566–80.
36. Kono DH, Baccala R, Theofilopoulos AN. TLRs and interferons: a central paradigm in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2013; (25): 720–27.
37. Mathian A, et al. Ultrasensitive serum interferon- α quantification during SLE remission identifies patients at risk for relapse. *Ann Rheum Dis*. 2019; (78): 1669–76.
38. Miyamoto, Takayuki et al. Assessment of type I interferon signatures in undifferentiated inflammatory diseases: A Japanese multicenter experience. *Frontiers in Immunology*, 2022; (13): 905960.
39. Kim H, et al. Development of a Validated Interferon Score Using NanoString Technology. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2018; (38): 171–85.
40. Суспицын Е. Н., Раупов Р. К., Кучинская Е. М. & Костик М. М. Анализ профиля экспрессии интерферон-зависимых генов для дифференциальной диагностики заболеваний иммунной системы (обзор литературы). *Клиническая Лабораторная Диагностика*. 2021; 279–84.
41. Raupov R, Suspitsin E, Preobrazhenskaya EV, Kostik M. Interferon type I signature associated with skin disease in juvenile dermatomyositis. *Front Med (Lausanne)*. 2024; (11).
42. Suspitsin EN, Raupov RK, Kuchinskaya EM, Kostik MM. Analysis of interferon type I signature for differential diagnosis of diseases of the immune system (review of literature). *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021; (66): 279–84.
43. Васин А. В., Плотнокова М. А., Клотченко С. А., Голиханданова Н. Е., Ложков А. А., авторы; ФГАОУ ВО «СПбПУ», патентообладатель. Многопараметрическая диагностическая тест-система для количественного определения уровня мРНК генов *rig-1*, *ifit-1*, *ifih-1* человека. Патент «RU 2782428».
44. Banchereau R, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell*. 2016; (165): 551–65.
45. Chiche L; et al. Modular Transcriptional Repertoire Analyses of Adults With Systemic Lupus Erythematosus Reveal Distinct Type I and Type II Interferon Signatures. *Arthritis & Rheumatology*. 2014; (66): 1583–95.
46. Petri M, et al. Association between changes in gene signatures expression and disease activity among patients with systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genomics*. 2019; (12): 4.
47. Weckerle CE, et al. Network analysis of associations between serum interferon- α activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011; (63): 1044–53.
48. Feng X, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006; (54): 2951–62.
49. Wither J, et al. Presence of an interferon signature in individuals who are anti-nuclear antibody positive lacking a systemic autoimmune rheumatic disease diagnosis. *Arthritis Res Ther*. 2017; (19): 41.
50. Hua J, Kirou K, Lee C, Crow MK. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies. *Arthritis Rheum*. 2006; (54): 1906–16.
51. Kennedy WP, et al. Association of the interferon signature metric with serological disease manifestations but not global activity scores in multiple cohorts of patients with SLE. *Lupus Sci Med*. 2015; (2): e000080–e000080.
52. Bradford HF, et al. Inactive disease in patients with lupus is linked to autoantibodies to type I interferons that normalize blood IFN α and B cell subsets. *Cell Rep Med*. 2023; (4): 100894.
53. Bastard P, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020; (370).
54. Sarkar MK, et al. Photosensitivity and type I IFN responses in cutaneous lupus are driven by epidermal-derived interferon kappa. *Ann Rheum Dis*. 2018; (77): 1653–64.
55. Braunstein I, Klein R, Okawa J, Werth VP. The interferon-regulated gene signature is elevated in subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus and correlates with the cutaneous lupus area and severity index score. *British Journal of Dermatology*. 2012; (166): 971–5.
56. Toukap AN, et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007; (56): 1579–88.
57. Castellano G, et al. Local synthesis of interferon-alpha in lupus nephritis is associated with type I interferons signature and LMP7 induction in renal tubular epithelial cells. *Arthritis Res Ther*. 2015; (17): 72.
58. Shiozawa S, Kuroki Y, Kim M, Hirohata S, Ogino T. Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum*. 1992; (35): 417–22.
59. Arnaud L, et al. Burden of systemic lupus erythematosus in clinical practice: baseline data from the SLE Prospective Observational Cohort Study (SPOCS) by interferon gene signature. *Lupus Sci Med*. 2023; (10): e001032.
60. Paredes JL, Niewold TB. Type I interferon antagonists in clinical development for lupus. *Expert Opin Investig Drugs*. 2020; (29): 1025–41.
61. Chaichian Y, Strand V. Interferon-directed therapies for the treatment of systemic lupus erythematosus: a critical update. *Clin Rheumatol*. 2021; (40): 3027–37.
62. Goulden B, Isenberg D. Anti-IFN α R Mabs for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Biol Ther*. 2021; (21): 519–28.
63. Peng L, Oganessian V, Wu H, Dall'Acqua WF, Damschroder MM. Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon- α receptor 1 antibody. *Mabs*. 2015; (7): 428–39.
64. Riggs JM, et al. Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med*. 2018; (5): e000261.
65. Насонов Е. Л., Попкова Т. В., Лиля А. М. Белимумаб в лечении системной красной волчанки: 20 лет фундаментальных исследований, 10 лет клинической практики. *Научно-практическая ревматология*. 2021; 59 (4): 367–83.
66. Casey KA, et al. Type I interferon receptor blockade with anifrolumab corrects innate and adaptive immune perturbations of SLE. *Lupus Sci Med*. 2018; (5): e000286.
67. Lub-de Hooge, M. N. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005; (64): 854–8.
68. Tanaka A, et al. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2012; (14): R244.
69. Bauer JW, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis Rheum*. 2009; (60): 3098–107.
70. Sjöstrand M, et al. The Expression of BAFF Is Controlled by IRF Transcription Factors. *The Journal of Immunology*. 2016; (196): 91–96.
71. Jacobi AM, et al. Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: Extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum*. 2010; (62): 201–10.
72. Furie RA, et al. Type I interferon inhibitor anifrolumab in active systemic lupus erythematosus (TULIP-1): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Rheumatol*. 2019; (1): e208–e219.
73. Loncharich MF, Robertson I. Anifrolumab in systemic lupus erythematosus. *Drugs of Today*. 2023; (59): 53–61.

References

- Popkova TV, Panafidina TA, Gerasimova EV, Lila AM. Cisternaja krasnaja volchanka: diagnostika, lechenie, monitoring dlja specialistov pervichnogo zvena: vrachej-terapevtov, vrachej obshej praktiki. Metodicheskie rekomendacii FGBU Nauchno-issledovatel'skij institut revmatologii imeni V. A. Nasonovoj. 2022. Russian.
- Tian J, Zhang D, Yao X, Huang Y, Lu, Q. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Ann Rheum Dis.* 2023; (82): 351–56.
- Izmirly PM, et al. Incidence rates of systemic lupus erythematosus in the USA: estimates from a meta-analysis of the Centers for Disease Control and Prevention national lupus registries. *Lupus Sci Med.* 2021; (8): e000614.
- Kaul A, Gordon C, Crow MK, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2: 16039.
- Kiriakidou M, Ching CL. Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Intern Med.* 2020; (172): ITC81–ITC96.
- Fanourakis A, Bertsias G. Changing paradigms in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med.* 2019; (6): e000310.
- Durcan L, O'Dwyer T, Petri, M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. *The Lancet.* 2019; (393): 2332–43.
- Solovev SK, Aseeva EA, Popkova TV, Lila AM, Mazurov VI, Nasonov EL. Sistemnaja krasnaja volchanka: novye gorizonty diagnostiki i terapii. Nauchno-prakticheskaja revmatologija. 2020; 58 (1): 5–14. Russian.
- Jorge AM, Lu N, Zhang Y, Rai SK, Choi HK. Unchanging premature mortality trends in systemic lupus erythematosus: a general population-based study (1999–2014). *Rheumatology.* 2018; (57): 337–44.
- Gatto M, Zen M, Iaccarino L, Doria A. New therapeutic strategies in systemic lupus erythematosus management. *Nat Rev Rheumatol.* 2019; (15): 30–48.
- Dörner T, Furie R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. *The Lancet.* 2019; (393): 2344–58.
- Nasonov EL, Avdeeva AS. Immuno-inflammatory rheumatic diseases associated with type I interferon: new evidence. *Rheumatology Science and Practice.* 2019; (57): 452–61.
- Aringer M, et al. 2019 European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2019; (78): 1151–9.
- Siegel CH, Sammaritano LR. Systemic Lupus Erythematosus. *JAMA.* 2024; (331): 1480.
- Yuan S, et al. Phenotypical changes and clinical significance of CD4+/CD8+ T cells in SLE. *Lupus Sci Med.* 2022; (9): e000660.
- Shan J, Jin H, Xu Y. T Cell Metabolism: A New Perspective on Th17/Treg Cell Imbalance in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2020; (11).
- Tsai Y-G, et al. Pathogenesis and novel therapeutics of regulatory T cell subsets and interleukin-2 therapy in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2023; (14).
- Baeckler EC, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003; (100): 2610–5.
- Kirou KA, et al. Coordinate overexpression of interferon- α -induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004; (50): 3958–67.
- Londe AC, Fernandez-Ruiz R, Julio PR, Appenzeller S, Niewold TB. Type I Interferons in Autoimmunity: Implications in Clinical Phenotypes and Treatment Response. *J Rheumatol.* 2023; (50): 1103–13.
- Crow MK, Olfert M, Kirou KA. Type I Interferons in Autoimmune Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2019; (14): 369–93.
- Rönblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Sci Med.* 2019; (6): e000270.
- Fava A, et al. Integrated urine proteomics and renal single-cell genomics identify an IFN- γ response gradient in lupus nephritis. *JCI Insight.* 2020; (5).
- Viallard JF, et al. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* 2001; (115): 189–95.
- Yang B-C, Wang Y-S, Lin L-C, Liu M-F. Induction of Apoptosis and Cytokine Gene Expression in T-cell Lines by Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Immunol.* 1997; (45): 96–102.
- Greene JA, DeVecchio JL, Gould MP, Auletta JJ, Heinzel FP. In vivo and In vitro Regulation of Type I IFN Synthesis by Synergistic Effects of CD40 and Type II IFN. *The Journal of Immunology.* 2006; (176): 5995–6003.
- Weihua X, Ling W, Kalvakolanu D. Regulation of interferon- α/β -stimulated gene expression through the gamma-activated transcriptional element. *Antiviral Res.* 1990; (40): 145–53.
- Tan EM, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; (25): 1271–7.
- Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; (40): 1725.
- Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol.* 2019; (6): 567–84.
- Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity.* 2019; (50): 37–50.
- Baccala R, et al. Essential requirement for IRF8 and SLC15A4 implicates plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013; (110): 2940–5.
- Sisirak V, et al. Genetic evidence for the role of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine.* 2014; (211): 1969–76.
- Crowl JT, Gray EE, Pestal K, Volkman HE, Stetson DB. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2017; (35): 313–36.
- Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol.* 2016; (16): 566–80.
- Kono DH, Baccala R, Theofilopoulos AN. TLRs and interferons: a central paradigm in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2013; (25): 720–27.
- Mathian A, et al. Ultrasensitive serum interferon- α quantification during SLE remission identifies patients at risk for relapse. *Ann Rheum Dis.* 2019; (78): 1669–76.
- Miyamoto, Takayuki et al. Assessment of type I interferon signatures in undifferentiated inflammatory diseases: A Japanese multicenter experience. *Frontiers in immunology.* 2022; (13): 905960.
- Kim H, et al. Development of a Validated Interferon Score Using NanoString Technology. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2018; (38): 171–85.
- Suspitsyn EN, Raupov RK, Kuchinskaja EM, Kostik MM. Analiz profilja jekspressii interferon-zavisimyh genov dlja differencial'noj diagnostiki zabojevanij immunnnoj sistemy (obzor literatury). Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika. 2021; 279–84. Russian.
- Raupov R, Suspitsin E, Preobrazhenskaja EV, Kostik M. Interferon type I signature associated with skin disease in juvenile dermatomyositis. *Front Med (Lausanne).* 2024; (11).
- Suspitsin EN, Raupov RK, Kuchinskaja EM, Kostik MM. Analysis of interferon type I signature for differential diagnosis of diseases of the immune system (review of literature). *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2021; (66): 279–84.
- Vasin AV, Plotnikova MA, Klotchenko SA, Gjulihandanova NE, Lozhkov AA, avtory; FGAOU VO «SpbPU», patentoobladatel'. Mnogoparametricheskaja diagnosticheskaja test-sistema dlja kolichestvennogo opredelenija urovnja mrnk genov rig-1, ifit-1, ifih-1 cheloveka. Patent «RU 2782428». Russian.
- Banchereau R, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell.* 2016; (165): 551–65.
- Chiche L, et al. Modular Transcriptional Repertoire Analyses of Adults With Systemic Lupus Erythematosus Reveal Distinct Type I and Type II Interferon Signatures. *Arthritis & Rheumatol.* 2014; (66): 1583–95.
- Petri M, et al. Association between changes in gene signatures expression and disease activity among patients with systemic

- lupus erythematosus. *BMC Med Genomics*. 2019; (12): 4.
47. Weckerle CE, et al. Network analysis of associations between serum interferon- α activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011; (63): 1044–53.
48. Feng X, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006; (54): 2951–62.
49. Wither J, et al. Presence of an interferon signature in individuals who are anti-nuclear antibody positive lacking a systemic autoimmune rheumatic disease diagnosis. *Arthritis Res Ther*. 2017; (19): 41.
50. Hua J, Kirou K, Lee C, Crow MK. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies. *Arthritis Rheum*. 2006; (54): 1906–16.
51. Kennedy WP, et al. Association of the interferon signature metric with serological disease manifestations but not global activity scores in multiple cohorts of patients with SLE. *Lupus Sci Med*. 2015; (2): e000080–e000080.
52. Bradford HF, et al. Inactive disease in patients with lupus is linked to autoantibodies to type I interferons that normalize blood IFN α and B cell subsets. *Cell Rep Med*. 2023; (4): 100894.
53. Bastard P, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020; (370): 300–303.
54. Sarkar MK, et al. Photosensitivity and type I IFN responses in cutaneous lupus are driven by epidermal-derived interferon kappa. *Ann Rheum Dis*. 2018; (77): 1653–64.
55. Braunstein I, Klein R, Okawa J, Werth VP. The interferon-regulated gene signature is elevated in subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus and correlates with the cutaneous lupus area and severity index score. *British Journal of Dermatology*. 2012; (166): 971–5.
56. Toukap AN, et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007; (56): 1579–88.
57. Castellano G, et al. Local synthesis of interferon-alpha in lupus nephritis is associated with type I interferons signature and LMP7 induction in renal tubular epithelial cells. *Arthritis Res Ther*. 2015; (17): 72.
58. Shiozawa S, Kuroki Y, Kim M, Hirohata S, Ogino T. Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum*. 1992; (35): 417–22.
59. Arnaud L, et al. Burden of systemic lupus erythematosus in clinical practice: baseline data from the SLE Prospective Observational Cohort Study (SPOCS) by interferon gene signature. *Lupus Sci Med*. 2023; (10): e001032.
60. Paredes JL, Niewold TB. Type I interferon antagonists in clinical development for lupus. *Expert Opin Investig Drugs*. 2020; (29): 1025–41.
61. Chaichian Y, Strand V. Interferon-directed therapies for the treatment of systemic lupus erythematosus: a critical update. *Clin Rheumatol*. 2021; (40): 3027–37.
62. Goulden B, Isenberg D. Anti-IFN α R Mabs for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Biol Ther*. 2021; (21): 519–28.
63. Peng L, Oganessian V, Wu H, Dall'Acqua WF, Damschroder MM. Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon- α receptor 1 antibody. *Mabs*. 2015; (7): 428–39.
64. Riggs JM, et al. Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med*. 2018; (5): e000261.
65. Nasonov EL, Popkova TV, Lila AM. Belimumab v lechenii sistemoj krasnoj volchanki: 20 let fundamental'nyh issledovanij, 10 let klinicheskoy praktiki. *Nauchno-prakticheskaja revmatologija*. 2021; 59 (4): 367–83. Russian.
66. Casey KA, et al. Type I interferon receptor blockade with anifrolumab corrects innate and adaptive immune perturbations of SLE. *Lupus Sci Med*. 2018; (5): e000286.
67. Lub-de Hooge M, N. Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005; (64): 854–8.
68. Tanaka A, et al. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2012; (14): R244.
69. Bauer JW, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis Rheum*. 2009; (60): 3098–107.
70. Sjöstrand M, et al. The Expression of BAFF Is Controlled by IRF Transcription Factors. *The Journal of Immunology*. 2016; (196): 91–96.
71. Jacobi AM, et al. Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: Extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum*. 2010; (62): 201–10.
72. Furie RA, et al. Type I interferon inhibitor anifrolumab in active systemic lupus erythematosus (TULIP-1): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Rheumatol*. 2019; (1): e208–e219.
73. Loncharich MF, Robertson I. Anifrolumab in systemic lupus erythematosus. *Drugs of Today*. 2023; (59): 53–61.

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОГЛИИ И МАКРОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ БЕЛКА IBA-1

В. А. Разенкова[✉], О. В. Кирик, В. С. Павлова, Д. Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Белок Iba-1 традиционно считают высокоселективным маркером микроглии благодаря специфической экспрессии гена именно в этой популяции клеток ЦНС. В результате альтернативного сплайсинга формируется несколько изоформ белка Iba-1, что может служить причиной расхождений результатов иммуногистохимических реакций в зависимости от того, к каким эпитопам иммуногена выработаны выбранные для исследования антитела. В связи с этим, а также с необходимостью определения надежных вариантов антител к Iba-1, доступных для исследователей в Российской Федерации, целью работы было оценить результаты выявления микроглии и макрофагов с использованием антител к различным последовательностям белка, выпускаемых разными производителями. Материалом для исследования служили образцы головного мозга и семенника половозрелых (3–5 месяцев) крыс-самцов Wistar ($n = 8$). В качестве первичных реагентов использовали поликлональные и моноклональные (клон JM36-62) антитела к Iba-1. Установлено, что моноклональные антитела клона JM36-62 позволяют добиться более высокой селективности выявления антигена при лучшем соотношении сигнал/фон и пригодны для замены реагентов, не доступных в настоящее время к приобретению. Использование поликлональных антител привело не только к иммуноспецифичной визуализации микроглии и макрофагов, но и к выявлению клеток эпителио-сперматогенного слоя семенника. Предполагается, что в клетках эпителио-сперматогенного слоя присутствует изоформа Iba-1, лишенная эпитопа, соответствующего последовательности иммуногена для антител клона JM36-62 фрагмента нативного белка. Функциональное значение различных изоформ Iba-1 на настоящий момент остается неясным и требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: Iba-1, AIF-1, микроглия, макрофаги, иммуногистохимия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 24-15-00032, <https://rscf.ru/project/24-15-00032/>

Вклад авторов: В. А. Разенкова — анализ литературы, интерпретация результатов, подготовка рукописи; О. В. Кирик — анализ результатов, редактирование текста, работа с иллюстрациями; В. С. Павлова — гистологическая проводка биологического материала, постановка иммуногистохимических реакций; Д. Э. Коржевский — концепция, планирование исследования, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 2/24 от 25 апреля 2024 г.), проведено в полном соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Алексеевна Разенкова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия; valeriya.raz@yandex.ru

Статья получена: 17.05.2024 **Статья принята к печати:** 05.06.2024 **Опубликована онлайн:** 29.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.026

IDENTIFICATION OF MICROGLIA AND MACROPHAGES USING ANTIBODIES TO VARIOUS SEQUENCES OF THE IBA-1 PROTEIN

Razenkova VA[✉], Kirik OV, Pavlova VS, Korzhevskii DE

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

The Iba-1 protein is traditionally considered a highly selective marker of microglia because of the specific expression of the gene in this particular population of the CNS cells. Alternative splicing creates several isoforms of the Iba-1 protein, which may cause discrepancies in the results of immunohistochemical reactions depending on which epitopes of the immunogen the antibodies selected for the study were developed. In this connection, and with the aim at identifying reliable variants of antibodies to Iba-1 available to researchers in the Russian Federation, we organized with study, seeking to evaluate the results of detecting microglia and macrophages using antibodies to different protein sequences produced by different manufacturers. As material, we used samples of the brain and testis of mature (3–5 months) male Wistar rats ($n = 8$). Polyclonal and monoclonal (clone JM36-62) antibodies to Iba-1 were used as primary reagents. We found that monoclonal antibodies of the JM36-62 clone enable more selective antigen detection with a better signal-to-background ratio; they can be used as replacements for reagents that are currently not available commercially. Polyclonal antibodies enabled not only immunospecific imaging of microglia and macrophages, but also the identification of cells of the epithelial-spermatogenic layer of the testis. It is assumed that germinal epithelium contains the Iba-1 isoform devoid of an epitope that corresponds to the sequence of the immunogenic antibody clone JM36-62 fragment of the native protein. Functionally, various isoforms of Iba-1 should be investigated further.

Keywords: Iba-1, AIF-1, microglia, macrophages, immunohistochemistry

Funding: the study received financial support from the Russian Science Foundation, project No. 24-15-00032, <https://rscf.ru/en/project/24-15-00032/>

Author contribution: Razenkova VA — literature analysis, interpretation of the results, manuscript authoring; Kirik OV — analysis of the results, text editing, preparation of figures; Pavlova VS — histology of biological material, immunohistochemical reactions setup; Korzhevskii DE — study conceptualization, planning, text editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (Protocol № 2/24 of April 25, 2024), and conducted in full compliance with the provisions of the Declaration of Helsinki (2013).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria A. Razenkova
Akademika Pavlova, 12, Saint Petersburg, 197376, Russia; valeriya.raz@yandex.ru

Received: 17.05.2024 **Accepted:** 05.06.2024 **Published online:** 29.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.026

Нейроглия центральной нервной системы включает в себя совокупность ненейронных клеток, необходимых для обеспечения нормальной жизнедеятельности нейронов: транспорта к ним питательных веществ, удаления продуктов распада, образования миелина, участия в передаче сигнала и т. д. [1]. К клеткам нейроглии исторически относят и популяцию микроглиальных клеток (микроглии или микроглиоцитов), которые, однако, происхождением отличаются от других глиальных клеток ЦНС [2]. Ведущая функция микроглии состоит в формировании собственной иммунной системы мозга [3]. Клетки микроглии способны к быстрой активации в ответ даже на незначительные патологические изменения в ЦНС, в связи с чем определение функциональной активности микроглии широко используют для оценки защитного ответа нервной системы на инфекцию, травму, ишемическое повреждение мозга или нейродегенерацию [4, 5].

Изначально в качестве иммуногистохимических маркеров микроглии использовали антитела к белкам главного комплекса гистосовместимости II класса. Впоследствии в 1996 г. был выделен белок Iba-1 (от англ. ionized calcium-binding adapter molecule 1) [6], который считают высокоселективным маркером микроглии благодаря тому, что в головном мозге ген *iba1* специфично экспрессируется именно в этой популяции клеток. Ряд авторов считает данный белок идентичным белку AIF-1 [7–10]. Белок Iba-1 в настоящее время наиболее широко используют для изучения микроглии. Однако существует проблема адекватной интерпретации результатов иммуногистохимической реакции. Она обусловлена тем, что ген *iba1* может подвергаться альтернативному сплайсингу, в результате которого формируется несколько изоформ белка [11]. Поскольку характер распределения этих изоформ не является полностью идентичным [12], результаты иммуногистохимических реакций от исследования к исследованию могут также различаться в зависимости от эпитопов иммуногена, к которому выработаны использованные антитела. Существование альтернативного сплайсинга и различных изоформ белка может быть причиной того, что антитела к Iba-1 иногда выявляют не только микроглию и клетки моноцитарно-макрофагального ряда, но и ряд клеток иного происхождения. Так, положительная реакция на белок Iba-1 была выявлена в гладких миоцитах [13], клетках эпителиальных опухолей молочной железы [14] и печени [15], а также в клетках эпителио-сперматогенного слоя семенников [6, 16]. Эти данные ставят под вопрос утверждение о предполагаемой высокой специфичности конкретных антител к белку Iba-1 как маркеру микроглии.

Одними из наиболее широко используемых антител для маркирования микроглии являются козы антитела к Iba-1 (Abcam, Великобритания; по каталогу: ab5076), которые упоминаются в 1145 публикациях (по данным сайта производителя). Они выработаны против синтетического пептида, соответствующего C-концевым аминокислотам белка Iba-1. Однако в настоящее время более доступны для исследователей в Российской Федерации антитела к Iba-1 (Huabio, Китай; по каталогу: ET-1705-78). Иммуногеном для этих первичных реагентов выступает пептид с последовательностью, соответствующей N-концевым аминокислотам белка. Данные первичные антитела хорошо зарекомендовали себя в работе с образцами ткани различных лабораторных животных [17–19].

В связи с необходимостью определения более надежных вариантов антител к Iba-1, которые можно

использовать для маркирования микроглии, и выяснения возможности их взаимозамены, целью настоящего исследования стала оценка результатов выявления микроглии и макрофагов с использованием антител к различным последовательностям белка Iba-1, выпускаемых разными производителями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования были использованы образцы тканей головного мозга и семенника половозрелых (3–5 месяцев) крыс-самцов Wistar массой 350–400 г ($n = 8$). Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия), содержались в виварии при комнатной температуре в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Перед отбором материала животным проводили эвтаназию путем передозировки парами этилового эфира. Материал фиксировали в цинк-этанол-формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Из парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM 2125RT изготавливали срезы толщиной 5 мкм и монтировали на стекла с адгезивным покрытием HistoBond®+ (Paul Marienfeld, Германия). Срезы головного мозга изготавливали на уровне –2,12 мм от Брегмы.

После депарафинирования препаратов по стандартной методике проводили ингибирование эндогенной пероксидазы путем инкубации срезов в 3%-м водном растворе перекиси водорода в течение 10 мин. Перед нанесением первичных антител срезы обрабатывали нормальной лошадиной сывороткой (008-000-121; Jackson ImmunoResearch, США) или блокировочным раствором (ab64226; Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 10 мин. Выявление микроглии и макрофагов проводили с помощью антител к кальций-связывающему белку Iba-1. Использовали козы поликлональные антитела в разведении 1 : 1000 (ab5076; Abcam, Великобритания) и рекомбинантные кроличьи моноклональные (клон JM36-62) антитела в разведении 1 : 1200 (ET-1705-78; Huabio, Китай). Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере трое суток при температуре 27 °C.

В качестве вторичных реагентов применяли полимерную систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QHL; Fisher Scientific, США), которая обладает двойной активностью к мышинным и кроличьим первичным реагентам, и авидин-биотиновый набор VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (PK-8800; Vector Laboratories, США), который обладает способностью детектировать первичные реагенты мыши, крысы и козы. Кроме того, использовали вторичные реагенты из наборов Cell & Tissue Staining Kit (CTS005 и CTS008; R&D Systems, США), обладающие монореактивностью по отношению к кроличьим и козым антителам соответственно. Режимы инкубации вторичных реагентов соответствовали рекомендациям производителя. Для обоих вариантов антител был проведен отрицательный контроль с использованием соответствующих наборов вторичных реагентов и системы проявления HRP. Для постановки негативного контроля вместо раствора первичных антител срезы обрабатывали раствором использованного разбавителя антител. Блокировку неспецифического связывания антимышиных вторичных антител с близкородственными иммуноглобулинами крысы проводили с помощью нормальной крысиной сыворотки.

Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3'3-диаминобензидин из набора DAB+ (K3468, Agilent, США). После постановки иммуногистохимической реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином либо альциановым синим. После обезвоживания и просветления в орто-ксилале (Вектон; Россия) препараты заключали в среду Cytoseal 60 (23-244257; Richard-Allan Scientific, США). Полученные препараты анализировали с помощью микроскопа Leica DM750 (Leica; Германия), оснащенного цифровой фотокамерой ICC50 (Leica; Германия). Применяли программу захвата изображений LAS EZ (Leica; Германия).

Проводили цифровую оценку оптической плотности окрашенного продукта иммуногистохимической реакции с применением различных антител к Iba-1. Измерения осуществляли в области стриатума с применением программы для морфометрического анализа Fiji (ImageJ). На изображениях предварительно выделяли области интереса фиксированного размера 10×10 мкм с помощью опции «Region of Interest». Измеряли среднюю яркость на единицу площади исследуемых структур (микроглиоцитов, просветов кровеносных сосудов и нейропиля стриатума). Результаты исследования представляли в единицах оптической плотности. Полученные данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США) и представляли в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$ (число значений, использованных для подсчета среднего, было равно 7).

Проверку соответствия аминокислотных последовательностей изоформ Iba-1 (или, по другой номенклатуре, AIF1) проводили с использованием сервиса UniProt [20]. Сравнивали сиквенсы под номерами P55008-1, P55008-2 и P55008-3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительный анализ препаратов показал хорошую сохранность срезов и структуры исследуемых образцов тканей. На препаратах головного мозга и семенника крысы наблюдается высокоинтенсивная иммуногистохимическая реакция на Iba-1 при минимальном уровне фонового окрашивания, которое отсутствовало при использовании кроличьих первичных реагентов, а в случае применения козьих первичных антител было незначительно.

Iba-1-позитивные клетки были обнаружены во всех исследованных препаратах тканей крысы. На препаратах головного мозга они представляли собой типичные микроглиоциты, имеющие большое количество тонких разветвленных отростков (рис. 1А–Г). Вблизи кровеносных сосудов серого вещества коры головного мозга встречаются веретеновидные клетки с уплощенными крупными отростками. При использовании моноклональных кроличьих антител отростки Iba-1-содержащих клеток демонстрировали многочисленные шипикоподобные выросты. Кроме того, моноклональные антитела были выявлены в оболочках головного мозга безотростчатые клетки овальной формы с интенсивно окрашенной цитоплазмой.

Применение козьих поликлональных антител к Iba-1, несмотря на высокую интенсивность специфической реакции, привело к появлению на препаратах незначительного уровня фона. Он проявлялся в слабом окрашивании нейропиля, а также более явным неспецифическим фоновым окрашиванием сыворотки крупных кровеносных сосудов (рис. 1А). Интенсивность окрашивания нейропиля и сыворотки крупных кровеносных

сосудов составляла $0,61 \pm 0,03$ и $0,75 \pm 0,03$ соответственно. Использование моноклональных кроличьих антител не приводило к развитию заметного фонового окрашивания (значения оптической плотности окрашенного хромогена в нейропили и просвете кровеносных сосудов были равны $0,57 \pm 0,02$ и $0,59 \pm 0,01$ соответственно). При этом среднее значение интенсивности окрашивания микроглиоцитов для обоих вариантов антител оказалось схожим: $0,87 \pm 0,09$ для поликлональных антител и $0,87 \pm 0,08$ для антител клона JM36-62.

Использование обоих вариантов первичных антител при работе с образцами ткани семенника крысы позволило выявить два типа иммунопозитивных клеток стромы извитых семенных канальцев (рис. 1Д–Е). В первом случае это клетки, расположенные в непосредственной близости к сосудам. Они обладают небольшой околядерной областью округлого профиля и тонкими неветвящимися отростками. Второй тип — это крупные малоотростчатые или безотростчатые клетки овальной формы. Последние могут располагаться как поодиночке, так и формировать небольшие группы по 3–4 клетки.

Третий тип клеток выявлялся только при использовании для иммуногистохимической реакции поликлональных козьих антител к Iba-1. В этом случае скопление продукта иммуногистохимической реакции обнаруживалось в цитоплазме клеток эпителио-сперматогенного слоя извитых семенных канальцев. Морфологически они соответствуют ранним (округлым) и поздним (удлиненным) сперматидам (рис. 1Д, двойная стрелка). Ни на одном из изученных препаратов, обработанных кроличьими первичными реагентами, Iba-1-иммунопозитивных клеток в составе эпителио-сперматогенного слоя обнаружено не было.

Результаты иммуногистохимической реакции, полученные с помощью моноспецифичных систем детекции Cell & Tissue Staining Kit, основанных на авидин-биотиновой амплификации, соответствовали результатам, полученным при использовании систем VECTASTAIN Universal Quick HRP kit и UltraVision Quanto Detection System HRP.

Сравнение аминокислотных последовательностей трех изоформ Iba-1/AIF1 (а именно сиквенсов P55008-1, P55008-2 и P55008-3 из библиотеки UniProt) показало, что аминокислотные последовательности иммуногенных фрагментов различных антител могут отсутствовать у той или иной изоформы. Так, последовательность N-концевого иммуногенного фрагмента для моноклональных кроличьих антител клона JM36-62 присутствует только у изоформы P55008-1 (с последовательностью в 147 аминокислот), а более короткие изоформы P55008-2 и P55008-3 (с последовательностями в 93 и 132 аминокислоты соответственно) этого фрагмента не содержат. В противоположность этому, участок C-концевого иммуногенного фрагмента для поликлональных козьих антител Abscam присутствует в сиквенсах двух изоформ из трех исследованных: P55008-1 и P55008-2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оба использованных в настоящей работе первичных антитела показали хорошие результаты иммуногистохимической реакции и высокое соотношение уровня интенсивности иммуноспецифического сигнала к неспецифическому фоновому окрашиванию. Несмотря на это протокол, основанный на использовании козьих первичных реагентов, способствовал проявлению более высокого уровня фонового окрашивания нейропиля головного мозга

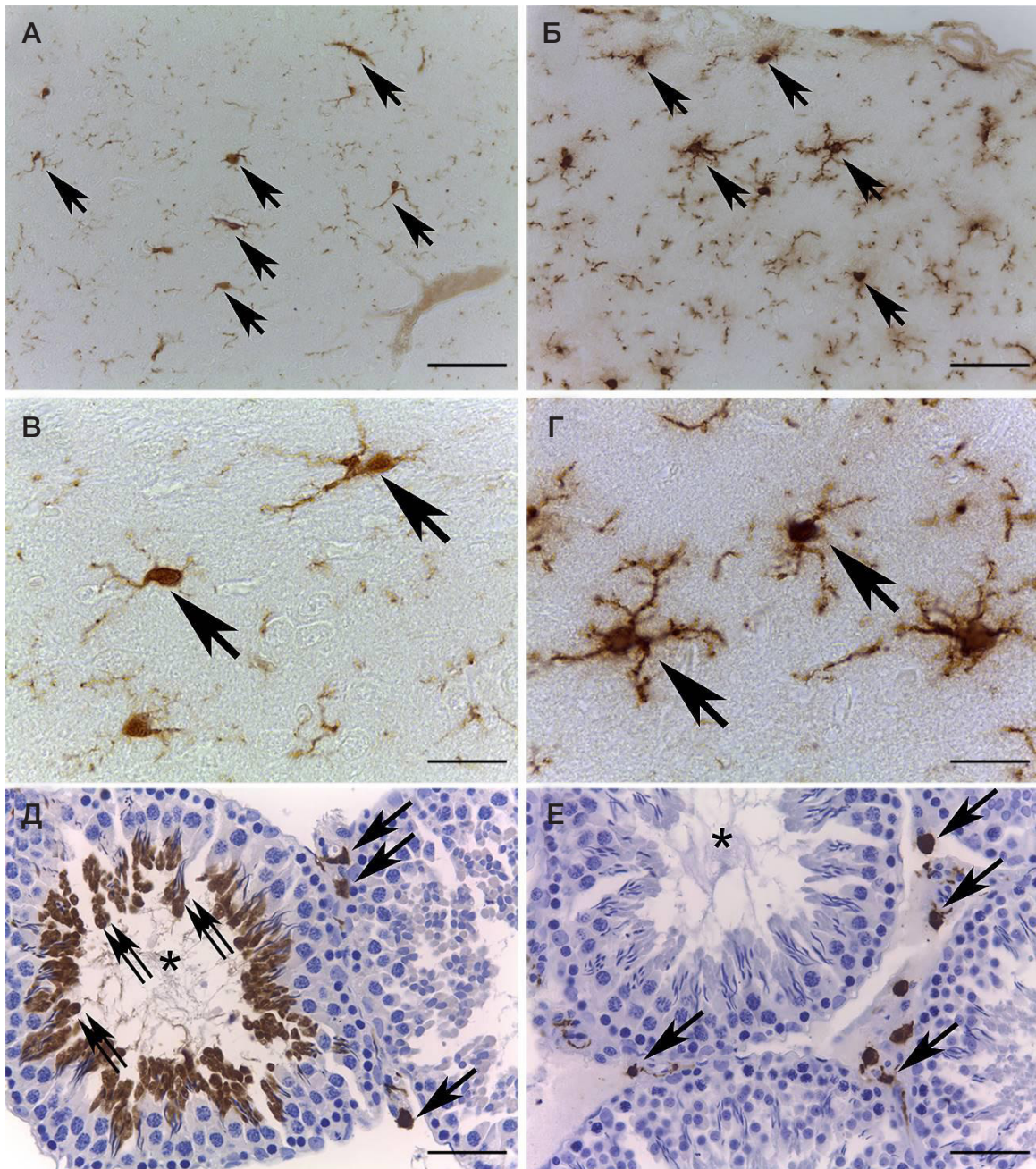


Рис. 1. Iba-1 в клетках ткани крысы, выявляемые с помощью поликлональных козьих (А, В, Д), моноклональных кроличьих (Б, Г, Е) антител. А–Г. Препараты головного мозга (стрелки указывают на микроглиоциты). Д–Е. Извитые семенные канальцы. Стрелки указывают на Iba-1-содержащие клетки в интерстиции, двойные стрелки — в эпителио-сперматогенном слое, звездочка — просвет канальца. Масштаб: 50 мкм (А, Б, Д, Е), 20 мкм (В, Г)

и паренхимы семенников по сравнению с аналогичным, основанным на применении антител клона JM36-62. На представленных фотографиях (рис. 1) соотношение специфического сигнала к фоновому кажется ниже у поликлональных антител. Дополнительное количественное исследование цифровых изображений показало, что интенсивности специфической иммуногистохимической реакции для обоих вариантов антител оказались близки. Однако интенсивность окрашивания нейропилия и сыворотки крупных кровеносных сосудов действительно были выше на препаратах, окрашенных с помощью поликлональных козьих первичных реагентов. Как известно, работа с первичными козьими реагентами накладывает определенные ограничения при проведении иммуногистохимических исследований с использованием непрямого метода Кунса или его модификаций. Во-первых,

наиболее распространенные вторичные реагенты являются моно- или бивалентными, т. е. направлены против иммуноглобулинов одного или двух видов животных (чаще всего, кролика и мыши), что значительно усложняет подбор вторичных антител и удорожает проводимое исследование. Вторая проблема состоит в том, что козы антитела создают больше неспецифического фона при незначительном усилении интенсивности реакции, поскольку реагируют и с иммуноглобулинами быка, которые могут в следовом количестве присутствовать в реагентах, содержащих бычий сывороточный альбумин [6]. Результаты настоящего иммуногистохимического исследования это тоже подтверждают.

Белок Iba-1, состоящий из 147 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 17 кДа [21], всегда присутствует как в теле, так и в отростках

микроглиальных клеток, благодаря чему его повсеместно используют для проведения исследований, связанных с оценкой морфофункционального статуса микроглии. При взаимодействии с фимбрином Iba-1 участвует в сшивании актиновых филаментов и регуляции конфигурации плазматической мембраны [22], поэтому повышение уровня Iba-1 в клетках отмечается при переходе микроглии из покоящегося состояния в активированное [23]. Однако это свойство Iba-1 подразумевает присутствие данного белка и в других фагоцитирующих клетках организма. Действительно, часто антитела к Iba-1 используют для выявления клеток моноцитарно-макрофагального ряда, что отражено в многочисленных публикациях. Так, иммунопозитивными по Iba-1 оказываются резидентные макрофаги различных органов лабораторных животных и человека: клетки Купфера [18, 24], альвеолярные макрофаги легких и макрофаги селезенки [25, 26], клетки Лангерганса [6, 16]. Поэтому полученные в настоящем исследовании данные, указывающие на присутствие Iba-1 в интерстициальных макрофагах семенника и лептоменингеальных клетках головного мозга, были ожидаемы. Гораздо более интересен результат, продемонстрированный для клеток эпителио-сперматогенного слоя семенных канальцев при постановке иммуногистохимической реакции с использованием различных антител к Iba-1 на препаратах семенника крысы. Использование в работе козых поликлональных антител приводило к образованию окрашенного продукта иммуногистохимической реакции в клетках, морфологически соответствующих сперматидам. Антитела клона JM36-62 не связывали антигены в эпителио-сперматогенном слое.

Утверждение о присутствии белка Iba-1 в сперматиде семенных канальцев было выдвинуто в ряде публикаций [7, 16, 27–29]. Вопреки этим данным, наши результаты по данной группе клеток отличались при использовании различных первичных антител. Это может быть следствием как свойств первичных антител, выявляющих эпитопы разной специфичности, так и особенностями вторичных реагентов. Поэтому для исключения возможности ложноположительной реакции со стороны сперматид семенника был поставлен дополнительный контроль с использованием идентичных вторичных систем визуализации козых и кроличьих антител, основанных на авидин-биотиновой технологии, а также дополнительной блокаде эндогенного биотина — Cell & Tissue Staining Kit. Результаты иммуногистохимической реакции в этом случае соответствовали результатам, полученным при использовании полимерной системы детекции UltraVision Quanto Detection System HRP для выявления кроличьих, и набора VECTASTAIN Universal Quick HRP kit для выявления козых антител. Это дополнительно подчеркивает, что реакция со стороны сперматид не является следствием неспецифичного связывания вторичных реагентов (а именно стрептавидина).

Такой результат иммуногистохимической реакции может быть обусловлен различиями антигенных детерминант: присутствующие в сперматиде эпитопы Iba-1 могли более точно соответствовать партопам

поликлональных, но не моноклональных антител. Так, в соответствии с информацией, предоставленной на сайте производителя, для поликлональных козых антител в качестве антигена был использован синтетический пептид последовательностью TGPPAKKAISELP, локализованной на С-конце белка Iba-1. На сайте производителя также отмечено, что антитела ab5076 способны выявлять как минимум две изоформы Iba-1/AIF1. В противоположность этому, иммуногенный пептид для моноклональных кроличьих антител имел последовательность SQTRDLQGGKAFGL и соответствует N-концу белка. Сравнение сиквентов разных изоформ человеческого Iba-1/AIF1 показало, что последовательность иммуногена для кроличьих антител соответствует изоформе белка с последовательностью в 147 аминокислот, которая принята в качестве канонической [6]. При этом козьи поликлональные антитела, согласно сопоставлению аминокислотной последовательности фрагментов белка, соответствующих иммуногенному пептиду, должны выявлять как каноническую изоформу, так и более короткие формы белка. Таким образом, наши данные косвенно свидетельствуют о том, что альтернативный сплайсинг матричных РНК *iba1* может исключать из конечного транскрипта N-концевой фрагмент, выявляемый моноклональными антителами клона JM36-62, но оставлять С-концевой фрагмент, присутствующий у изоформ, выявляемых поликлональными антителами производства Abscam. Обращение к изначальным публикациям, в которых была представлена характеристика белка Iba-1, показало, что авторы исследовали экспрессию гена в различных органах [13–16]. Это позволило им продемонстрировать высокую экспрессию *iba1* в семенниках и селезенке, а также слабую — в легких, почках и головном мозге (благодаря специфической экспрессии гена исключительно в макрофагах и/или микроглии). Большое количество других работ, посвященных экспрессии *iba1* в различных тканях [16–18, 24, 25], также дают основания предполагать, что она не ограничена микроглией, моноцитами и макрофагами. Поэтому нельзя исключать, что козьи поликлональные антитела действительно выявляют белок Iba-1, причем и ту его изоформу, которая не содержится в клетках моноцитарно-макрофагального ряда.

ВЫВОДЫ

Моноклональные антитела клона JM36-62 позволяют добиться более высокой селективности выявления антигена при лучшем соотношении сигнал/фон и пригодны для замены более часто используемого реагента. Более высокая селективность антител клона JM36-62, по-видимому, обусловлена более правильным выбором иммуногена производителем антител. Выявление сперматид при использовании поликлональных антител Abscam может быть обусловлено присутствием в этих клетках изоформы Iba-1, лишенной эпитопа, соответствующего последовательности N-концевого фрагмента нативного белка. Для оценки функционального значения различных изоформ Iba-1 требуются дальнейшие исследования.

Литература

- Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim SS, Lynch G, Nave KA, et al. Glial biology in learning and cognition. *Neuroscientist*. 2014; 20 (5): 426–31. DOI: 10.1177/1073858413504465.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18 (4): 225–242. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (8): 312–8. DOI: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem*. 2016; 159 (5): 491–96. DOI: 10.1093/JB/MVW009.
- Гусельникова В. В., Разенкова В. А., Суфиева Д. А., Коржевский Д. Э. Активация микроглии в головном мозге спонтанно гипертензивных крыс. *Вестник РГМУ*. 2023; (3): 53–60. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.024.
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 224 (3): 855–62. DOI: 10.1006/BBRC.1996.1112.
- Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest*. 1995; 95 (6): 2954–62. DOI: 10.1172/JCI118003.
- Lituma PJ, Woo E, O'Hara BF, Castillo PE, Sibinga NES, Nandi S. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein Iba1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021; 118 (46): e2115539118 [Internet] 2021 Nov 16 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2115539118?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
- Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett*. 2002; 514 (2–3): 115–21. DOI:10.1016/S0014-5793(02)02430-4.
- Vizioli J, Verri T, Pagliara P. Allograft Inflammatory Factor-1 in Metazoans: Focus on Invertebrates. *Biology (Basel)*. 2020; 9 (11): 1–14. DOI: 10.3390/BIOLOGY9110355.
- Del Galdo F, Maul GG, Jiménez SA, Artlett CM. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (8): 2616–25. DOI: 10.1002/ART.22010.
- Slim FA, Ouellette G, Ennour-Idrissi K, Jacob S, Diorio C, Durocher F. An isoform of AIF1 involved in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2018; 18 (1): 167 [Internet] 2018 Oct 22 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://cancercci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-018-0663-3>.
- Broglio L, Erne B, Tolnay M, Schaeren-Wiemers N, Fuhr P, Steck AJ, et al. Allograft inflammatory factor-1: a pathogenetic factor for vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2008; 38 (4): 1272–9. DOI: 10.1002/MUS.21033.
- Liu S, Tan WY, Chen QR, Chen XP, Fu K, Zhao YY, et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF-kappaB/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci*. 2008; 99 (5): 952–7. DOI: 10.1111/J.1349-7006.2008.00787.X.
- Jia S, Du Z, Jiang H, Huang X, Chen Z, Chen N. Daintain/AIF-1 accelerates the activation of insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathway in HepG2 cells. *Oncol Rep*. 2015; 34 (1): 511–7. DOI: 10.3892/OR.2015.4002.
- Köhler C. Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res*. 2007; 330 (2): 291–302. DOI: 10.1007/S00441-007-0474-7.
- Zhang S, Gong P, Zhang J, Mao X, Zhao Y, Wang H, et al. Specific frequency electroacupuncture stimulation transiently enhances the permeability of the blood-brain barrier and induces tight junction changes. *Front Neurosci*. 2020; 14: 582324 [Internet] 2020 Oct 6 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2020.582324/full>.
- Никитина И. А., Разенкова В. А., Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Выявление популяции клеток Купфера в печени крысы с использованием моноклональных и поликлональных антител к микроглиальному маркеру Iba-1. *Медицинский академический журнал*. 2023; 23 (1): 85–94. DOI: 10.17816/MAJ133649.
- Liu C, Zhao X-M, Wang Q, Du TT, Zhang MX, Wang HZ, et al. Astrocyte-derived SerpinA3N promotes neuroinflammation and epileptic seizures by activating the NF-κB signaling pathway in mice with temporal lobe epilepsy. *J Neuroinflammation*. 2023; 20 (1): 161 [Internet] 2023 Jul 8 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-023-02840-8>.
- Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*. 2011; 1: 28 [Internet] 2011 Jul 1 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00028>.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*. 2004; 88 (4): 844–56. DOI: 10.1046/J.1471-4159.2003.02213.X.
- Gheorghe RO, Grosu AV, Magercu M, Ghenghea MS, Zbarcea CE, Tanase A, et al. Switching rat resident macrophages from M1 to M2 phenotype by Iba1 silencing has analgesic effects in SNL-induced neuropathic pain. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (21): 15831 [Internet] 2023 Oct 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/21/15831>.
- Yoshii D, Nakagawa T, Komohara Y, Kawaguchi H, Yamada S, Tanimoto A. Phenotypic changes in macrophage activation in a model of nonalcoholic fatty liver disease using microminipigs. *J Atheroscler Thromb*. 2021; 28 (8): 844–51. DOI: 10.5551/JAT.57703.
- Donovan KM, Leidinger MR, McQuillen LP, Goeken JA, Hogan CM, Harwani SC, et al. Allograft inflammatory factor 1 as an immunohistochemical marker for macrophages in multiple tissues and laboratory animal species. *Comp Med*. 2018; 68 (5): 341–48. DOI: 10.30802/AALAS-CM-18-000017.
- Hu X, Buhl CS, Sjogaard MB, Schousboe K, Mizrak HI, Kufaiishi H, et al. Structural changes of cutaneous immune cells in patients with type 1 diabetes and their relationship with diabetic polyneuropathy. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2023; 10 (5): e200144 [Internet] 2023 Aug 1 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.neurology.org/doi/10.1212/NXI.0000000000200144?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
- Son NV, Chambers JK, Dung LT, Kishimoto TE, Nishimura M, Kita C, Takada Y, et al. Histological and immunohistochemical features of normal histiocytes and Langerhans cells, and histiocytic sarcomas in four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *J Comp Pathol*. 2020; 178: 32–40. DOI: 10.1016/J.JCPA.2020.06.009.
- Özbek M, Beyaz F, Ergün E, Ergün L, Karaca H, Cabir A, et al. Identification of some calcium binding proteins and neural cell markers in rat testis and epididymis during postnatal development. *Andrologia*. 2022; 54 (11): e14633 [Internet] 2022 Nov 14 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14633>.
- Iida H, Doiguchi M, Yamashita H, et al. Spermatid-specific expression of Iba1, an ionized calcium binding adapter molecule-1, in rat testis. *Biol Reprod*. 2001; 64 (4): 1138–46. DOI: 10.1095/BIOLREPROD64.4.1138.
- Saleh H, Nassar AMK, Noreldin AE, Samak D, Elshony N, Wasef L, et al. Chemo-protective potential of cerium oxide nanoparticles against Fipronil-induced oxidative stress, apoptosis, inflammation and reproductive dysfunction in male white albino rats. 2020; 25 (15): 3479 [Internet] 2020 Jul 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/15/3479>.

References

- Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim SS, Lynch G, Nave KA, et al. Glial biology in learning and cognition. *Neuroscientist*. 2014; 20 (5): 426–31. DOI: 10.1177/1073858413504465.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18 (4): 225–242. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (8): 312–8. DOI: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem*. 2016; 159 (5): 491–96. DOI: 10.1093/JB/MWV009.
- Guselnikova VV, Razenkova VA, Sufieva DA, Korzhevskii DE. Activation of microglia in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Bulletin of RSMU*. 2023; (3): 49–55. DOI: 10.24075/brsmu.2023.024.
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 224 (3): 855–62. DOI: 10.1006/BBRC.1996.1112.
- Utans U, Arcenci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest*. 1995; 95 (6): 2954–62. DOI: 10.1172/JCI118003.
- Lituma PJ, Woo E, O'Hara BF, Castillo PE, Sibinga NES, Nandi S. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein *Iba1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021; 118 (46): e2115539118 [Internet] 2021 Nov 16 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2115539118?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
- Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett*. 2002; 514 (2–3): 115–21. DOI:10.1016/S0014-5793(02)02430-4.
- Vizioli J, Verri T, Pagliara P. Allograft Inflammatory Factor-1 in Metazoans: Focus on Invertebrates. *Biology (Basel)*. 2020; 9 (11): 1–14. DOI: 10.3390/BIOLOGY9110355.
- Del Galdo F, Maul GG, Jiménez SA, Artlett CM. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (8): 2616–25. DOI: 10.1002/ART.22010.
- Slim FA, Ouellette G, Ennouar-Idrissi K, Jacob S, Diorio C, Durocher F. An isoform of AIF1 involved in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2018; 18 (1): 167 [Internet] 2018 Oct 22 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://cancercci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-018-0663-3>.
- Broglio L, Erne B, Tolnay M, Schaeren-Wiemers N, Fuhr P, Steck AJ, et al. Allograft inflammatory factor-1: a pathogenetic factor for vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2008; 38 (4): 1272–9. DOI: 10.1002/MUS.21033.
- Liu S, Tan WY, Chen QR, Chen XP, Fu K, Zhao YY, et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF- κ B/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci*. 2008; 99 (5): 952–7. DOI: 10.1111/J.1349-7006.2008.00787.X.
- Jia S, Du Z, Jiang H, Huang X, Chen Z, Chen N. Daintain/AIF-1 accelerates the activation of insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathway in HepG2 cells. *Oncol Rep*. 2015; 34 (1): 511–7. DOI: 10.3892/OR.2015.4002.
- Köhler C. Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res*. 2007; 330 (2): 291–302. DOI: 10.1007/S00441-007-0474-7.
- Zhang S, Gong P, Zhang J, Mao X, Zhao Y, Wang H, et al. Specific frequency electroacupuncture stimulation transiently enhances the permeability of the blood-brain barrier and induces tight junction changes. *Front Neurosci*. 2020; 14: 582324 [Internet] 2020 Oct 6 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2020.582324/full>.
- Nikitina IA, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskij DJe. Vyjavlenie populjacji kletok Kupfera v pecheni krysy s ispol'zovaniem monoklonal'nyh i poliklonal'nyh antitel k mikroglijal'nomu markeru *Iba-1*. *Medicinskij akademicheskij zhurnal*. 2023; 23 (1): 85–94. DOI: 10.17816/MAJ133649. Russian.
- Liu C, Zhao X-M, Wang Q, Du TT, Zhang MX, Wang HZ, et al. Astrocyte-derived SerpinA3N promotes neuroinflammation and epileptic seizures by activating the NF- κ B signaling pathway in mice with temporal lobe epilepsy. *J Neuroinflammation*. 2023; 20 (1): 161 [Internet] 2023 Jul 8 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-023-02840-8>.
- Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*. 2011; 1: 28 [Internet] 2011 Jul 1 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00028>.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein *Iba1* binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*. 2004; 88 (4): 844–56. DOI: 10.1046/J.1471-4159.2003.02213.X.
- Gheorghe RO, Grosu AV, Magercu M, Ghenghea MS, Zbarcea CE, Tanase A, et al. Switching rat resident macrophages from M1 to M2 phenotype by *Iba1* silencing has analgesic effects in SNL-induced neuropathic pain. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (21): 15831 [Internet] 2023 Oct 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/21/15831>.
- Yoshii D, Nakagawa T, Komohara Y, Kawaguchi H, Yamada S, Tanimoto A. Phenotypic changes in macrophage activation in a model of nonalcoholic fatty liver disease using microminipigs. *J Atheroscler Thromb*. 2021; 28 (8): 844–51. DOI: 10.5551/JAT.57703.
- Donovan KM, Leidinger MR, McQuillen LP, Goeken JA, Hogan CM, Harwani SC, et al. Allograft inflammatory factor 1 as an immunohistochemical marker for macrophages in multiple tissues and laboratory animal species. *Comp Med*. 2018; 68 (5): 341–48. DOI: 10.30802/AALAS-CM-18-000017.
- Hu X, Buhl CS, Sjogaard MB, Schousboe K, Mizrak HI, Kufaisi H, et al. Structural changes of cutaneous immune cells in patients with type 1 diabetes and their relationship with diabetic polyneuropathy. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2023; 10 (5): e200144 [Internet] 2023 Aug 1 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.neurology.org/doi/10.1212/NXI.0000000000200144?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
- Son NV, Chambers JK, Dung LT, Kishimoto TE, Nishimura M, Kita C, Takada Y, et al. Histological and immunohistochemical features of normal histiocytes and Langerhans cells, and histiocytic sarcomas in four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *J Comp Pathol*. 2020; 178: 32–40. DOI: 10.1016/J.JCPA.2020.06.009.
- Özbek M, Beyaz F, Ergün E, Ergün L, Karaca H, Cabir A, et al. Identification of some calcium binding proteins and neural cell markers in rat testis and epididymis during postnatal development. *Andrologia*. 2022; 54 (11): e14633 [Internet] 2022 Nov 14 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14633>.
- Iida H, Doiguchi M, Yamashita H, et al. Spermatid-specific expression of *Iba1*, an ionized calcium binding adapter molecule-1, in rat testis. *Biol Reprod*. 2001; 64 (4): 1138–46. DOI: 10.1095/BIOLREPROD64.4.1138.
- Saleh H, Nassar AMK, Noreldin AE, Samak D, Elshony N, Wasef L, et al. Chemo-protective potential of cerium oxide nanoparticles against Fipronil-induced oxidative stress, apoptosis, inflammation and reproductive dysfunction in male white albino rats. 2020; 25 (15): 3479 [Internet] 2020 Jul 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/15/3479>.

ВЛИЯНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА НА ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА К SARS-COV-2

Г. С. Шепелькова , Н. А. Черных, В. К. Косякова, С. С. Садовникова, А. Эргешов, В. В. Еремеев

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

С учетом того, что адаптивный иммунный ответ важен для контроля и устранения вирусных инфекций, вызывающих заболевания у людей, крайне важна оценка адаптивного ответа на SARS-CoV-2. Нейтрализующие антитела и Т-лимфоциты CD4⁺/CD8⁺ способствуют контролю SARS-CoV-2. Туберкулез до сих пор остается главной причиной смерти среди бактериальных инфекций в мире. На данный момент лечение туберкулеза осложнено коинфекцией COVID-19. Целью работы было исследовать образование нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 и специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ у пациентов с ТБ легких. Уровни нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 и количество специфичных к SARS-CoV-2 Т-клеток оценивали в двух временных точках (через 3 и через 6 месяцев после перенесенного COVID-19) у больных с диагнозом туберкулез легких (69 человек: 33 женщины и 36 мужчин от 18 до 70 лет). В контрольную группу вошли пациенты, перенесшие COVID-19 без туберкулеза (35 человек: 25 женщин и 10 мужчин от 18 до 70 лет). В результате исследования были зарегистрированы одинаковые уровни нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в обеих группах через 3 месяца после перенесенного COVID-19. Уровни антител снизились в двух группах через 6 месяцев после COVID-19 по сравнению с 3 месяцами. Уровень антител был достоверно ниже в группе больных ТБ ($p = 0,01$). Количество SARS-CoV-2-специфичных Т-клеток было ниже у больных ТБ через 6 месяцев после перенесенного COVID-19 ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. Таким образом, коинфекция ТБ снижает специфический иммунный ответ против SARS-CoV-2 через 6 месяцев после перенесенного COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, туберкулез, иммунологическая память, Т-лимфоциты CD4⁺, IgG**Финансирование:** НИР FURE-2022-0010.

Вклад авторов: Г. С. Шепелькова — планирование и постановка экспериментов, анализ результатов, написание рукописи; Н. А. Черных — подбор пациентов для включения в исследование, первичный анализ данных; В. К. Косякова — постановка экспериментов, первичный анализ результатов; С. С. Садовникова — подбор пациентов для включения в исследование; А. Эргешов — дизайн исследования; В. В. Еремеев — дизайн исследования, анализ результатов, написание рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в рамках темы НИР ФГБНУ «ЦНИИТ» № FURE-2022-0010 и одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ЦНИИТ» Протокол 13/1 от 28.12.2021. Все пациенты, вошедшие в исследование, подписали добровольное информированное согласие до момента включения в исследование.

 **Для корреспонденции:** Галина Сергеевна Шепелькова
Яузская аллея, д. 2, г. Москва, 107564, Россия; g.shepelkova@ctri.ru

Статья получена: 03.04.2024 **Статья принята к печати:** 17.05.2024 **Опубликована онлайн:** 17.06.2024**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.023

THE IMPACT OF TUBERCULOSIS ON THE DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE TO SARS-COV-2

Shepelkova GS , Chernyh NA, Kosiakova VK, Sadovnikova SS, Ergeshov A, Yermeev VV

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

Given the fact, that adaptive immune response is important for control and elimination of viral infections causing human diseases, estimation of adaptive response to SARS-CoV-2 is extremely important. The neutralizing antibodies and CD4⁺/CD8⁺ T cells contribute to the SARS-CoV-2 control. Tuberculosis remains the leading cause of mortality among bacterial infections all over the world. Currently, treatment of tuberculosis is complicated by the COVID-19 co-infection. The aim of the study was to investigate the formation of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and CD4⁺ and CD8⁺ T cells specific for SARS-CoV-2 in patients with pulmonary TB. The levels of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and the amount of T cells specific for SARS-CoV-2 were estimated at two time points (3 and 6 months after COVID-19) in patients diagnosed with pulmonary tuberculosis (69 individuals: 33 females and 36 males aged 18–70 years). Patients without tuberculosis (35 individuals: 25 females and 10 males aged 18–70 years) who had undergone COVID-19 served as the control group. The study showed equal levels of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in both groups 3 months after COVID-19. The levels of antibodies decreased 6 months after COVID-19 compared to the levels reported 3 months after the disease in both groups. The antibody levels were significantly lower in the group of patients with TB ($p = 0.01$). The amount of SARS-CoV-2 specific T cells was lower in TB patients 6 months after COVID-19 ($p < 0.001$) compared to the control group. Thus, TB co-infection reduces the specific immune response to SARS-CoV-2 6 months after COVID-19.

Keywords: COVID-19, tuberculosis, immunologic memory, CD4⁺ T lymphocytes, IgG**Funding:** research project FURE-2022-0010.

Author contribution: Shepelkova GS — planning the experiments and experimental procedure, analysis of the results, manuscript writing; Chernyh NA — selection of patients for inclusion in the study, primary data analysis; Kosiakova VK — experimental procedure, primary data analysis; Sadovnikova SS — selection of patients for inclusion in the study; Ergeshov A — study design; Yermeev VV — study design, analysis of the results, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was conducted as part of the research project FURE-2022-0010 of the Central Tuberculosis Research Institute and approved by the Ethics Committee of the Central Tuberculosis Research Institute (protocol No. 13/1 dated 28 December 2021). All the patients included in the study submitted the informed consent before enrollment.

 **Correspondence should be addressed:** Galina S. Shepelkova
Yauza alley, 2, Moscow, 107564, Russia; g.shepelkova@ctri.ru

Received: 03.04.2024 **Accepted:** 17.05.2024 **Published online:** 17.06.2024**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.023

Перераспределение медицинских услуг во время пандемии COVID-19, несомненно, оказало негативное влияние на продолжающуюся эпидемию туберкулеза (ТБ). Острая форма COVID-19 и ТБ могут совпадать, и частота возникновения таких коинфекций в районах с высокой распространенностью ТБ может быть недооценена. Предшествующий или текущий ТБ является фактором риска смерти от SARS-CoV-2. Результаты *ex vivo* исследований клеток крови остро инфицированных людей показывают, что ответ Т-клеток на Mtb может модулироваться SARS-CoV-2. И наоборот, сопутствующий ТБ может ухудшить иммунный ответ на SARS-CoV-2 и усугубить воспалительную реакцию за счет усиления активации врожденного и адаптивного иммунитета. Несмотря на то что исследования на животных и эпидемиологические данные указывают на потенциальную защиту от SARS-CoV-2 с помощью БЦЖ, эффективность вакцины не подтвердилась в ходе нескольких крупномасштабных клинических исследований [1].

В контексте респираторных инфекций пандемия COVID-19 создала новые проблемы для пациентов с уже существующими заболеваниями. Особое беспокойство вызывает взаимодействие между COVID-19 и ТБ, сочетание которых представляет собой сложный клинический ландшафт [2]. Обе респираторные инфекции характеризуются гиперинтенсивным воспалительным процессом с высоким уровнем провоспалительных цитокинов, включая TNF, IL6 и IL1. Эти высвобождающиеся цитокины и хемокины привлекают иммунные клетки, которые усиливают провоспалительные реакции, тем самым способствуя повреждению тканей. Полученные данные подчеркивают серьезность такого взаимодействия, показывая, что одновременное или последовательное инфицирование легких COVID-19 и ТБ приводит к обострению респираторных симптомов и выраженному снижению функции легких [3].

Показано, что ТБ может влиять на тяжесть COVID-19 из-за ослабленного иммунитета и хронического воспаления легких [4]. У пациентов с активным ТБ наблюдается дисрегуляция иммунного ответа, что может нарушить иммунный ответ на COVID-19 и привести к увеличению тяжести заболевания. Кроме того, COVID-19 может реактивировать латентный ТБ у пациентов с историей заболевания, что еще больше усугубляет тяжесть симптомов [5, 6]. Если сравнивать пациентов с ТБ и COVID-19 с пациентами с пневмонией, то у 22% обследованных пациентов с ТБ наблюдались легкие/умеренные клинические формы заболевания, а у остальных 78% развились более тяжелые формы COVID-19 [7].

Новая коронавирусная инфекция 2019 г. COVID-19 привела к широкомасштабной заболеваемости и смертности [8]. Адаптивный иммунный ответ играет важную роль в контроле большинства вирусных инфекций. Основными фундаментальными компонентами адаптивной иммунной системы являются В-лимфоциты (как источник антител) и Т-лимфоциты (CD4⁺ и CD8⁺). Учитывая то что адаптивные иммунные реакции важны для контроля и устранения почти всех вирусных инфекций, вызывающих заболевания у людей, а адаптивные иммунные реакции и иммунная память играют ключевую роль в формировании вакцинного иммунитета, крайне важно понимать адаптивные реакции на SARS-CoV-2. Как ответ на инфекцию SARS-CoV-2 в организме хозяина вырабатываются специфичные для SARS-CoV-2 антитела, CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоциты [9–11]. Антитела и Т-клетки играют защитную

роль в борьбе с вирусными инфекциями, но эти роли и важность каждого компонента адаптивного иммунитета варьируются в зависимости от вида вирусной инфекции. Взаимосвязь между нейтрализующими антителами, Т-клетками памяти и тяжестью заболевания COVID-19 представляется сложной. Высокие титры нейтрализующих антител связаны с тяжелым заболеванием и потенциально экстрафолликулярными ответами В-клеток [12, 13], в то время как Т-клетки памяти, специфичные для SARS-CoV-2, имеют разные ассоциации в зависимости от исследования [14–17]. Почти у всех пациентов, перенесших COVID-19, в крови детектируются IgG и Т-лимфоциты CD4⁺ к антигенам SARS-CoV-2. Продемонстрировано, что величина ответа Spike-специфичных Т-клеток CD4⁺ коррелирует с Spike IgG [9, 16, 18]. Тем не менее некоторые люди имеют низкие или отрицательные результаты тестов на IgG, сохраняя при этом обнаруживаемые CD4⁺ Т-клетки к SARS-CoV-2. На эти случаи приходится 1–10% инфицированных SARS-CoV-2 [19–21].

Целью исследования было провести анализ длительности сохранения клеточной и гуморальной иммунологической памяти к SARS-CoV-2 на фоне ТБ-коинфекции.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование были включены 120 человек (59 мужчин и 61 женщина) в возрасте от 18 до 70 лет (средний возраст 40 ± 15 лет). Критерии включения: здоровые лица (15 человек) — индивидуумы без COVID-19 и ТБ в анамнезе; лица, перенесшие COVID-19 в срок до 3-х месяцев до момента включения в исследование (без ТБ в анамнезе) (16 человек); лица, перенесшие COVID-19 в срок до 6 месяцев до момента включения в исследование (без ТБ в анамнезе) (19 человек); пациенты, находящиеся на лечении в ФГБНУ «ЦНИИТ» в период с 08.2021 по 02.2022 по поводу ТБ легких и перенесшие COVID-19 в срок до 3-х месяцев до момента включения в исследование (31 человек); пациенты, находящиеся на лечении в ФГБНУ «ЦНИИТ» в период с 08.2021 по 02.2022 по поводу ТБ легких и перенесшие COVID-19 в срок до 6 месяцев до момента включения в исследование (38 человек).

Всем больным с диагнозом ТБ легких назначали терапию с учетом лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* и индивидуальной переносимости препаратов. Диагностику ТБ проводили у всех пациентов, включенных в исследование методом BACTEC MGIT 960 (BD; США), согласно рекомендациям производителя [22]. Все образцы, давшие положительный результат, окрашивали по методу Циля–Нильсена, а затем проводили микроскопию для выявления кислотоустойчивых бактерий. В дальнейшем биоматериал исследовали методом ПЦР.

Все включенные в исследование пациенты перенесли COVID-19 легкой или среднетяжелой степени. Пациентов с тяжелой степенью COVID-19 в нашем исследовании не было.

Критерии исключения: возраст до 18 лет; беременность; наличие в анамнезе сахарного диабета, поливалентной аллергии, бронхиальной астмы, системного аутоиммунного заболевания, активного инфекционного процесса; декомпенсация хронической сердечной недостаточности; острый инфаркт; постоянный прием кортикостероидов.

В работе использовали образцы периферической крови пациентов и здоровых лиц, вошедших в исследование.

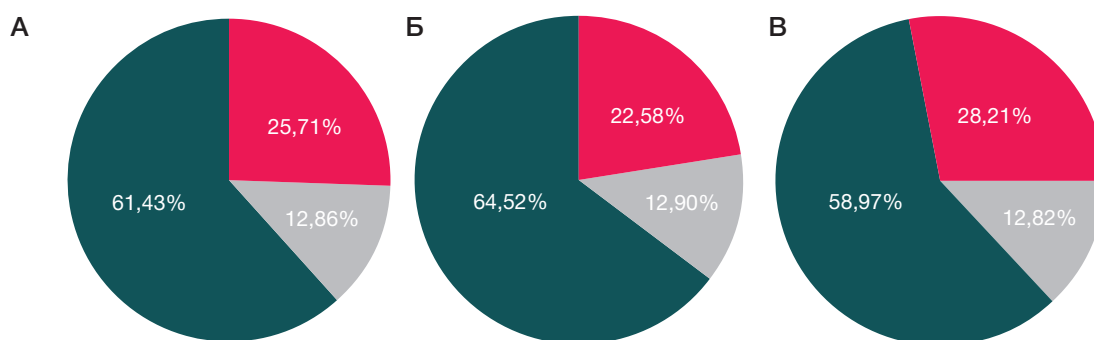


Рис. 1. Распределение по ТБ процессам в группах пациентов с диагнозом ТБ легкого, включенных в исследование. **А.** Все пациенты с диагнозом ТБ легкого, включенные в исследование. **Б.** Пациенты с диагнозом ТБ легкого, перенесшие COVID-19 в срок до 3-х месяцев до момента включения в исследование. **В.** Пациенты с диагнозом ТБ легкого, перенесшие COVID-19 в срок до 6 месяцев до момента включения в исследование. Красная часть диаграммы — пациенты с деструктивными формами ТБ; зеленая часть диаграммы — пациенты с инфильтративным ТБ; серая часть диаграммы — пациенты с диссеминированными ТБ процессами

Определение Т-клеток, специфично отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2

У пациентов в день исследования получали 8 мл цельной венозной крови. В качестве антикоагулянта использовали гепарин-Na. Выделение мононуклеаров периферической крови проводили с использованием градиента фикола плотностью 1,077 г/см³ («ПанЭко»; Россия). Определение числа Т-клеток, специфически отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2, проводили с использованием набора ТиграТест® SARS-CoV-2 («ГЕНЕРИУМ»; Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Подсчет точек, соответствующих CD4⁺/CD8⁺-Т-лимфоцитам, секретирующим IFN γ , производили на приборе S6 Ultra (CTL; США).

Определение IgG к антигену SARS-CoV-2

У каждого пациента, включенного в исследование, получали 5 мл цельной венозной крови. В дальнейшем для постановки ИФА использовали сыворотку крови. Полуколичественное определение IgG к антигену SARS-CoV-2 в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора SARS-CoV-2-IgG-ИФА (ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Измерение оптической плотности проводили на планшетном ридере Sunrise™ (TECAN; США).

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software; США) с использованием теста Манна-Уитни и χ^2 -тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика лиц, включенных в исследование

В исследование в качестве экспериментальных групп были включены 69 человек (33 женщины и 36 мужчин), находящиеся на лечении в ФГБНУ «ЦНИИТ» по поводу ТБ легких и перенесшие COVID-19 в срок до 3-х месяцев до момента включения в исследование (31 человек: 15 женщин и 16 мужчин; средний возраст 38 ± 15 лет) и до 6 месяцев до момента включения в исследование (38 человек: 18 женщин и 20 мужчин; средний возраст 39 ± 15 лет). Большинство пациентов были с

инфильтративными ТБ-процессами (до 64%), до 28% — пациенты с деструктивными формами ТБ легких и 12,9% — пациенты с диссеминированными ТБ-процессами (рис. 1А–В). Всем больным назначали химиотерапию с учетом лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* и индивидуальной переносимости. Бактериовыделение у пациентов с диагнозом ТБ, перенесших COVID-19 в срок до 3-х и 6 месяцев до момента включения в исследование, было отмечено в 58% и 47% случаев соответственно.

В качестве групп сравнения в исследование включили 35 человек (25 женщин и 10 мужчин), перенесших COVID-19 в срок до 3-х месяцев (16 человек: 14 женщин и 2 мужчины; средний возраст 48 ± 13 лет) и 6 месяцев (19 человек: 11 женщин и 8 мужчин; средний возраст 40 ± 14 лет) до момента включения в исследование, без ТБ в анамнезе.

В качестве негативного контроля в исследование были включены здоровые лица (15 человек (7 женщин и 8 мужчин; средний возраст 49 ± 14 лет)) без ТБ и COVID-19 в анамнезе.

Определение IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса

В первой части исследования мы сравнили наличие и титр IgG, специфичных к антигенам SARS-CoV-2-вируса, у пациентов разных групп. Активный ТБ-процесс не влиял на наличие специфичных IgG в группах пациентов через 3 месяца после перенесенного COVID-19. Достоверных различий между данными группами не было выявлено (рис. 2).

Достоверные различия были показаны при сравнении наличия IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса в группах пациентов, перенесших COVID-19 за 6 месяцев до включения в исследование. Так же достоверно различался процент пациентов с положительным результатом теста на наличие IgG к антигенам вируса (рис. 2). Так, положительный результат теста на наличие антител к антигенам коронавируса был показан у 79% пациентов без активного ТБ, в то время как у больных с диагнозом ТБ легких только у 47,4% результат теста был положительный. У 12 пациентов с диагнозом ТБ легких (44,7%) через 6 месяцев после перенесенного COVID-19 IgG-антитела к антигенам SARS-CoV-2 не обнаружены (рис. 2).

Титр IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса различался как в группах пациентов без диагноза ТБ, так и у пациентов с диагнозом активный ТБ легких. Через 3 месяца после перенесенного COVID-19 выявлен максимальный титр антител к антигенам коронавируса как в группе пациентов с ТБ, так и без ТБ в анамнезе (рис. 3). Через 6 месяцев

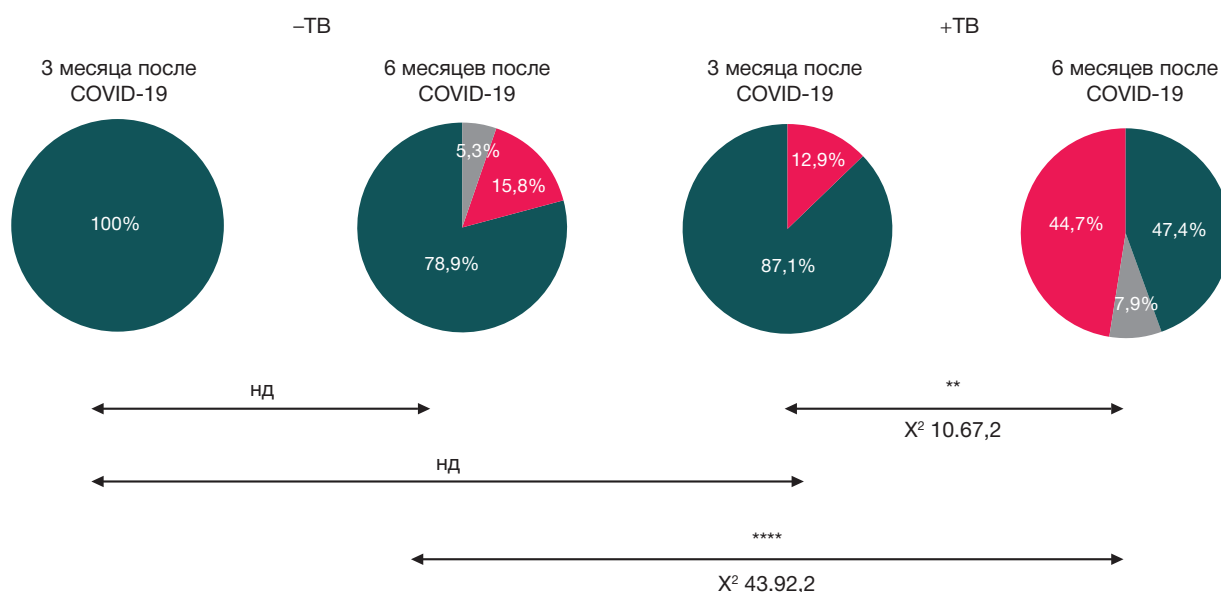


Рис. 2. Различия в уровне IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса в сыворотке крови лиц, перенесших COVID-19 в срок до 3-х и 6 месяцев до момента включения в исследование, без ТБ легких в анамнезе (-ТБ) и с диагнозом активный ТБ легких (+ТБ). Зеленая часть диаграммы — пациенты с положительным результатом теста на определение IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса; серая часть диаграммы — пациенты с неопределенным результатом теста на определение IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса; красная часть диаграммы — пациенты с отрицательным результатом теста на определение IgG к антигенам SARS-CoV-2-вируса. нд — различия не достоверны; ** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,0001$

после коронавирусной инфекции титр IgG снижался, причем достоверно большее уменьшение титра IgG-антител наблюдали в группе пациентов с активным ТБ (рис. 3).

Таким образом, было показано, что наличие ТБ влияет на титр специфичных к SARS-CoV-2-вирусу IgG и длительность иммунологической памяти.

Оценка иммунологической памяти к антигенам SARS-CoV-2-вируса

Оценку иммунологической памяти к антигенам SARS-CoV-2-вируса проводили с использованием набора ТиграТест® SARS-CoV-2. Данный набор позволяет определять количество Т-лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺, которые отвечают на стимуляцию специфичными для SARS-CoV-2 антигенами, и позволяет подсчитать отдельные активированные Т-клетки. Результаты теста интерпретировали в соответствии с рекомендациями фирмы изготовителя. Было показано, что, как и в случае с антителами к антигенам коронавируса, наличие активного ТБ-процесса влияет на длительность иммунологической Т-клеточной памяти к SARS-CoV-2. Так, в группах лиц без ТБ процент пациентов с положительным результатом теста не менялся в срок 6 месяцев после перенесенного COVID-19 (рис. 4). В то время как у пациентов с активным ТБ легких процент лиц с положительным результатом теста снижался к 6 месяцам после вирусной инфекции. Были также получены достоверные различия в количестве пациентов с положительным результатом ТиграТест® SARS-CoV-2 в группах пациентов с активным ТБ и без ТБ в анамнезе через 6 месяцев после перенесенного COVID-19 (60,5% и 84,2% соответственно) (рис. 4).

Одним из антигенов ТиграТест® SARS-CoV-2 тест-системы является S-белок SARS-CoV-2-вируса, что позволило нам изучить длительность иммунологической Т-клеточной памяти непосредственно к данному белку. При данном определении число пациентов с отрицательным результатом теста было больше, чем при стандартном определении наличия Т-клеток памяти к нескольким антигенам SARS-CoV-2-вируса (рис. 4–5) как в группе

пациентов с активным ТБ, так и без ТБ в анамнезе. Было показано, что в группе пациентов с ТБ легких в 57,9% случаев не обнаруживаются Т-клетки памяти к S-белку SARS-CoV-2 через 6 месяцев после перенесенного вирусного заболевания, в то время как в группе пациентов без ТБ легких таких пациентов всего 21% (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее была всесторонне исследована взаимосвязь между вирусом COVID-19 и ТБ, при этом основное внимание уделяли коинфекции и влиянию инфекции SARS-CoV-2 на латентный ТБ. В данном исследовании изучалось влияние ТБ на длительность иммунологической памяти на вирусные

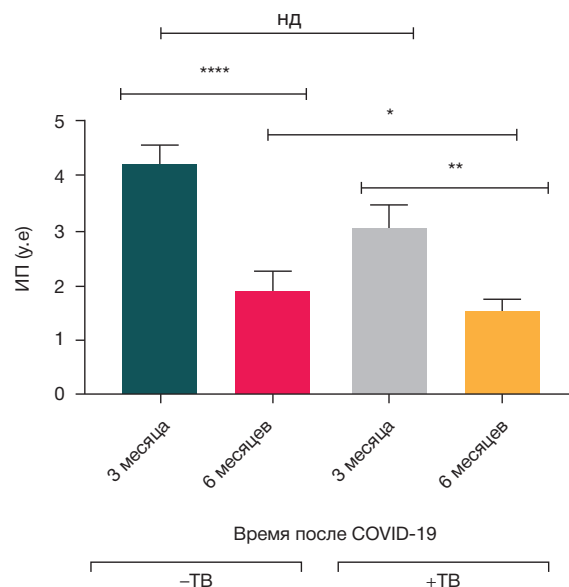


Рис. 3. Титр IgG к антигенам SARS-CoV-2 вируса в сыворотке крови лиц, перенесших COVID-19 в срок до 3-х и 6 месяцев до момента включения в исследование, без ТБ легких в анамнезе (-ТБ) и с диагнозом активный ТБ легких (+ТБ). Данные представлены в виде индекса позитивности (ИП), рассчитанного в соответствии с рекомендацией фирмы-изготовителя. нд — различия не достоверны; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,0001$

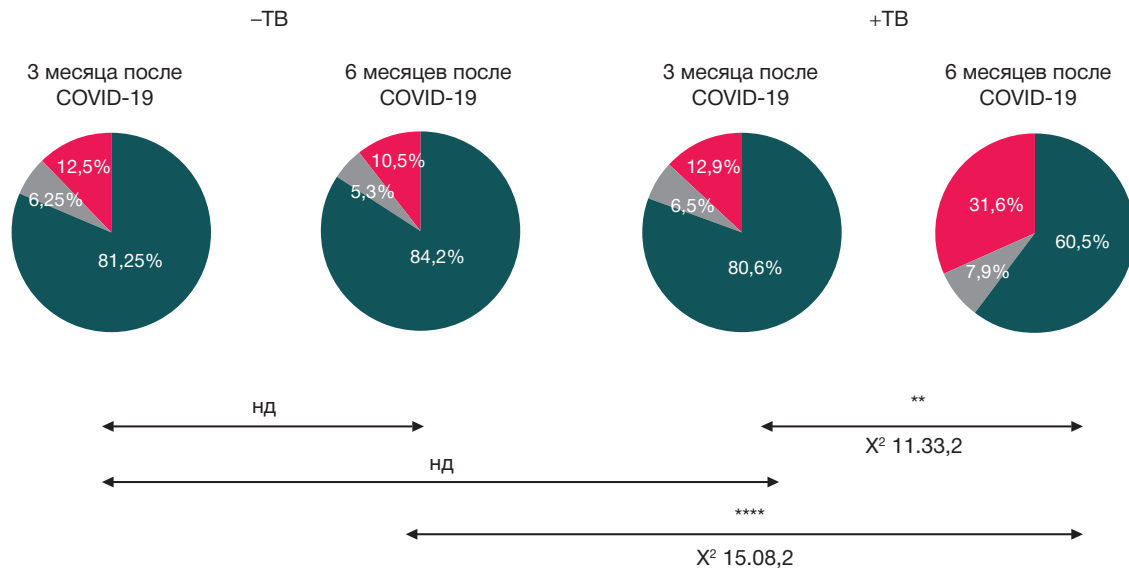


Рис. 4. Различия в количестве положительных, отрицательных или сомнительных результатов теста по определению CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток памяти к антигенам SARS-CoV-2-вируса у лиц, перенесших COVID-19 в срок до 3-х и 6 месяцев до момента включения в исследование с диагнозом ТБ легких и без ТБ легких. Зеленая часть диаграммы — пациенты с положительным результатом теста на определение Т-клеток памяти к антигенам SARS-CoV-2-вируса; серая часть диаграммы — пациенты с неопределенным результатом теста на определение Т-клеток памяти к антигенам SARS-CoV-2-вируса; красная часть диаграммы — пациенты с отрицательным результатом теста на определение Т-клеток памяти к антигенам SARS-CoV-2-вируса. (-TB) — пациенты, перенесшие COVID-19 без ТБ в анамнезе; (+TB) — пациенты с диагнозом ТБ, перенесшие COVID-19; нд — различия не достоверны; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

антигены. Наши результаты свидетельствуют о возможном снижении эффекторного ответа и усилении регуляторных механизмов иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2 под влиянием бактериальной инфекции.

Данные двух крупных (> 1000 человек) исследований показали, что титры циркулирующих IgG к SARS-CoV-2 хорошо поддерживаются в течение 3–4 месяцев [19, 23]. Вирусспецифичные В-клетки памяти, антитела и Т-клетки памяти были обнаружены в случаях легкого протекания COVID-19 примерно через 90 дней после заражения [24].

При изучении взаимодействия с латентным ТБ (ЛТБИ) в одной из работ было проведено обследование серопозитивных, бессимптомных инфицированных SARS-CoV-2 людей в Индии и сравнение иммунных реакций у

IGRA-положительных (ЛТБИ) и негативных людей [25]. Авторы показали, что у IGRA-положительных людей были более высокие уровни гуморального, цитокинового и острофазового ответов по сравнению с IGRA-отрицательными людьми, и, таким образом, пришли к выводу, что ЛТБИ может существенно влиять на системное воспаление, а также цитокиновый ответ и повышенную способность нейтрализующих антител у SARS-CoV-2-инфицированных людей.

Активное заболевание ТБ может негативно влиять на способность пациента генерировать SARS-CoV-2-специфический иммунный ответ, на основании анализа продукции IFN γ Т-клетками в когорте коинфицированных участников [26]. В цельной крови пациентов с ТБ/

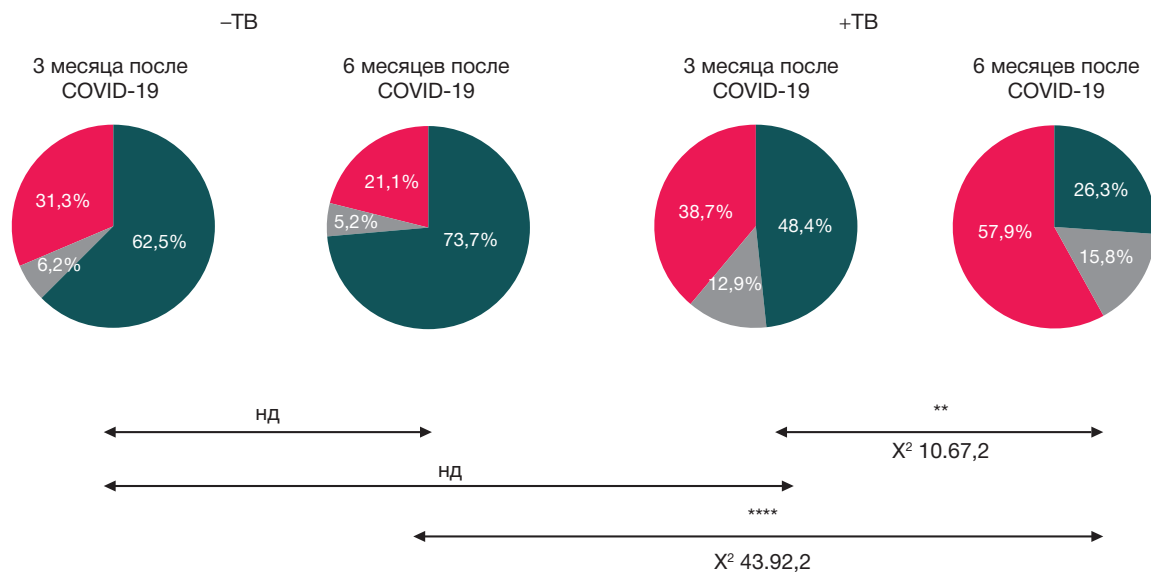


Рис. 5. Различия в количестве положительных, отрицательных или сомнительных результатов теста по определению CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток памяти к антигенам S-белка SARS-CoV-2-вируса у лиц, перенесших COVID-19 в срок до 3-х и 6 месяцев до момента включения в исследование с диагнозом ТБ легких (+ТБ) и без ТБ легких (-ТБ). Зеленая часть диаграммы — пациенты с положительным результатом теста на определение Т-клеток памяти к антигенам S-белка SARS-CoV-2-вируса; серая часть диаграммы — пациенты с неопределенным результатом теста на определение Т-клеток памяти к антигенам S-белка SARS-CoV-2-вируса; красная часть диаграммы — пациенты с отрицательным результатом теста на определение Т-клеток памяти к антигенам S-белка SARS-CoV-2-вируса. нд — различия не достоверны; ** — $p < 0,01$; **** — $p < 0,0001$

COVID-19 обнаружена самая низкая секреция IFN γ в ответ на стимуляцию пептидом SARS-CoV-2 по сравнению с пациентами с COVID-19 и пациентами с ЛТБИ/COVID-19. Авторы показали, что пациенты COVID-19 с латентным или активным ТБ все еще способны реагировать на Mtb-специфичные антигены. Однако только 20% больных активным ТБ с COVID-19 имели положительный ответ по сравнению с 64% пациентов с COVID-19 с ЛТБИ, что указывает на то, что активный ТБ угнетает COVID-19-специфичный иммунный ответ хозяина [26], и подтверждает полученные ранее в работе [24] результаты в отношении COVID-19 с ТБ/ВИЧ [27].

Проведено обследование 119 человек и сравнение иммунного профиля плазмы крови 14 пациентов с коинфекцией ТБ/COVID-19, пациентов с коинфекцией COVID-19, пациентов с коинфекцией ТБ и 20 здоровых лиц из контрольной группы посредством 27-компонентного мультиплексного анализа [28]. Авторы обнаружили, что уровни циркулирующего TNF имеют наиболее сильную связь с коинфекцией ТБ/COVID-19 по сравнению с COVID-19. Они также показали, что у коинфицированных

пациентов снижен SARS-CoV-2-специфичный ответ по ряду провоспалительных цитокинов и/или хемокинов, противовоспалительных цитокинов и факторов роста, а также (в меньшей степени) сделали вывод, что коинфекция негативно влияет на Mtb-специфичный ответ.

ВЫВОДЫ

В то время как в подавляющем количестве опубликованных исследований срок наблюдения за противовирусным иммунитетом у больных ТБ, перенесших COVID-19, ограничивался 3–4 месяцами [29], нами продемонстрировано снижение вирус-специфичного гуморального и клеточного иммунного ответа у пациентов с ТБ-коинфекцией через 6 месяцев после перенесенного COVID-19. Представленные нами данные указывают на сокращение длительности протективного антиковидного иммунитета под влиянием сопутствующей ТБ-инфекции. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение долгосрочных последствий коинфекции SARS-CoV-2 и Mtb.

Литература

- Kulesza J, Kulesza E, Koziński P, Karpik W, Broncel M, Fol M. BCG and SARS-CoV-2-What Have We Learned? *Vaccines* (Basel). 2022; 10 (10): 1641. DOI: 10.3390/vaccines10101641.
- Shah T, Shah Z, Yasmeen N, Baloch Z, Xia X. Pathogenesis of SARS-CoV-2 and Mycobacterium tuberculosis Coinfection. *Front Immunol*. 2022; 13: 909011. DOI: 10.3389/fimmu.2022.909011.
- Kang TG, Kwon KW, Kim K, Lee I, Kim MJ, Ha SJ, Shin SJ. Viral coinfection promotes tuberculosis immunopathogenesis by type I IFN signaling-dependent impediment of Th1 cell pulmonary influx. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 3155. DOI: 10.1038/s41467-022-30914-3.
- Wells G, Glasgow JN, Nargan K, Lumamba K, Madansei R, Maharaj K, et al. A high-resolution 3D atlas of the spectrum of tuberculous and COVID-19 lung lesions. *EMBO Mol Med*. 2022; 14 (11): e16283. DOI: 10.15252/emmm.202216283.
- Flores-Lovon K, Ortiz-Saavedra B, Cueva-Chicaña LA, Aperrigue-Lira S, Montes-Madariaga ES, Soriano-Moreno DR et al. Immune responses in COVID-19 and tuberculosis coinfection: A scoping review. *Front Immunol*. 2022; 13: 992743. DOI: 10.3389/fimmu.2022.992743.
- Shepelkova GS, Evstifeev VV, Berezovsky YS, Tarasov RV, Bagirov MA, Yermeev VV. Lung Inflammation Signature in Post-COVID-19 TB Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24 (22): 16315. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms242216315>.
- Chen Y, Wang Y, Fleming J, Yu Y, Gu Y, Liu C, Fan L, Wang X, Cheng M, Bi L, et al. Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. *medRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.03.10.20033795.
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19 (3): 141–54. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7.
- Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181 (7): 1489–501.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
- Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 2020; 586 (7830): 516–27. DOI: 10.1038/s41586-020-2798-3. 2020.
- Stephens DS and McElrath MJ. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA*. 2020; 324 (13): 1279–81. DOI: 10.1001/jama.2020.16656.
- Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. 2020; 183 (4): 1024–42.e21. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.037.
- Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol*. 2020; 21 (12): 1506–16. DOI: 10.1038/s41590-020-00814-z.
- Juno JA, Tan HX, Lee WS, Reynaldi A, Kelly HG, Wragg K, et al. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020; 26 (9): 1428–34. DOI: 10.1038/s41591-020-0995-0.
- Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19. *Cell*. 2020; 183 (5): 1340–1353.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.001.
- Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020; 183 (4): 996–1012.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.038.
- Oja AE, Saris A, Ghandour CA, Kragten NAM, Hogema BM, Nossent EJ, et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T- and B-cell responses in severe but not mild COVID-19 patients. *Eur J Immunol*. 2020; 50 (12): 1998–2012. DOI: 10.1002/eji.202048908.
- Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020; 21 (11): 1336–45. DOI: 10.1038/s41590-020-0782-6.
- Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020; 383 (18): 1724–34. DOI: 10.1056/NEJMoa2026116.
- Lipsitch M, Kahn R, Mina MJ. Antibody testing will enhance the power and accuracy of COVID-19-prevention trials. *Nat Med*. 2020; 26 (6): 818–9. DOI: 10.1038/s41591-020-0887-3.
- Nelke A, Bilich T, Heitmann JS, Maringer Y, Salih HR, Roerden M et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol*. 2021; 22 (1): 74–85. DOI: 10.1038/s41590-020-00808-x.
- Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006; 89 p.
- Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020; 370 (6521): 1227–30. DOI: 10.1126/science.abd7728.
- Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune

- Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*. 2021; 184(1): 169–83. e17. DOI: 10.1016/j.cell.2020.11.029.
25. Rajamanickam A, Kumar NP, Padmapriyadarsini C, Nancy A, Selvaraj N, Karunanithi K, et al. Latent tuberculosis co-infection is associated with heightened levels of humoral, cytokine and acute phase responses in seropositive SARS-CoV-2 infection. *J Infect*. 2021; 83 (3): 339–46. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.07.029.
 26. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021; 113 Suppl 1: S82–S7. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.090.
 27. Riou C, du Bruyn E, Stek C, Daroowala R, Goliath RT, Abrahams F, et al. Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection. *J Clin Invest*. 2021; 131 (12): e149125. DOI: 10.1172/JCI149125.
 28. Najafi-Fard S, Aiello A, Navarra A, Cuzzi G, Vanini V, Migliori GB, et al. Characterization of the immune impairment of patients with tuberculosis and COVID-19 coinfection. *Int J Infect Dis*. 2023; 130 (Suppl 1): S34–S42. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.03.021.
 29. Batha GES, Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Welson NN. Pathophysiology of Post-COVID syndromes: a new perspective. *Viral J*. 2022; 19: 158. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01891-2>.
- ## References
1. Kulesza J, Kulesza E, Koziński P, Karpik W, Broncel M, Fol M. BCG and SARS-CoV-2-What Have We Learned? *Vaccines (Basel)*. 2022; 10 (10): 1641. DOI: 10.3390/vaccines10101641.
 2. Shah T, Shah Z, Yasmeen N, Baloch Z, Xia X. Pathogenesis of SARS-CoV-2 and Mycobacterium tuberculosis Coinfection. *Front Immunol*. 2022; 13: 909011. DOI: 10.3389/fimmu.2022.909011.
 3. Kang TG, Kwon KW, Kim K, Lee I, Kim MJ, Ha SJ, Shin SJ. Viral coinfection promotes tuberculosis immunopathogenesis by type I IFN signaling-dependent impediment of Th1 cell pulmonary influx. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 3155. DOI: 10.1038/s41467-022-30914-3.
 4. Wells G, Glasgow JN, Nargan K, Lumamba K, Madansein R, Maharaj K, et al. A high-resolution 3D atlas of the spectrum of tuberculous and COVID-19 lung lesions. *EMBO Mol Med*. 2022; 14 (11): e16283. DOI: 10.15252/emmm.202216283.
 5. Flores-Lovon K, Ortiz-Saavedra B, Cueva-Chicaña LA, Aperrigue-Lira S, Montes-Madariaga ES, Soriano-Moreno DR et al. Immune responses in COVID-19 and tuberculosis coinfection: A scoping review. *Front Immunol*. 2022; 13: 992743. DOI: 10.3389/fimmu.2022.992743.
 6. Shepelkova GS, Evstifeev VV, Berezovskiy YS, Tarasov RV, Bagirov MA, Yermeev VV. Lung Inflammation Signature in Post-COVID-19 TB Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24 (22): 16315. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms242216315>.
 7. Chen Y, Wang Y, Fleming J, Yu Y, Gu Y, Liu C, Fan L, Wang X, Cheng M, Bi L, et al. Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. *medRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.03.10.20033795.
 8. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19 (3): 141–54. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7.
 9. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181 (7): 1489–501.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
 10. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 2020; 586 (7830): 516–27. DOI: 10.1038/s41586-020-2798-3.
 11. Stephens DS and McElrath MJ. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA*. 2020; 324 (13): 1279–81. DOI: 10.1001/jama.2020.16656.
 12. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. 2020; 183 (4): 1024–42.e21. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.037.
 13. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol*. 2020; 21 (12): 1506–16. DOI: 10.1038/s41590-020-00814-z.
 14. Juno JA, Tan HX, Lee WS, Reynaldi A, Kelly HG, Wragg K, et al. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020; 26 (9): 1428–34. DOI: 10.1038/s41591-020-0995-0.
 15. Meckliff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19. *Cell*. 2020; 183 (5): 1340–1353.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.001.
 16. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020; 183 (4): 996–1012.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.038.
 17. Oja AE, Saris A, Ghandour CA, Kragten NAM, Hogema BM, Nossent EJ, et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T- and B-cell responses in severe but not mild COVID-19 patients. *Eur J Immunol*. 2020; 50 (12): 1998–2012. DOI: 10.1002/eji.202048908.
 18. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020; 21 (11): 1336–45. DOI: 10.1038/s41590-020-0782-6.
 19. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020; 383 (18): 1724–34. DOI: 10.1056/NEJMoa2026116.
 20. Lipsitch M, Kahn R, Mina MJ. Antibody testing will enhance the power and accuracy of COVID-19-prevention trials. *Nat Med*. 2020; 26 (6): 818–9. DOI: 10.1038/s41591-020-0887-3.
 21. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, Maringer Y, Salih HR, Roerden M et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol*. 2021; 22 (1): 74–85. DOI: 10.1038/s41590-020-00808-x.
 22. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006; 89 p.
 23. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 2020; 370 (6521): 1227–30. DOI: 10.1126/science.abd7728.
 24. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*. 2021; 184(1): 169–83. e17. DOI: 10.1016/j.cell.2020.11.029.
 25. Rajamanickam A, Kumar NP, Padmapriyadarsini C, Nancy A, Selvaraj N, Karunanithi K, et al. Latent tuberculosis co-infection is associated with heightened levels of humoral, cytokine and acute phase responses in seropositive SARS-CoV-2 infection. *J Infect*. 2021; 83 (3): 339–46. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.07.029.
 26. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021; 113 Suppl 1: S82–S7. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.090.
 27. Riou C, du Bruyn E, Stek C, Daroowala R, Goliath RT, Abrahams F, et al. Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection. *J Clin Invest*. 2021; 131 (12): e149125. DOI: 10.1172/JCI149125.
 28. Najafi-Fard S, Aiello A, Navarra A, Cuzzi G, Vanini V, Migliori GB, et al. Characterization of the immune impairment of patients with tuberculosis and COVID-19 coinfection. *Int J Infect Dis*. 2023; 130 (Suppl 1): S34–S42. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.03.021.
 29. Batha GES, Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Welson NN. Pathophysiology of Post-COVID syndromes: a new perspective. *Viral J*. 2022; 19: 158. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01891-2>.

ТЕРАПИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ПРЕПАРАТАМИ ПЕРВОЙ ЛИНИИ: УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ И ВЛИЯНИЕ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Н. С. Баранова¹✉, М. С. Грис¹, А. А. Баранов¹, Н. Н. Спири¹, А. С. Артюхов², Д. В. Киселев¹

¹ Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

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

При рассеянном склерозе (РС) недостаточно изучено влияние на уровень цитокинов терапии препаратами, изменяющими течение рассеянного склероза (ПИТРС) — интерферона-бета (ИНФ-β) и глатирамера ацетата (ГА). Не установлено влияние персистирующей герпес-вирусной инфекции (ПГВИ) на продукцию цитокинов на фоне терапии ПИТРС. Не определена роль цитокинов и ПГВИ в развитии нежелательных явлений (НЯ) при лечении. Целью исследования было провести оценку концентрации цитокинов в сыворотке крови у больных РС, находящихся на терапии ПИТРС и без нее, определение связи между уровнем цитокинов, герпес-вирусной инфекцией и НЯ. Обследовано 36 больных (12 мужчин и 24 женщины, медиана возраста 38,50 (28,00; 48,50) года) с ремиттирующим течением РС (критерии McDonald, 2010). У 18 человек наблюдали реактивацию ПГВИ, у 10 она сопровождалась развитием вирус-ассоциированного обострения (ВАО) РС в анамнезе или при осмотре. Терапию ПИТРС проводили 30 пациентам: 16 человек — ИНФ-β, 14 человек — ГА. Системные НЯ были у 9 человек. Концентрацию 15 цитокинов в сыворотке крови определяли мультиплексной технологией xMAP. У пациентов с РС по сравнению с донорами были значимо повышены IL10 ($p < 0,01$) и IL33 ($p < 0,001$) при терапии ПИТРС и без нее, уровень IL31 возрос только у наивных больных ($p < 0,05$). Одновременно при РС были низкие значения IL1β, IL17F, IL22, IL25, IL23 и ФНО-α ($p < 0,01$). Не установлено различий в уровне цитокинов на фоне ИНФ-β или ГА. IL10 был повышен при реактивации ПГВИ ($p < 0,01$). Выявлены достоверные связи между высокими значениями IL31 и ВАО ($p < 0,01$), IL33 и ПГВИ ($p < 0,01$). На фоне терапии ИНФ-β при реактивации ПГВИ концентрация IL1β была значимо выше. Уровень цитокинов не различался при наличии или отсутствии системных НЯ. Последние преобладали при реактивации ПГВИ и ВАО. На уровень цитокинов при РС влияют терапия ПИТРС и герпес-вирусные инфекции.

Ключевые слова: рассеянный склероз, изменяющие течение рассеянного склероза препараты, цитокины, герпес, нежелательные явления

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям) в рамках программы УМНИК: Участник молодежного научно-инновационного конкурса (договоры №3560ГУ1/2014 от 23.09.2014, № 8815ГУ2/2015 от 17.12.2015).

Вклад авторов: Н. С. Баранова, М. С. Грис — планирование и дизайн исследования; М. С. Грис, А. С. Артюхов — сбор данных и проведение исследования; Н. С. Баранова, М. С. Грис, А. А. Баранов — анализ данных; все авторы — интерпретация данных; Н. С. Баранова, М. С. Грис — подготовка черновика рукописи; все авторы — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава РФ (протокол № 1 от «10» октября 2013 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Сергеевна Баранова
ул. Революционная, д. 5, г. Ярославль, 150000, Россия; baranova_ns@mail.ru

Статья получена: 23.04.2024 **Статья принята к печати:** 05.05.2024 **Опубликована онлайн:** 19.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.021

FIRST LINE THERAPY FOR MULTIPLE SCLEROSIS: CYTOKINE LEVELS AND THE IMPACT OF HERPESVIRUS INFECTION

Baranova NS¹✉, Gris MS¹, Baranov AA¹, Spirin NN¹, Artyuhov AS², Kiselev DV¹

¹ Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The effects of the disease modifying drugs (DMDs) for multiple sclerosis (MS), interferon beta (IFNβ) and glatiramer acetate (GA), on the cytokine levels of individuals with MS are poorly understood. The effects of persistent herpesvirus infection (PHVI) on the cytokine production during treatment with DMDs for MS have not been identified. The role of cytokines and PHVI in the development of the treatment-related adverse events (AEs) has not been determined. The study was aimed to assess serum cytokine levels in patients with MS treated or not treated with DMDs for MS, and to determine the relationships between the cytokine levels, herpesvirus infection, and AEs. A total of 36 patients (12 males and 24 females, median age 38.50 (28.00; 48.50) years) with relapsing-remitting MS (criteria by McDonald, 2010) were examined. PHVI reactivation was observed in 18 individuals; in 10 of them it was associated with the history of the virus-associated exacerbation (VAE) of MS or VAE detected during assessment. A total of 30 patients were treated with DMDs for MS: 16 individuals with IFNβ, 14 individuals with GA. Systemic AEs were reported in 9 individuals. Serum levels of 15 cytokines were determined using the xMAP multiplex technique. Patients with MS showed a significant increase in the levels of IL10 ($p < 0.01$) and IL33 ($p < 0.001$) relative to donors when treated or not treated with DMDs for MS; the increase in IL31 levels was reported only in naïve patients ($p < 0.05$). At the same time, individuals with MS had low levels of IL1β, IL17F, IL22, IL25, IL23, and TNFα ($p < 0.01$). We revealed no differences in cytokine levels in the context of taking IFNβ or GA. Elevated IL10 levels were associated with PHVI reactivation ($p < 0.01$). We revealed significant correlations between high levels of IL31 and VAE ($p < 0.01$), IL33 and PHVI ($p < 0.01$). The IL1β levels were significantly higher in individuals with PHVI reactivation treated with DMDs for MS. There were no differences in cytokine levels associated with the presence or absence of systemic AEs. The latter predominated in individuals with PHVI reactivation and VAE. The cytokine levels of individuals with MS are affected by treatment with DMDs for MS and herpesvirus infections.

Keywords: multiple sclerosis, disease modifying drugs for multiple sclerosis, cytokines, herpes, adverse events

Funding: the study was supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology (Innovation Promotion Foundation) within the framework of the program UMNIIK: Participant of the Youth Research and Innovation Contest (contracts No. 3560GU1/2014 dated 23.09.2014, No. 8815GU2/2015 dated 17.12.2015).

Author contribution: Baranova NS, Gris MS — study planning and design; Gris MS, Artyuhov AS — data acquisition and research procedure; Baranova NS, Gris MS, Baranov AA — data analysis; all authors — data interpretation; Baranova NS, Gris MS — manuscript drafting; all authors — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Ethics Committee of the Yaroslavl State Medical University (protocol No. 1 dated 10 October 2013). The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia S. Baranova
Revolutionnaya, 5, Yaroslavl, 150000, Russia; baranova_ns@mail.ru

Received: 23.04.2024 **Accepted:** 05.05.2024 **Published online:** 19.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.021

Рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы с аутоиммунно-воспалительными и нейродегенеративными механизмами развития [1]. Основными препаратами первой линии, изменяющими течение РС (ПИТРС), являются интерфероны-бета (ИНФ-β) и глатирамера ацетат (ГА) [1–3]. В настоящее время, несмотря на длительное и эффективное применение в клинической практике высокодозных ИНФ-β и ГА, точные механизмы их действия до конца не известны [4, 5]. Наиболее изучено влияние ИНФ-β и ГА на уровень провоспалительных (интерлейкин (IL) IL1β, IL6, IL17, IL23, фактор некроза опухоли — (ФНО-α), интерферон-γ (ИНФ-γ)) и противовоспалительных (IL4, IL10) цитокинов [6–8]. Только отдельные работы посвящены сравнительной оценке профилей цитокинов у пациентов без лечения и на фоне применения ИНФ-β или ГА [9–13]. В зарубежной литературе имеется ряд исследований по оценке влияния этих препаратов на уровень IL31 и IL33 [10, 11, 12, 14–17], в России подобных работ не проводилось. Кроме того, недостаточно изучен вклад герпес-вирусной инфекции, являющейся одним из этиологических факторов заболевания и триггером обострений у части больных РС, в формирование цитокинового профиля при терапии ИНФ-β или ГА [18, 19].

Ранее нами были установлены различия уровней цитокинов при обострении и ремиссии заболевания, а также их взаимосвязь с клиническими проявлениями реактивации персистирующей герпес-вирусной инфекции (ПГВИ) [20], без оценки влияния проводимой терапии, применяемых препаратов и наличия системных нежелательных явлений (НЯ) лечения. Настоящая работа является продолжением научных изысканий по данной проблеме.

Цель исследования — оценить концентрацию цитокинов в сыворотке крови у больных РС, находящихся на терапии высокодозными ИНФ-β или ГА, и без нее, определить связи между уровнем цитокинов, герпес-вирусной инфекцией и НЯ лечения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 36 больных (12 мужчин и 24 женщины). Критерии включения в исследование: наличие достоверного диагноза РС по критериям McDonald и соавт. (2010). Набор пациентов проводили в период с ноября 2013 г. по июнь 2017 г. Медиана возраста пациентов на момент исследования составила 38,50 (28,00; 48,50) года, возраст дебюта — 27,00 (21,50; 38,00) лет, длительность заболевания — 9,50 (3,50; 12,50) года. У всех пациентов было ремиттирующее течение РС (PPC), 29 (80,6%) человек находились в стадии ремиссии, у 7 (19,4%) имело место обострение заболевания. В соответствии с классификацией F. Lublin (2013), пациенты с PPC были поделены на пациентов с активным и неактивным РС (17 (47,2%) и 19 (52,8%) человек соответственно). Кроме того, среди пациентов с активным РС дополнительно учитывали пациентов с высоко активным РС (6 человек (35,3%), имеющие два и более обострений в год). Клиническую оценку неврологического статуса проводили с использованием двойной оценочной системы J. F. Kurtzke: шкалы неврологического дефицита (FS) и расширенной шкалы инвалидизации (EDSS).

30 (83,3%) пациентам проводили терапию ПИТРС (16 — высокодозные ИНФ-β и 14 — ГА) и 6 (16,7%) человек были без нее. У 18 (50,0%) пациентов имела место реактивация ПГВИ, а у 10 (27,8%) реактивация ПГВИ сопровождалась

развитием вирус-ассоциированного обострения (ВАО) РС в анамнезе или при осмотре. Переносимость проводимой терапии ПИТРС оценивали у 28 пациентов, ответивших на анкету/опросник по выявлению НЯ лечения. Анализировали общие (системные) НЯ, которые отмечены у 9 (32,1%) человек.

Для решения поставленных задач мы провели сравнительный анализ клинических характеристик групп пациентов с РС без терапии ПИТРС и отдельно при применении ИНФ-β или ГА (табл. 1).

Сравниваемые группы не различались по полу, возрасту дебюта заболевания, наличию серологических маркеров перенесенной инфекции ВЭБ. Возраст пациентов на момент осмотра был значимо выше в группе пациентов, принимающих любую ПИТРС, чем без них ($p < 0,05$). Подобная тенденция отмечена и для групп с ИНФ-β или ГА ($p > 0,05$).

Как в общей группе пациентов, принимающих ПИТРС, так и на фоне приема ИНФ-β или ГА, длительность заболевания и общее число обострений были достоверно больше, чем без лечения. Сумма неврологического дефицита и сроки достижения инвалидизации (шкала EDSS = 3) также были выше на фоне терапии ПИТРС, но без значимых различий. Несколько чаще в этих группах встречались признаки реактивации ПГВИ и ВАО, серологические маркеры перенесенной цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ).

У пациентов без терапии ПИТРС, по сравнению с лицами, принимающими их, наблюдалось более активное течение РС, чаще встречались обострение и высоко активный вариант болезни, появление новых очагов на МРТ. Были значимо больше среднегодовая частота обострений, выше скорость прогрессирования болезни и нарастания неврологического дефицита (СННД) ($p < 0,05$ и $p < 0,01$). Группы пациентов, принимавших ИНФ-β или ГА, не различались по большинству показателей. Однако выраженность системных НЯ была больше на фоне применения ИНФ-β, чем ГА.

В качестве контроля обследовано 18 практически здоровых доноров. Контрольная группа была сопоставима по полу — 7 (38,9%) мужчин и 11 (61,1%) женщин; возрасту — 39,10 (29,00; 49,60) лет с группой пациентов с РС. Критерии исключения: хронические неврологические заболевания; соматическая патология в стадии обострения. Всем проводили стандартный неврологический осмотр и тщательный сбор анамнеза с целью исключения заболеваний, способных повлиять на результаты обследования.

Всем больным РС и участникам группы контроля было проведено исследование сыворотки крови для определения уровня типоспецифических IgM и IgG к вирусу простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов, IgM и IgG к вирусу варицелла-зостер (ВВЗ), IgM и IgG к капсидному антигену VCA вируса Эпштейн-Барр (ВЭБ), IgG к ранним антигенам EA и ядерному антигену NA ВЭБ, IgM и IgG к ЦМВ твердофазным иммуноферментным методом с использованием стандартных наборов реактивов («Вектор-Бест»; г. Новосибирск, Россия) в клинико-диагностической лаборатории ООО «Сеть» (г. Ярославль) в соответствии с инструкцией производителя.

Концентрацию 15 цитокинов в сыворотке крови (IL1β, IL4, IL6, IL10, IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL23, IL25, IL31, IL33, ИНФ-γ, ФНО-α, sCD40L) определяли с помощью мультиплексной технологии xMAP на анализаторе Bio-PlexTM 200 System (Bio-Rad; США), с использованием соответствующих реагентов (Bio-Rad; США) в лаборатории

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов РС (Ме (25-й; 75-й перцентили), $n = 36$)

Показатель (пг/мл)	Без терапии ПИТРС ($n = 6$)	На фоне терапии ИНФ- β или ГА ($n = 30$)	На фоне терапии ИНФ- β ($n = 16$)	На фоне терапии ГА ($n = 14$)
Пол: мужчины, n (%)	2 (33,3)	10 (33,3)	6 (37,5)	4 (28,6)
женщины, n (%)	4 (66,7)	20 (66,7)	10 (62,5)	10 (71,4)
Возраст (годы)	24,50 (23,00; 39,00)	39,00* (34,00; 51,00)	38,50 (33,00; 45,00)	39,00 (35,00; 55,00)
Возраст дебюта (годы)	22,50 (22,00; 39,00)	27,00 (21,00; 37,00)	28,50 (22,00; 34,00)	27,00 (21,00; 39,00)
Длительность заболевания (лет)	1,00 (1,00; 4,00)	11,00** (6,00; 18,00)	11,00* (5,50; 12,50)	11,00* (6,00; 20,00)
Длительность ПИТРС (месяцы)		30,00 (9,00; 67,00)	30,00 (14,00; 73,00)	38,00 (29,00; 74,00)
Высокоактивный, n (%)	3 (50,0)	3 (10,0)*	2 (12,5)	1 (7,1)
Наличие обострения (клинически + МРТ), n (%)	3 (50,0)	4 (13,3)	3 (18,8)	1 (7,1)
Появление новых очагов на МРТ, n (%)	4 (66,7)	8 (26,7)	6 (37,5)	2 (14,3)*
EDSS на момент осмотра (баллы)	2,50 (1,50; 3,00)	3,50 (2,00; 4,50)	3,50 (2,50; 4,75)	3,50 (2,00; 4,50)
Общее число обострений	2,00 (1,00; 3,00)	4,00** (3,00; 6,00)	4,00* (3,00; 6,50)	4,50** (4,00; 6,00)
Среднегодовая частота обострений	1,50 (0,75; 2,00)	0,42* (0,32; 0,83)	0,58* (0,31; 0,90)	0,37* (0,32; 0,83)
Скорость прогрессирования (балл/год)	1,75 (0,75; 2,00)	0,28** (0,21; 0,50)	0,46* (0,22; 0,66)	0,23** (0,19; 0,50)
Продолжительность 1-й ремиссии (месяцы)	6,00 (2,00; 15,00)	12,00 (8,00; 24,00)	12,50 (9,00; 24,00)	12,00 (8,00; 24,00)
Скорость нарастания неврологического дефицита (СННД), (баллы)	3,00 (1,50; 5,00)	0,53** (0,33; 1,00)	0,73** (0,35; 1,00)	0,39** (0,27; 1,08)
Сумма неврологического дефицита по шкале FS (СНД), (баллы)	5,50 (2,00; 6,00)	7,50 (3,00; 9,00)	7,50 (4,00; 9,00)	7,50 (3,00; 9,00)
Сроки достижения инвалидизации EDSS = 3 (лет)	0,50 (0,00; 3,00)	3,50 (0,00; 7,00)	2,75 (0,00; 8,50)	4,00 (0,00; 7,00)
Длительность ПИТРС (месяцы)		34,50 (20,00; 74,00)	30,00 (14,00; 73,00)	38,00 (29,00; 74,00)
Системные нежелательные явления на ПИТРС, ($n = 28$), n (%)		9 (32,1) ($n = 28$)	5 (35,7) ($n = 14$)	4 (28,6)
Выраженность системных нежелательных явлений на ПИТРС (баллы)		6,00 (1,50; 11,00)	6,50 (5,00; 12,00)	2,00 (0,00; 11,00)
Наличие реактивации персистирующей герпесвирусной инфекции (ПГВИ), n (%)	2 (33,3)	16 (53,3)	10 (62, %)	6 (42,7)
Наличие вирус-ассоциированного обострения (ВАО), n (%)	1 (16,7)	9 (30,0)	5 (31,3)	4 (28,6%)
Наличие серологических маркеров перенесенной инфекции ВЭБ, n (%)	6 (100)	30 (100)	16 (100)	14 (100)
Наличие серологических маркеров перенесенной инфекции ЦМВ, n (%)	4 (66,7)	27 (90,0)	15 (93,8)	12 (85,7)

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой без терапии ПИТРС.

НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова МЗ России.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft; США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна-Уитни, а при сравнении трех и более групп — критерий Краскела-Уоллиса (для независимых групп). Результаты представлены в виде медианы (Ме) с интерквартильным размахом [25-й; 75-й перцентили], среднего значения (М) и стандартного отклонения (σ). Для сравнения выборок по качественному признаку и при оценке долей встречаемости признака использовали точный критерий Фишера. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Концентрация цитокинов у больных РС и доноров

В табл. 2 представлены результаты исследования цитокинов в группах больных РС без терапии ПИТРС, на ее фоне, отдельно при применении высокодозных ИНФ- β или ГА и доноров.

Во всех группах больных РС, по сравнению с контролем, имело место значимое увеличение концентрации IL10 ($p < 0,01$) и IL33 ($p < 0,001$). Достоверно более высокий уровень IL31, в сравнении с донорами, выявлен только в группе пациентов без терапии ПИТРС ($p < 0,05$). Отмечена тенденция к увеличению при РС концентрации IL4 ($p > 0,05$).

Напротив, концентрация IL1 β , IL17F, IL22, IL25 и ФНО- α у доноров была достоверно выше, чем у больных. Значения IL6, IL17A, IL21, IL23, ИНФ- γ и sCD40L практически не различались между группами.

Таблица 2. Концентрация (Ме (25-й; 75-й перцентили)) цитокинов в сыворотке крови больных РС и доноров

Показатель (пг/мл)	Доноры (n = 18)	Без терапии ПИ- ТРС (n = 6)	На фоне терапии ИНФ-β или ГА (n = 30)	На фоне терапии ИНФ-β (n = 16)	На фоне терапии ГА (n = 14)	p
	1	2	3	4	5	
IL1β	1,45 (0,16; 2,18)	0,04 (0,01; 0,05)	0,04 (0,00; 0,08)	0,04 (0,00; 0,09)	0,05 (0,00; 0,06)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,01$ $p_{1-5} < 0,01$
IL4	0,01 (0;73; 3,24)	2,39 (2,29; 2,89)	4,71 (2,22; 11,34)	4,88 (2,59; 8,30)	4,40 (1,75; 12,33)	н/з
IL6	1,36 (0,27; 3,68)	0,70 (0,44; 0,96)	0,52 (0,30; 1,11)	0,59 (0,37; 1,30)	0,52 (0,15; 0,74)	н/з
IL10	0,01 (0,00; 0,01)	3,52 (2,73; 5,25)	1,80 (0,90; 2,73)	2,26 (0,90; 2,73)	1,80 (0,60; 2,10)	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{1-4} < 0,01$ $p_{1-5} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-5} < 0,01$
IL17A	0,58 (0,00; 1,74)	0,64 (0,42; 0,99)	0,57 (0,28; 0,85)	0,54 (0,28; 0,82)	0,57 (0,14; 0,92)	н/з
IL17 F	6,76 (4,02; 10,6)	0,01 (0,00; 0,93)	0,01 (0,01; 0,62)	0,01 (0,01; 0,62)	0,01 (0,00; 1,25)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,001$ $p_{1-5} < 0,001$
IL21	0,01 (0,00; 0,49)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,01 (0,00; 0,89)	0,00 (0,00; 0,01)	н/з
IL22	47,43 (38,42; 72,64)	0,00 (0,00; 0,00)	0,24 (0,00; 0,32)	0,08 (0,00; 0,32)	0,32 (0,00; 0,63)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,001$ $p_{1-5} < 0,001$
IL23	80,11 (0,00; 114,44)	0,00 (0,00; 2,94)	5,51 (0,00; 8,81)	4,41 (0,00; 10,63)	5,51 (0,00; 8,81)	н/з
IL25	13,73 (6,10; 28,99)	0,27 (0,11; 0,32)	0,11 (0,00; 0,32)	0,11 (0,00; 0,32)	0,11 (0,00; 0,32)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,001$ $p_{1-5} < 0,001$
IL31	6,28 (2,87; 8,62)	11,61 (8,81; 15,73)	5,71 (3,00; 8,19)	6,95 (3,85; 10,37)	5,09 (2,63; 7,57)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} = 0,06$ $p_{2-5} < 0,05$
IL33	0,52 (0,17; 0,78)	3,63 (2,51; 9,55)	4,46 (1,12; 6,67)	5,43 (1,95; 9,14)	4,05 (1,12; 5,84)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,001$ $p_{1-5} < 0,001$
ИНФ-γ	0,45 (0,00; 5,33)	0,49 (0,49; 1,48)	0,49 (0,49; 1,23)	0,99 (0,49; 1,11)	0,49 (0,00; 1,48)	н/з
ФНО-α	17,38 (13,65; 31,61)	0,82 (0,49; 1,17)	0,52 (0,44; 0,74)	0,53 (0,45; 0,88)	0,51 (0,44; 0,68)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,001$ $p_{1-5} < 0,001$
sCD40L	110,81 (83,58; 122,55)	83,58 (34,36; 158,24)	76,77 (39,27; 112,69)	81,23 (44,29; 122,56)	65,97 (25,41; 95,32)	н/з

Примечание: н/з — различия между группами статистически не значимы.

Концентрация цитокинов у пациентов без терапии ПИТРС и на ее фоне

Обнаружено достоверное увеличение концентрации IL10 у наивных пациентов, в сравнении с больными, проходящими терапию ПИТРС. У пациентов без лечения выявлено значимое повышение IL31 в сравнении с общей группой пациентов, принимающих ПИТРС и ГА. При применении ИНФ-β данные различия имели уровень тенденции ($p = 0,06$). Уровни концентрации других цитокинов не различались между сравниваемыми группами ($p > 0,05$).

Не выявлено также различий в значениях исследуемых цитокинов в группах пациентов, принимавших ИНФ-β или ГА.

Повышение концентрации IL31 (более 15,08 пг/мл; $M + 3\sigma$ в группе доноров) имело место у 5 (13,8%) человек, чаще в группе пациентов, не принимающих ПИТРС. Высокие значения IL33 (более 3,40 пг/мл; $M + 3\sigma$ в группе доноров) отмечены у 20 (52,8%) пациентов, практически одинаково

часто во всех сравниваемых группах. Гиперпродукция IL31 только у одного из пяти пациентов носила изолированный характер, а в остальных (80,0%) случаях наблюдалось совместное повышение IL31 и IL33. Концентрация IL17A, IL17F и IL21 редко превышала нормальные референсные значения (соответственно, в 2,8%, 5,6% и 5,6% случаев) и всегда сочеталась с увеличением уровня IL33. Уровень других цитокинов ни в одном случае не превышал верхнюю границу нормы.

Герпес-вирусная инфекция, терапия ПИТРС и концентрация цитокинов

У 16 (53,3%) из 30 пациентов, принимающих ПИТРС, ИНФ-β или ГА, имела место реактивация ПГВИ. В 9 (30,8%) случаях она ассоциировалась с обострением РС (BAO+) в анамнезе или при осмотре. Значения IL10 были достоверно выше при реактивации ПГВИ, чем без нее (табл. 3). У этих

Таблица 3. Концентрация (Ме (25-й; 75-й перцентили)) цитокинов в сыворотке крови пациентов РС, находящихся на терапии ПИТРС, с клиническими проявлениями ПГВИ и без таковых

Показатель (пг/мл)	РС с клиническими проявлениями ПГВИ ($n = 16$)	РС без клинических проявлений ПГВИ ($n = 14$)
IL1 β	0,06 (0,02;0,08)	0,01 (0,00; 0,05)
IL4	4,88 (2;63;10,95)	4,61 (1,75; 13,11)
IL6	0,74 (0,23;1,81)	0,44 (0,30; 0,74)
IL10	2,57 (1,65;2,73)**	1,05 (0,30; 1,95)
IL17A	0,64 (0,35;0,96)	0,43 (0,14; 0,57)
IL17 F	0,01 (0,00;0,62)	0,01 (0,00; 1,25)
IL21	0,01 (0,00;2,38)	0,00 (0,00; 0,00)
IL22	0,32 (0,00;0,48)	0,00 (0,00; 0,32)
IL23	8,80 (0,00;11,36)	2,57 (0,00; 5,87)
IL25	0,22 (0,06;0,53)	0,06 (0,00; 0,11)
IL31	6,33 (4,47;8,81)	4,78 (2,63; 7,57)
IL33	5,43 (3,21;9,14)	2,23 (1,12; 5,84)
ИНФ- γ	0,74 (0,49;1,36)	0,49 (0,49; 0,99)
ФНО- α	0,53 (0,44;1,04)	0,52 (0,45; 0,68)
sCD40L	80,53 (41,85;111,52)	65,97 (25,41; 117,39)

Примечание: $p < 0,01$ между группами.

пациентов отмечена также тенденция к повышению уровня IL1 β , IL23 и IL33 ($p > 0,05$). Различий в концентрации других цитокинов между сравниваемыми группами не выявлено. Значения концентрации всех цитокинов у пациентов с наличием или отсутствием ВАО не различались между собой.

При применении любого из препаратов ПИТРС выявлены достоверные связи между высокими значениями IL31 и ВАО+ ($r = 0,51$; $p < 0,01$) и IL33 и ПГВИ ($r = 0,40$; $p < 0,05$).

На фоне терапии ИНФ- β при реактивации ПГВИ концентрация IL1 β была достоверно выше, чем без нее ($n = 10$, $0,07 \pm 0,06$ пг/мл и $n = 6$, $0,02 \pm 0,04$ пг/мл, $p < 0,05$, соответственно). В данной группе у пациентов с ВАО+ уровни IL17A и IL33 были выше, чем без него (соответственно, IL17A — $0,92 \pm 0,42$ пг/мл, $n = 5$; $0,49 \pm 0,52$ пг/мл, $n = 11$; IL33 — $10,70 \pm 5,79$ пг/мл, $n = 5$; и $5,63 \pm 7,83$ пг/мл, $n = 11$; $p < 0,05$ в обоих случаях). Выявлена также значимая связь между ВАО+ и высокими значениями IL31 и IL33 ($r = 0,56$ при $p < 0,05$ и $r = 0,52$ при $p < 0,05$ соответственно).

У пациентов, находящихся на терапии ГА, концентрация исследуемых цитокинов не различалась между группами пациентов с клиническими проявлениями реактивации ПГВИ или ВАО и без них. Кроме того, при ГА, в отличие от ИНФ- β , не выявлено связи высоких значений IL31, IL33 с ПГВИ или ВАО.

У пациентов без лечения ПИТРС анализ уровня цитокинов в зависимости от наличия или отсутствия реактивации ПГВИ или ВАО не проводили ввиду малого количества пациентов в каждой из групп.

Терапия ПИТРС, нежелательные явления, герпес-вирусная инфекция и концентрация цитокинов

Системные НЯ были зарегистрированы у 9 (32,1%) из 28 пациентов, находящихся на терапии ПИТРС. На фоне терапии ИНФ- β у 5 человек (35,7%; $n = 14$) имел место гриппоподобный синдром (ГПС), а у 4 пациентов (28,6%; $n = 14$), принимающих ГА, системная вазомоторная реакция. На фоне приема ИНФ- β , а также ГА при наличии или отсутствии системных НЯ не установлено различий

в концентрациях исследуемых цитокинов и частоте повышения уровня отдельных из них. Выраженность системных НЯ также не коррелировала со значениями цитокинов.

Отмечено преобладание системных НЯ в группах пациентов с реактивацией ПГВИ и ВАО+. Так, на фоне лечения ИНФ- β или ГА, НЯ встречались у 7 (46,7%) из 15 пациентов с ПГВИ и у 2 (15,4%) из 13 без него ($p = 0,08$). При ВАО их частота составила 44,4% (у 4 из 9 человек) и 26,3% (у 5 из 19 человек) ($p > 0,05$).

На фоне лечения ИНФ- β частота НЯ в группе с ПГВИ и без нее составила соответственно 44,4% (4 из 9 человек) и 20,0% (1 из 5 человек) (у 5 (35,7%; $n = 14$), а для ВАО — 40,0% (2 из 5 человек) и 33,0% (3 из 9 человек) ($p > 0,05$). При применении ГА частота НЯ для групп с реактивацией ПГВИ и без нее составила 50,0% (3 из 6 человек) и 12,5% (1 из 8 человек) ($p = 0,17$), при ВАО — 50,0% (2 из 4 человек) и 20,0% (2 из 10 человек).

На фоне лечения любым из препаратов ПИТРС выраженность системных НЯ также преобладала при реактивации ПГВИ, чем без нее. Так, в сравниваемых группах на фоне лечения ИНФ- β или ГА она составила 8,00 (1,00; 12,00) и 5,00 (2,00; 6,00) баллов, на фоне ИНФ- β — 8,00 (6,00; 15,00) и 6,00 (5,00; 6,00) баллов, а при применении ГА — 6,00 (0,00; 11,00) и 2,00 (0,50; 7,00) балла ($p > 0,05$ во всех группах). При ВАО подобная тенденция была отмечена только для ГА — 5,50 (0,00; 11,00) и 2,00 (1,00; 85,00) балла ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитокины у наивных больных РС, на фоне терапии ПИТРС и доноров

В литературе имеются лишь отдельные исследования, в которых проводили сравнение концентрации цитокинов у больных РС, не получающих ПИТРС, и у здоровых людей. Как правило, у наивных пациентов с РС регистрируются высокие значения ключевых провоспалительных цитокинов IL1 β , IL17A, IL17F, IL23, ФНО- α и ИНФ- γ [8, 12, 21–23]. Однако, по данным других авторов, уровень

ФНО- α в сыворотке крови у пациентов, не принимающих ПИТРС, не отличался от уровня в контрольной группе [9] или был ниже [10, 13]. Результаты последних работ согласуются и с нашими данными.

У пациентов с РС без лечения ПИТРС, в сравнении с донорами, обнаружено повышение в сыворотке крови и других воспалительных цитокинов: IL31 [11, 12, 14] и IL33 [10, 15–17]. Однако не было выявлено значимых различий значений IL33 у наивных больных и контроля [12].

Значения противовоспалительных IL4 и IL10 в сыворотке крови у больных РС без терапии, напротив, были ниже, чем у доноров [9, 13, 22, 23] или не отличались от контроля [21, 24]. Однако по данным других исследователей, концентрация IL10 у наивных больных РС была выше, чем у доноров [10, 12], что обнаружено и нами.

В целом, у наших больных РС без терапии ПИТРС, по сравнению с контролем, наблюдалось значимое повышение концентраций IL10, IL31, IL33 и тенденция к увеличению IL4. Одновременно обнаружены низкие значения IL1 β , IL17F, IL22, IL25, IL23 и ФНО- α . Уровни других цитокинов (IL6, IL17A, IL21, ИНФ- γ и sCD40L) не различались между группами сравнения. Подобные закономерности, кроме случаев с показателем IL31, обнаружены нами и при сравнении профиля цитокинов в сыворотке крови у пациентов с РС, находящихся на терапии ПИТРС, и здоровым контролем. Эти результаты в определенной мере согласуются с данными отдельных авторов, приведенными выше.

Цитокины у больных РС на фоне терапии ПИТРС и без нее

По данным литературы, у наивных пациентов выявлены значимо более высокие уровни IL1 β , IL17A, ФНО- α , ИНФ- γ и низкие уровни IL4, IL10 по сравнению с больными, принимавшими ИНФ- β или ГА [6, 9, 21, 23]. Отмечено, что терапия ИНФ- β 1а или ГА приводила к значительному понижению концентрации IL17, IL23, ФНО- α , ИНФ- γ и повышению уровня IL4 и IL10 [6, 11, 12, 22].

На фоне терапии ПИТРС обнаружено также снижение уровня IL31 [14], которое связывают с уменьшением количества CD3⁺CD45RO⁺Th2-клеток памяти, основных его продуцентов [25]. Подобная закономерность обнаружена и нами.

Уровень IL33 в плазме крови у пациентов, принимавших ИНФ- β 1а, был значительно ниже, чем у пациентов без лечения [15, 17]. Однако, по некоторым данным, терапия ГК или ПИТРС не влияла на концентрацию IL33 в плазме крови [16]. В нашем случае концентрация IL33 не различалась между группами пациентов на фоне лечения ПИТРС и без него.

В целом, у наших пациентов без лечения, в сравнении со всеми группами больных, находящихся на терапии ПИТРС, наблюдалось достоверное увеличение уровня IL10. Концентрация IL31 значимо преобладала у наивных больных, в сравнении с пациентами, находящимися на терапии ИНФ- β или ГА, а также ГА. Ранее нами было показано повышение концентрации IL10 при обострении РС [20]. В эту фазу болезни также достоверно чаще, чем в ремиссию, регистрировались высокие значения IL31 и сочетанная гиперпродукция IL33 с IL17A, IL17F, IL21 и IL31.

Обнаруженные различия в профиле цитокинов между наивными больными и пациентами, находящимися на лечении ПИТРС, при ремиссии или обострении, подтверждаются и результатами генетических

исследований [26]. При анализе полного транскриптома у больных РС, установлено нарушение экспрессии 8800 генов у пациентов, ранее не находившихся на терапии, в сравнении с лицами, находившимися на лечении ИНФ- β . Авторы считают, что у наивных пациентов продукты дисрегулируемых генов способствуют воспалительному повреждению ЦНС и препятствуют восстановлению мозга. При этом группы больных с полным (без обострений) и частичным клиническим ответом на терапию ИНФ- β различались по экспрессии 277 генов. Во время ремиссии или обострения у пациентов РС, не получающих лечения ПИТРС, состояние мононуклеарных клеток крови характеризуется крайней функциональной нестабильностью с развитием «цитокинового шторма» [26]. При этом длительная (более 5 лет) терапия ИНФ- β корректирует этот феномен через модуляцию экспрессии генов, приводя к состоянию цитокиновой гармонии.

Полагают, что при схожей клинической эффективности высокодозных ИНФ- β и ГА механизмы влияния их на иммунную систему могут быть различными [4, 8, 9, 14]. Однако нами не выявлено различий по уровню практически всех исследуемых цитокинов, между группами пациентов, принимавших ИНФ- β или ГА, за исключением ИНФ- γ , значения которого на фоне лечения ИНФ- β были достоверно выше, чем при применении ГА.

Цитокины и герпес-вирусная инфекция на фоне терапии ПИТРС, нежелательные явления

Полученные в нашем исследовании данные о различиях продукции IL10, IL31 и IL33 у пациентов РС на фоне лечения ПИТРС могут быть обусловлены влиянием реактивации герпес-вирусной инфекции.

Известно, что IL10 обладает мощным противовоспалительным действием и принимает активное участие в иммунном ответе при инфекционных, аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях [27]. В очагах РС наблюдается высокий уровень IL10, вырабатываемого плазмобластами и плазматическими клетками [28]. При вирусных инфекциях длительная персистенция антигена, сопровождающаяся увеличением выработки IL10, приводит к смещению фенотипа противовирусных Т-клеток преимущественно в IL10-продуцирующие Т-клетки [29]. При инфекции ВЭБ обнаружена выработка как вирусного гомолога человеческого IL10, так и обычного IL10 [30]. Более подробно возможные механизмы участия этих цитокинов в патогенезе РС были рассмотрены нами ранее [20]. По-видимому, они вовлечены в продукцию IL10 и в нашем случае, особенно у наивных больных.

Полученные нами данные об одновременном снижении концентрации противовоспалительного IL10 и провоспалительного IL31 на фоне терапии ПИТРС, по сравнению с наивными больными, наличие связи между IL31 и ВАО⁺, IL33 и реактивацией ПГВИ, подтверждают важную роль вирусов герпеса в патогенезе РС. Возможно, что на фоне терапии ИНФ- β или ГА в большей мере происходит синтез обычного IL10, а не его гомолога. Установлено, что лечение данными ПИТРС увеличивает системную активность невирусного IL10 [31, 32].

Кроме того, под воздействием ПИТРС происходит смещение фенотипа Th17-клеток, уменьшается число клеток, секретирующих IL17, и увеличивается число клеток, продуцирующих IL10, а также двойных клеток, секретирующих IL10 и IL17 [33]. Обнаружено переключение

фенотипа Т-клеток на регуляторные Т-клетки первого типа, уменьшение количества В-клеток памяти и продукции ими IL10 [24]. Это отчасти подтверждается обнаруженным нами снижением уровня IL10 на фоне приема ИНФ и ГА, при ухудшении клинических проявлений РС и практически одинаковой частоте выявления маркеров ВЭБ.

Все это может быть связано и с определенными противовирусными эффектами ПИТРС, преимущественно ИНФ-β. ИНФ-β снижает экспрессию латентного мембранного белка 2A EBV у пациентов, получающих лечение, оказывает ингибирующее влияние на представление антигена Т-клеткам, индуцирует апоптоз В-клеток памяти [34, 35]. Однако в нашем исследовании при реактивации ПГВИ только на фоне терапии ИНФ-β обнаружено достоверное увеличение концентрации IL1β. Кроме того, при применении ИНФ-β значения концентрации IL17A и IL33 были значимо выше в группе пациентов с ВАО+, чем без них. Выявлена также значимая связь между ВАО+ и высокими значениями IL31 и IL33. По-видимому, эти различия обусловлены более высокой частотой встречаемости ПГВИ на фоне лечения ИНФ-β, чем ГА.

Наиболее распространенными системными НЯ при лечении ИНФ-β является ГПС, а на терапию ГА — системная вазомоторная реакция [2, 3]. Считается, что развитие ГПС обусловлено временным, после введения препарата, повышением в плазме крови уровня IL6 и ФНО-α, их непосредственным пирогенным влиянием на гипоталамус [36, 37]. Появление на фоне приема ГА системных НЯ также связывают с увеличением концентрации IL6 и IL4 [30]. По нашим данным, наличие и выраженность системных НЯ на терапию ИНФ-β или ГА у больных РС не были связаны ни с одним из изучаемых цитокинов. Однако на фоне лечения любым препаратом ПИТРС отмечено преобладание частоты встречаемости системных НЯ в группах пациентов с реактивацией ПГВИ и наличием ВАО. При герпес-вирусной инфекции выраженность системных НЯ также была выше, в основном при наличии реактивации ПГВИ. В целом, результаты настоящего исследования согласуются с данными, полученными нами ранее [38]. Отсутствие значимых различий, по-видимому, связано с небольшим числом пациентов в сравниваемых группах.

Полагают, что на поздних этапах РС преобладают избыточная активация врожденного иммунитета, гибель нейронов и процессы нейродегенерации, в основе которых лежат дефекты регуляции пути ИНФ типа I [26]. Нарушение

экспрессии РНК и белка в путях, управляемых ИНФ типа I, опережает нарушения в клеточных путях Th1, Th2, Th17 и может нарушить адаптивный и врожденный иммунитет и способствовать гибели нейронов. Известно, что при вирусной инвазии и репликации ВПГ-1 наблюдаются повреждение ДНК, некроз, некроптоз клеток, аутофагия и выраженная активация врожденного иммунного ответа, а сигнальный путь ИНФ типа I является центральным в защите организма человека и индуцирует широкий спектр противовирусных белков и контроля за поступающими патогенами [39–41]. Эти процессы, приводят к выработке микроглией ФНО-α и IL1β, которые в свою очередь, способствуют транскрипции IL33 [42, 43]. Последний через IL4 инициирует синтез Th-2-клетками IL31 [44]. Совместная продукция этих цитокинов, по-видимому, усиливает провоспалительный потенциал каждого из них [45], что согласуются с обнаруженной в настоящем исследовании связи между IL33 и ПГВИ, IL31 и ВАО, а также одновременным увеличением уровня IL1β, IL31, IL33 в группе пациентов с реактивацией герпетической инфекции на фоне терапии ИНФ-β.

ВЫВОДЫ

В настоящее время РС рассматривают не только как воспалительное заболевание ЦНС, но и как следствие нарушений иммунной регуляции. Иммуномодулирующие свойства ИНФ-β и ГА нацелены именно на множественные пути врожденного и приобретенного иммунного ответа организма. На наш взгляд, одним из эпигенетических факторов, вызывающих усиленный врожденный иммунный ответ и нейродегенерацию при РС, является реактивация ПГВИ, сопровождающаяся обострением, а также отсутствие своевременно назначенной и адекватной терапии ПИТРС первой линии. В целом, на профиль цитокинов при РС влияют не только наличие или отсутствие терапии ПИТРС, фаза заболевания, но и инфекции, особенно герпес-вирусные (ВЭБ, ВПГ 1-го и 2-го типов, ВЗВ). Их вклад может различаться от применяемых препаратов ПИТРС (ИНФ или ГА). Наше исследование имеет ряд ограничений, связанных с небольшим числом участников, однако его результаты дополняют возможные иммунологические механизмы, вовлеченные в патогенез РС, эффекты от проводимой терапии ПИТРС первой линии — высокодозные ИНФ-β и ГА, а также сопутствующей герпес-вирусной инфекции.

Литература

1. Бойко А. Н., Гусев Е. И. Современные алгоритмы диагностики и лечения рассеянного склероза, основанные на индивидуальной оценке состояния пациента. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски. 2017; 117 (2–2): 92–106. DOI: 10.17116/jnevro20171172292-106.
2. Wynn DR. Enduring clinical value of copaxone® (glatiramer acetate) in multiple sclerosis after 20 years of use. Mult Scler Int. 2019; 2019: 7151685. DOI: 10.1155/2019/7151685.
3. Cohan SL, Hendin BA, Reder AT, Smoot K, Avila R, Mendoza JP, et al. Interferons and multiple sclerosis: lessons from 25 years of clinical and real-world experience with intramuscular interferon beta-1a (Avonex). CNS Drugs. 2021; 35 (7): 743–767. DOI: 10.1007/s40263-021-00822-z.
4. Melendez-Torres GJ, Armoiry X, Court R, Patterson J, Kan A, Auguste P, et al. Comparative effectiveness of beta-interferons and glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis: systematic review and network meta-analysis of trials including recommended dosages. BMC Neurol. 2018; 18 (1): 162. DOI: 10.1186/s12883-018-1162-9.
5. Zettl UK, Rommer PS, Aktas O, Wagner T, Richter J, Oschmann P, et al. Interferon beta-1a sc at 25 years: a mainstay in the treatment of multiple sclerosis over the period of one generation. Expert Rev Clin Immunol. 2023; 19 (11): 1343–1359. DOI: 10.1080/1744666X.2023.2248391.
6. D'Angelo C, Reale M, Costantini E, Di Nicola M, Porfiliio I, de Andrés C, et al. Profiling of canonical and non-traditional cytokine levels in interferon-β-treated relapsing-remitting multiple sclerosis patients. Front Immunol. 2018; 9: 1240; DOI: 10.3389/fimmu.2018.01240.
7. Rommer PS, Milo R, Han MH, Satyanarayan S, Sellner J, Hauer L,

- et al. Immunological aspects of approved MS therapeutics. *Front Immunol.* 2019; 11; 10: 1564. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01564.
8. Ganji A, Monfared ME, Shapoori S, Nourbakhsh P, Ghazavi A, Ghasami K, et al. Effects of interferon and glatiramer acetate on cytokine patterns in multiple sclerosis patients. *Cytokine.* 2020; 126: 154911. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154911.
 9. Trenova AG, Slavov GS, Manova MG, Kostadinova II. Cytokines and disability in interferon- β -1b treated and untreated women with multiple sclerosis. *Arch Med Res.* 2014; 45 (6): 495–500. DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.08.001.
 10. Sosvorova L, Kanceva R, Vcelak J, Kancheva L, Mohapl M, Starka L, et al. The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015; 36 (6): 564–71.
 11. Barcuțean LI, Romaniuc A, Maier S, Bajko Z, Motataianu A, Adina H, et al. Clinical and serological biomarkers of treatment's response in multiple sclerosis patients treated continuously with interferon- β -1b for more than a decade. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2018; 17: 780–92. DOI: 10.2174/1871527317666180917095256.
 12. Maier S, Motataianu A, Barcuțean L, Balint A, Hutanu A, Zoltan B, et al. A interferon- β 1a, an immunomodulatory in relapsing remitting multiple sclerosis patients. The effect on pro-inflammatory cytokines. *Farmacia.* 2020; 68 (1): 65–75. DOI: 10.31925/farmacia.2020.1.10.
 13. Melamud MM, Ermakov EA, Boiko AS, Kamaeva DA, Sizikov AE, Ivanova SA, et al. Multiplex analysis of serum cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 13829. DOI: 10.3390/ijms232213829
 14. de J Guerrero-García J, Rojas-Mayorquín AE, Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, Castañeda-Moreno VA, Mireles-Ramírez MA, et al. Decreased serum levels of sCD40L and IL-31 correlate in treated patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Immunobiology.* 2018; 223: 135–41. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.001.
 15. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2012; 142 (3): 308–19. DOI: 10.1016/j.clim.2011.11.007.
 16. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased concentrations of Interleukin-33 in the serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Oman Med J.* 2016; 31(1): 40–45. DOI: 10.5001/omj.2016.08.
 17. Alsahebhosoul F, Rahimmanesh I, Shajarian M, Etemadifar M, Sedaghat N, Hejazi Z, et al. Interleukin-33 plasma levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *BioMol Concepts.* 2017; 8 (1): 55–60. DOI: 10.1515/bmc-2016-0026.
 18. Donati D. Viral infections and multiple sclerosis. *Drug Discov Today Dis Models.* 2020; 32: 27–33. DOI: 10.1016/j.ddmod.2020.02.003.
 19. Bjornevik K, Münz C, Cohen JL, Ascherio A. Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol.* 2023; 19(3): 160–71. DOI: 10.1038/s41582-023-00775-5.
 20. Баранова Н. С., Грись М. С., Баранов А. А., Спирин Н. Н., Артюхов А. С., Шакирова К. М. и др. Клиническое значение определения цитокинов у пациентов с рассеянным склерозом и взаимосвязь с герпетической инфекцией. *Вестник РГМУ.* 2023; (4): 51–65. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.032.
 21. Якушина Т. И., Лиждвой В. Ю., Василенко И. А., Андрюхина О. М., Котов С. В. Дополнительные показатели для оценки эффективности терапии рассеянного склероза (предварительные данные). *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2013; 113 (2–2): 61–65.
 22. Оспельникова Т. П., Морозова О. В., Исаева Е. И., Лиждвой В. Ю., Колодяжная Л. В., Андреева С. А. и др. Мониторинг цитокинов у больных рассеянным склерозом в процессе лечения препаратом IFN- β -1a. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2015; 115 (8–2): 71–71.
 23. Сурсякова Н. В., Кукина Е. М., Байдина Т. В., Некрасова И. В., Трушников Т. Н. Вклад В-лимфоцитов в продукцию интерлейкина 17 при рассеянном склерозе. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2023; 15 (Прил. 1): 15–21. DOI: 10.14412/2074-2711-2023-1S-15-21.
 24. Masilionyte U, Gedvilaitė G, Kaikaryte K, Vilkeviciute A, Kiauciuniene L, Glebauskienė B, et al. IL-10 Gene Polymorphisms and IL-10 Serum Levels in Patients with Multiple Sclerosis in Lithuania. *Brain Sci.* 2022; 12 (6): 800. DOI: 10.3390/brainsci12060800.
 25. Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 448–60. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.10.048.
 26. Feng X, Bao R, Li L, Deisenhammer F, Arnason BGW, Reder AT. Interferon- β corrects massive gene dysregulation in multiple sclerosis: Short-term and long-term effects on immune regulation and neuroprotection. *EBioMedicine.* 2019; 49: 269–283. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.09.059.
 27. Kwilas AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology.* 2015; 96: 55–69. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020.
 28. Machado-Santos J, Saji E, Troscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain.* 2018; 141 (7): 2066–2082. DOI: 10.1093/brain/awy151.
 29. Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res.* 2017; 2017: 6104054. DOI: 10.1155/2017/6104054.
 30. Schönrich G, Abdelaziz MO, Raftery MJ. Epstein-Barr virus, interleukin-10 and multiple sclerosis: A me´ nage à trois. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1028972. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1028972.
 31. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune deviation. *J Neuroimmunol.* 1998; 92: 113–21. DOI: 10.1016/S0165-5728(98)00191-X.
 32. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM, et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology.* 1998; 50 (5): 1294–300. DOI: 10.1212/wnl.50.5.1294.
 33. Zhang L, Yuan S, Cheng G, Guo B. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS One.* 2011; 6 (12): 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0028432.
 34. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M, et al. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 2016; 94 (9): 886–894. DOI: 10.1038/icb.2016.55.
 35. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2022; 22: 734–50. DOI: 10.1038/s41577-022-00718-z.
 36. Dinarello CA, Bernheim HA, Duff GW, Le HV, Nagabhushan TL, Hamilton NC, et al. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *J Clin Invest.* 1984; 74 (3): 906–13. DOI: 10.1172/JCI111508.
 37. Langer-Gould A, Moses HH, Murray TJ. Strategies for managing the side effects of treatments for multiple sclerosis. *Neurology.* 2004; 63 (11): S35–41. DOI: 10.1212/wnl.63.11_suppl_5.s35.
 38. Грись М. С., Баранова Н. С., Спирин Н. Н., Касаткин Д. С., Киселев Д. В., Шипова Е. Г. Рассеянный склероз у пациентов с герпесвирусной инфекцией: особенности клинической картины и течения. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2021; 13 (Прил. 1): 21–26. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1S-21-26.
 39. Su C, Zhan G, Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Viol J.* 2016; 13: 38. DOI: 10.1186/s12985-016-0495-5.
 40. Danastas K, Miranda-Saksena M, Cunningham AL. Herpes simplex virus type 1 interactions with the interferon system. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (14): 5150. DOI: 10.3390/ijms21145150.
 41. Verzosa AL, McGeever LA, Bhark SJ, Delgado T, Salazar N, Sanchez EL. Herpes simplex virus 1 infection of neuronal and nonneuronal cells elicits specific innate immune responses and immune evasion mechanisms. *Front Immunol.* 2021; 12: 644664. DOI: 10.3389/fimmu.2021.644664.
 42. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010; 130 (2): 172–80. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x.
 43. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43: 1383–91. DOI:

10.1016/j.biocel.2011.06.003.

44. Furue M, Yamamura K, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy*. 2018; 73 (1): 29–36. DOI:

10.1111/all.13239.

45. Di Salvo E, Ventura-Spagnolo E, Casciaro M, Navarra M, Gangemi S. IL-33/IL-31 axis: a potential inflammatory pathway. *Mediator Inflamm*. 2018; 2018: 3858032. DOI: 10.1155/2018/3858032.

References

1. Bojko AN, Gusev EI. Sovremennye algoritmy diagnostiki i lecheniya rassejannogo skleroza, osnovannye na individual'noj ocenke sostojaniya pacienta. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova. Specvypuski*. 2017; 117 (2–2): 92–106. DOI: 10.17116/jnevro20171172292-106. Russian.
2. Wynn DR. Enduring clinical value of copaxone® (glatiramer acetate) in multiple sclerosis after 20 years of use. *Mult Scler Int*. 2019; 2019: 7151685. DOI: 10.1155/2019/7151685.
3. Cohan SL, Hendin BA, Reder AT, Smoot K, Avila R, Mendoza JP, et al. Interferons and multiple sclerosis: lessons from 25 years of clinical and real-world experience with intramuscular interferon beta-1a (Avonex). *CNS Drugs*. 2021; 35 (7): 743–767. DOI: 10.1007/s40263-021-00822-z.
4. Melendez-Torres GJ, Armoiry X, Court R, Patterson J, Kan A, Auguste P, et al. Comparative effectiveness of beta-interferons and glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis: systematic review and network meta-analysis of trials including recommended dosages. *BMC Neurol*. 2018; 18 (1): 162. DOI: 10.1186/s12883-018-1162-9.
5. Zettl UK, Rommer PS, Aktas O, Wagner T, Richter J, Oschmann P, et al. Interferon beta-1a sc at 25 years: a mainstay in the treatment of multiple sclerosis over the period of one generation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2023; 19 (11): 1343–1359. DOI: 10.1080/1744666X.2023.2248391.
6. D'Angelo C, Reale M, Costantini E, Di Nicola M, Porfilio I, de Andrés C, et al. Profiling of canonical and non-traditional cytokine levels in interferon-β-treated relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Front Immunol*. 2018; 9: 1240. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01240.
7. Rommer PS, Milo R, Han MH, Satyanarayan S, Sellner J, Hauer L, et al. Immunological aspects of approved MS therapeutics. *Front Immunol*. 2019; 11: 10: 1564. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01564.
8. Ganji A, Monfared ME, Shapoori S, Nourbakhsh P, Ghazavi A, Ghasami K, et al. Effects of interferon and glatiramer acetate on cytokine patterns in multiple sclerosis patients. *Cytokine*. 2020; 126: 154911. DOI: 10.1016/j.cyt.2019.154911.
9. Trenova AG, Slavov GS, Manova MG, Kostadinova II. Cytokines and disability in interferon-β-1b treated and untreated women with multiple sclerosis. *Arch Med Res*. 2014; 45 (6): 495–500. DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.08.001.
10. Sosvorova L, Kanceva R, Vcelak J, Kancheva L, Mohapl M, Starka L, et al. The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015; 36 (6): 564–71.
11. Barcuțean LI, Romaniuc A, Maier S, Bajko Z, Motaitianu A, Adina H, et al. Clinical and serological biomarkers of treatment's response in multiple sclerosis patients treated continuously with interferonβ-1b for more than a decade. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2018; 17: 780–92. DOI: 10.2174/1871527317666180917095256.
12. Maier S, Motaitianu A, Barcuțean L, Balint A, Hutanu A, Zoltan B, et al. A interferon-β 1a, an immunomodulatory in relapsing remitting multiple sclerosis patients. The effect on pro-inflammatory cytokines. *Farmacologia*. 2020; 68 (1): 65–75. DOI: 10.31925/farmacologia.2020.1.10.
13. Melamed MM, Ermakov EA, Boiko AS, Kamaeva DA, Sizikov AE, Ivanova SA, et al. Multiplex analysis of serum cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23: 13829. DOI: 10.3390/ijms232213829.
14. de J Guerrero-García J, Rojas-Mayorquín AE, Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, Castañeda-Moreno VA, Mireles-Ramírez MA, et al. Decreased serum levels of sCD40L and IL-31 correlate in treated patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Immunobiology*. 2018; 223: 135–41. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.001.
15. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2012; 142 (3): 308–19. DOI: 10.1016/j.clim.2011.11.007.
16. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased concentrations of Interleukin-33 in the serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Oman Med J*. 2016; 31(1): 40–45. DOI: 10.5001/omj.2016.08.
17. Alsahebhosoul F, Rahimmanesh I, Shajarian M, Etemadifar M, Sedaghat N, Hejazi Z, et al. Interleukin-33 plasma levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *BioMol Concepts*. 2017; 8 (1): 55–60. DOI: 10.1515/bmc-2016-0026.
18. Donati D. Viral infections and multiple sclerosis. *Drug Discov Today Dis Models*. 2020; 32: 27–33. DOI: 10.1016/j.ddmod.2020.02.003.
19. Bjornevik K, Münz C, Cohen JL, Ascherio A. Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol*. 2023; 19 (3): 160–71. DOI: 10.1038/s41582-023-00775-5.
20. Baranova NS, Gris MS, Baranov AA, Spirin NN, Artyuhov AS, Shakirova KM, et al. Clinical significance of cytokine counting in patients with multiple sclerosis and its relationship with herpes infection. *Bulletin of RSMU*. 2023; (4): 48–62. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.032.
21. Jakushina TI, Likhodov VYu, Vasilenko IA, Andriuhina OM, Kotov SV. Dopolnitel'nye pokazateli dlja ocenki jeffektivnosti terapii rassejannogo skleroza (predvaritel'nye dannye). *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova. Specvypuski*. 2013; 113 (2–2): 61–65. Russian.
22. Ospelnikova TP, Morozova OV, Isaeva EI, Likhodov VYu, Kolodjashnaja LV, Andreeva SA, i dr. Monitoring citokinov u bol'nyh rassejannym sklerozom v processe lechenija preparatom IFNβ-1a. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. Specvypuski*. 2015; 115 (8–2): 71–71. Russian.
23. Sursjakova NV, Kuklina EM, Bajdina TV, Nekrasova IV, Trushnikova TN. Vklad V-limfocitov v produkciju interlejkina 17 pri rassejannom skleroze. *Nevrologija, nejropsihiatrija, psichosomatika*. 2023; 15 (Pril. 1): 15–21. DOI: 10.14412/2074-2711-2023-1S-15-21. Russian.
24. Masliornyte U, Gedvilaitė G, Kaikaryte K, Vilkeviciute A, Kriaciuniene L, Glebauskienė B, et al. IL-10 Gene Polymorphisms and IL-10 Serum Levels in Patients with Multiple Sclerosis in Lithuania. *Brain Sci*. 2022; 12 (6): 800. DOI: 10.3390/brainsci12060800.
25. Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133: 448–60. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.10.048.
26. Feng X, Bao R, Li L, Deisenhammer F, Arnason BGW, Reder AT. Interferon-β corrects massive gene dysregulation in multiple sclerosis: Short-term and long-term effects on immune regulation and neuroprotection. *EBioMedicine*. 2019; 49: 269–283. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.09.059.
27. Kwilas AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*. 2015; 96: 55–69. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020.
28. Machado-Santos J, Saji E, Troscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabrieli G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018; 141 (7): 2066–2082. DOI: 10.1093/brain/awy151.
29. Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res*. 2017; 2017: 6104054. DOI: 10.1155/2017/6104054.
30. Schönrich G, Abdelaziz MO, Raftery MJ. Epstein-Barr virus, interleukin-10 and multiple sclerosis: A me' nage à trois. *Front. Immunol*. 2022; 13: 1028972. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1028972.
31. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinary A, Rawashdeh H, Honigman S, et

- al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune deviation. *J Neuroimmunol.* 1998; 92: 113–21. DOI: 10.1016/s0165-5728(98)00191-x.
32. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Peppler R, Yu M, Mathisen PM, et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology.* 1998; 50 (5): 1294–300. DOI: 10.1212/wnl.50.5.1294.
 33. Zhang L, Yuan S, Cheng G, Guo B. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS One.* 2011; 6 (12): 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0028432.
 34. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M, et al. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 2016; 94 (9): 886–894. DOI: 10.1038/icb.2016.55.
 35. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2022; 22: 734–50. DOI: 10.1038/s41577-022-00718-z.
 36. Dinarello CA, Bernheim HA, Duff GW, Le HV, Nagabhushan TL, Hamilton NC, et al. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *J Clin Invest.* 1984; 74 (3): 906–13. DOI: 10.1172/JCI111508.
 37. Langer-Gould A, Moses HH, Murray TJ. Strategies for managing the side effects of treatments for multiple sclerosis. *Neurology.* 2004; 63 (11): S35–41. DOI: 10.1212/wnl.63.11_suppl_5.s35.
 38. Gris MS, Baranova NS, Spirin NN, Kasatkin DS, Kiselev DV, Shipova EG. Rassejannyj skleroz u pacientov s herpesvirusnoj infekciej: osobennosti klinicheskoy kartiny i techenija. *Nevrologija, nejropsihiatrija, psihosomatika.* 2021; 13 (Pril. 1): 21–26. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1S-21-26. Russian.
 39. Su C, Zhan G, Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Virol J.* 2016; 13: 38. DOI: 10.1186/s12985-016-0495-5.
 40. Danastas K, Miranda-Saksena M, Cunningham AL. Herpes simplex virus type 1 interactions with the interferon system. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (14): 5150. DOI: 10.3390/ijms21145150.
 41. Verzosa AL, McGeever LA, Bhark SJ, Delgado T, Salazar N, Sanchez EL. Herpes simplex virus 1 infection of neuronal and nonneuronal cells elicits specific innate immune responses and immune evasion mechanisms. *Front Immunol.* 2021; 12: 644664. DOI: 10.3389/fimmu.2021.644664.
 42. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010; 130 (2): 172–80. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x.
 43. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43: 1383–91. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.06.003.
 44. Furue M, Yamamura K, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy.* 2018; 73 (1): 29–36. DOI: 10.1111/all.13239.
 45. Di Salvo E, Ventura-Spagnolo E, Casciaro M, Navarra M, Gangemi S. IL-33/IL-31 axis: a potential inflammatory pathway. *Mediator Inflamm.* 2018; 2018: 3858032. DOI: 10.1155/2018/3858032.

КОГЕРЕНТНОСТЬ ЭЭГ У ДЕТЕЙ С ДЦП НА ФОНЕ РЕАБИЛИТАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕЙРОИНТЕРФЕЙСА «МОЗГ – КОМПЬЮТЕР – ЭКСОСКЕЛЕТ КИСТИ»

В. Б. Павленко¹ ✉, С. В. Власенко^{1,2}, Е. Н. Чуян¹, Д. В. Павленко¹, Л. С. Орехова¹, Е. А. Бирюкова¹

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

² Научно-исследовательский институт детской курортологии, физиотерапии и медицинской реабилитации, Евпатория, Россия

Ранее было показано, что сеансы нейрореабилитации с применением неинвазивного интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти» в сочетании с традиционным курортным лечением снижают у детей с детским церебральным параличом (ДЦП) спастичность мышц кисти и улучшают двигательные навыки. Однако когерентность показателей электроэнцефалограммы (ЭЭГ) при проведении таких сеансов не анализировали. Целью работы было провести анализ изменений когерентности в частотных диапазонах θ -, α - и β -ритмов ЭЭГ при проведении комплексного санаторно-курортного лечения детей с ДЦП с курсом нейрореабилитации, а также оценить взаимосвязь этих изменений с показателями двигательной активности больных. Коэффициенты когерентности внутри- и межполушарных связей фронтальных, центральных и теменных областей больших полушарий определяли во время кинестетического представления движений у 23 детей обоего пола в возрасте 7–15 лет, имевших диагноз «спастическая диплегия». Выявлен статистически значимый ($p < 0,05$) рост когерентности внутриполушарных связей в диапазоне α -ритмов и снижение в диапазонах θ -, β 1-ритмов, сопровождающийся статистически значимым ($p < 0,001$) улучшением двигательных функций по шкале Бартел. Обнаружена связь между когерентностью α -ритма в паре отведений C4–CP4 и величиной индекса Бартел ($r = 0,52$; $p = 0,04$). Выявленные особенности изменений когерентности внутриполушарных связей в диапазонах исследованных ритмов ЭЭГ могут быть использованы в качестве индикаторов нейропластичности у детей с ДЦП при проведении реабилитационных мероприятий, а также для разработки новых версий программ-классификаторов для нейроинтерфейсов.

Ключевые слова: дети, церебральный паралич, интерфейс мозг–компьютер, когерентность ЭЭГ

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда и Республики Крым № 22-15-20035, <https://rscf.ru/project/22-15-20035/>

Вклад авторов: В. Б. Павленко, Е. Н. Чуян — планирование исследований, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; С. В. Власенко — планирование исследований, сбор данных, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Д. В. Павленко — сбор данных, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Е. А. Бирюкова, Л. С. Орехова — сбор данных, анализ данных, подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 1 от 25.01.2022). Получено добровольное информированное согласие от родителей на участие детей в эксперименте.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Борисович Павленко
пр. Вернадского, д. 4, г. Симферополь, 295007, Россия; vpav55@gmail.com

Статья получена: 08.05.2024 **Статья принята к печати:** 29.05.2024 **Опубликована онлайн:** 23.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.020

EEG COHERENCE IN CHILDREN WITH CEREBRAL PALSY AGAINST THE BACKGROUND OF REHABILITATION EMPLOYING A BRAIN-COMPUTER-HAND EXOSKELETON NEUROINTERFACE

Pavlenko VB¹ ✉, Vlasenko SV^{1,2}, Chuyan EN¹, Pavlenko DV¹, Orekhova LS¹, Birukova EA¹

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

² Research Institute of Children's Balneology, Physiotherapy and Medical Rehabilitation, Yevpatoria, Russia

Neurorehabilitation courses employing a non-invasive brain-computer-hand exoskeleton interface in combination with traditional balneotherapy have been shown to reduce spasticity of hand muscles and improve motor skills in children with cerebral palsy. However, the coherence of the electroencephalogram (EEG) parameters have never been analyzed during such sessions. This study aimed to analyze the coherence changes in the bands of θ , α and β rhythms recorded in the EEG as part of balneotherapy combined with a course of neurorehabilitation prescribed to children with cerebral palsy, and to investigate the relationship of these changes with the indicators of motor activity. The study involved 23 children aged 7 through 15 years, both genders, diagnosed with spastic diplegia; we established coherence coefficients for the intra- and interhemispheric connections of the frontal, central, and parietal regions of the large hemispheres in the context of actions provoking kinesthetic imagery. A significant ($p < 0.05$) growth of the intrahemispheric connections coherence was registered for α rhythms, decline thereof — for θ , β 1 rhythms, the fluctuations accompanied by a significant ($p < 0.001$) improvement of the motor functions on the Barthel scale. We identified a relationship between — rhythm coherence in the pair of C4–CP4 leads and the value of the Barthel index ($r = 0.52$; $p = 0.04$). The specifics of changes in the coherence of intrahemispheric connections within the studied rhythms can be used as indicators of neuroplasticity in children with cerebral palsy during rehabilitation, and support development of the new versions of the neurointerfaces classifier programs.

Keywords: children, cerebral palsy, brain–computer interfaces, EEG coherence

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation and the Republic of Crimea grant No. 22-15-20035, <https://rscf.ru/en/project/22-15-20035/>

Author contribution: Pavlenko VB, Chuyan EN — study planning, data analysis and interpretation, manuscript drafting; Vlasenko SV — study planning, data collection, data analysis and interpretation, manuscript drafting; Pavlenko DV — data collection, data analysis and interpretation, manuscript drafting; Birukova EA, Orekhova LS — data collection, data analysis, manuscript drafting.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the V.I. Vernadsky Crimean Federal University ethics committee (Minutes #1 of January 25, 2022). Parents submitted signed informed consent forms allowing their children to participate in the experiment.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir B. Pavlenko
pr. Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007, Russia; vpav55@gmail.com

Received: 08.05.2024 **Accepted:** 29.05.2024 **Published online:** 23.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.020

Детский церебральный паралич (ДЦП) представляет собой группу стойких нарушений развития движений и позы [1, 2], однако свойство пластичности мозга создает потенциальную возможность для лечения этого заболевания. На феномене пластичности основаны методы нейрореабилитации, активно развиваемые в последнее время. Больным дают задания на многократное повторение или представление определенных движений. Отмечают, что представление движений может вызывать даже более высокую когнитивную нагрузку, чем их физическая реализация, что активирует восстановительные процессы нервной ткани [3]. Один из подходов нейрореабилитации — применение комплексов, включающих неинвазивные интерфейсы мозг–компьютер (НИМК) и экзоскелет кисти руки [4]. Получены доказательства эффективности данного подхода в улучшении двигательных функций верхних конечностей [5, 6] и показателей моторной реализации речи [7] у детей со спастическими формами ДЦП.

Для оценки функционального состояния головного мозга больных ДЦП и динамики нейропластичности в процессе реабилитации используют анализ амплитуды сенсомоторных ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) [6, 8, 9]. Перспективен также анализ особенностей структурной и функциональной связности нейронных сетей головного мозга в процессе лечения. Структурную связность определяют как совокупность нервных путей головного мозга, которые соответствуют устоявшимся анатомическим представлениям [10]. Применение диффузионно-тензорной магнитно-резонансной томографии (МРТ) выявило у больных с ДЦП нарушение архитектуры кортикоспинального тракта и соматосенсорных таламокортикальных проекций. Отмечены также изменения структурной целостности комиссуральных и ассоциативных путей больших полушарий [11]. Функциональную связность определяют как совокупность взаимосвязей динамической активности нейронов разных регионов мозга. Репертуар функциональных конфигураций отражает лежащие в их основе анатомические связи. Для исследований в этой области применяют функциональную МРТ (фМРТ) и электрофизиологические методы, такие как электро- и магнитоэнцефалография [10].

Анализируя данные фМРТ, для оценки функциональной связности применяют расчет коэффициентов корреляции между показателями активности регионов мозга у больных в состоянии покоя. Было установлено, что нарушения функциональной связности широко распространены у детей с ДЦП, причем в зависимости от формы заболевания и выбора анализируемых областей наблюдались как пониженные, так и повышенные значения данного показателя по сравнению с контрольной группой [11]. Особое внимание обращает на себя выявленное снижение взаимосвязи активности лобных и теменных регионов, что может способствовать двигательным и когнитивным нарушениям при ДЦП [12].

Однако результаты, полученные с применением фМРТ в состоянии покоя, не являются надежным индикатором нарушений двигательных способностей при ДЦП [2]. Кроме того, фМРТ не обладает достаточным временным разрешением, так как измеряет метаболический (вторичный) ответ на активацию нейронов [13]. Записи ЭЭГ обеспечивают высокое временное разрешение и, таким образом, важны для описания как пространственно распределенных, так и временных динамических закономерностей нейронной активации и связности. При этом анализируется спектральная когерентность,

которая является аналогом парной взаимной корреляции во временной области [10]. Спектральную когерентность обычно рассчитывают в полосах традиционно выделяемых ритмов ЭЭГ. Ее показателем является коэффициент когерентности, который варьирует от нуля до единицы в зависимости от степени синхронизации активности функционально связанных регионов коры [13, 14].

Анализ когерентности ЭЭГ у детей с ДЦП к настоящему времени проведен лишь в единичных работах. Первоначально когерентность ритмов ЭЭГ у детей с ДЦП оценивали только в состоянии покоя. У детей с диплегией, имеющих двусторонние поражения мозга, в диапазоне α -ритма выявлено более низкое, по сравнению с контролем, значение межполушарной когерентности в затылочной области. В диапазонах δ -, θ - и β -ритмов для меж- и внутриполушарных пар отведений обнаружили повышенный уровень когерентности, что было интерпретировано как отражение компенсационных процессов [15]. У детей с гемипарезом также обнаружены более высокие значения межполушарной когерентности в δ - и θ -диапазоне, и пониженные — для α - и β -ритмов [16]. Значения когерентности в пораженном полушарии были ниже, чем в относительно сохранном, что, по мнению авторов, являлось следствием локальных нарушений в неокортексе и подкорковом белом веществе.

В более позднем исследовании анализировали межполушарную когерентность ЭЭГ над центральной областью коры у больных с унилатеральным ДЦП как в покое, так и при выполнении движений разгибания запястья [17]. Когерентность в диапазоне α -ритма ЭЭГ в покое оказалась снижена, и снижение было тем больше, чем выше степень нарушений двигательных функций. В недавней работе оценили внутриполушарную когерентность между центральными и лобными областями неокортекса в диапазоне μ -ритма ЭЭГ у детей с унилатеральным ДЦП при спокойном стоянии и ходьбе [18]. В отличие от результатов представленных выше исследований [14, 15], при стоянии у больных в пораженном полушарии когерентность была выше, а в сохранном — ниже, чем у контрольной группы.

Оценку когерентности ЭЭГ как индикатора нейропластичности в процессе реабилитации применяли при лечении взрослых больных после инсульта. При этом отмечена важность ее динамики в качестве показателя восстановления функций неокортекса [19]. Однако, насколько нам известно, оценку когерентности ЭЭГ у больных с ДЦП в процессе лечения выполняли лишь в одной работе. У детей с ДЦП, имеющих нарушения подвижности нижних конечностей, определяли функциональную связность областей коры при проведении серии тренировок на представление движений [20]. При представлении больными поднятия конечности программа-классификатор выявляла изменения паттерна ЭЭГ и выводила на экран изображения, служившие в качестве визуальной обратной связи. Курс реабилитации привел к росту коэффициента кластеризации ЭЭГ в частотном диапазоне 8–15 Гц, что рассматривалось как повышение эффективности сетевых свойств неокортекса. Однако данные о результатах двигательной реабилитации в работе не представлены.

В связи с этим цель нашей работы — провести анализ изменений когерентности в частотных диапазонах θ -, α - и β -ритмов ЭЭГ при проведении комплексного санаторно-курортного лечения детей с ДЦП с курсом нейрореабилитации на основе применения комплекса «НИМК — экзоскелет кисти», а также взаимосвязи этих изменений с показателями двигательной активности больных.

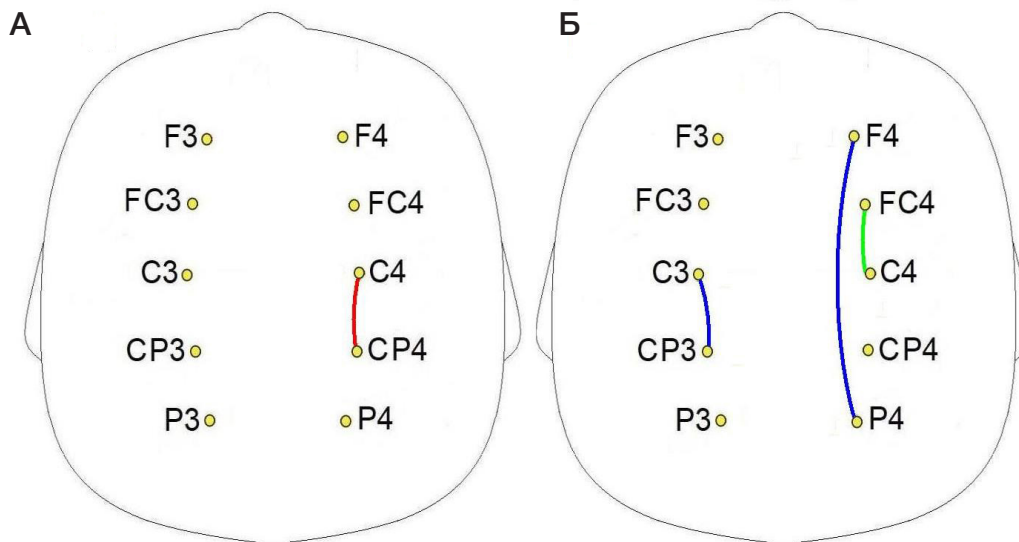


Рис. 1. Изменения показателей когерентности при представлении движений левой (А) и правой (Б) рук. Пара отведений, для которых выявлен статистически значимый рост когерентности в диапазоне α -ритма, отмечена красным цветом; пары, показавшие значимое падение в диапазоне θ - и $\beta 1$ -ритмов — зеленым и синим соответственно

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика выборки

Исследования проводили в 2022–2023 гг. на базе центра «Технологии здоровья и реабилитации» Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского, а также Государственного бюджетного учреждения Республики Крым «Санаторий для детей и детей с родителями «Чайка» им. Гелиловичей». В них приняли участие 30 детей 6–15 лет, проходящих санаторно-курортное лечение с курсом нейрореабилитации на основе применения НИМК. Критерии включения пациентов: наличие установленного диагноза «ДЦП» в соответствии с критериями МКБ-10; наличие у пациента в структуре неврологических нарушений спастической диплегии с уровнем моторного развития I–III по критериям классификации больших моторных функций (Gross Motor Function Classification System for Cerebral Palsy, GMFCS). Критерии исключения: уровень двигательной активности по критериям GMFCS больше III; афатические нарушения; медикаментозно некорректируемая эпилепсия; нарушения зрения, не позволяющие различать инструкцию на экране; умственная отсталость умеренной, тяжелой и глубокой степеней (F71–73 по МКБ-10).

В итоговую группу для анализа не включены дети, ЭЭГ которых содержали большое количество артефактов из-за чрезмерной двигательной активности ребенка. Таким образом были отобраны записи 23 детей (7 девочек, 16 мальчиков) в возрасте от 7 до 15 лет. У 15 из них преобладали нарушения движений правой руки, у шести — левой, у двух — нарушения движений обеих рук были выражены в равной степени.

Оценка показателей двигательных функций

Для оценки двигательных функций пациентов был использован индекс Бартел, характеризующий возможности самостоятельного передвижения или самообслуживания пациента на основе результатов заполнения соответствующего опросника [21]. Чем выше возможности, тем выше значения индекса (диапазон от 0 до 100 баллов). Индекс Бартел применяют как для оценки состояния взрослых пациентов, так и для определения

способности детей с ДЦП участвовать в повседневных действиях [22]. Первичную оценку двигательных возможностей детей проводили на второй день после поступления в санаторий. На следующий день после окончания курса (14–15-й день пребывания в санатории) данные о двигательной активности собирали вторично.

Проведение реабилитационных процедур

Комплексное санаторно-курортное лечение включало: ежедневные процедуры аэро- и гелиотерапии, гидрокинезиотерапии в термально-минеральной воде (продолжительность — 10–15 мин), лечебную физкультуру, массаж паретичных мышц, электростимуляцию мышц, являющихся антагонистами паретичным. Раз в два дня назначали пелоидотерапию. Ботулинотерапию на этапе санаторно-курортного лечения не применяли. Курс нейрореабилитации проводили с помощью комплекса «мозг — компьютер — экзоскелет кисти» «Экзокисть-2» («Экзопласт», Россия; по РУ № РЗН 2018/7681). Работа НИМК основана на выявлении программно-классификатором паттернов ЭЭГ, возникающих при кинестетическом представлении разгибания кисти. Программа обеспечивает генерацию визуального сигнала обратной связи и формирование команд управления экзоскелетом кисти руки.

ЭЭГ регистрировали монополярно с помощью электроэнцефалографа БММ-52 (усилитель NVX-52, Москва, Зеленоград, «МКС») в 32 отведениях. Electroды были расположены по неполной международной схеме 10–10. В качестве референтного использовали усредненный электрод. В процессе записи частоты среза фильтров высоких и низких частот составляли 4 и 30 Гц соответственно. Частота оцифровки ЭЭГ-сигналов — 500 Гц.

В процессе нейрореабилитационного тренинга пациенты сидели в кресле перед компьютерным монитором, на котором им предъявляли визуальные инструкции. Кисти рук размещались внутри «рукавиц» экзоскелета. В центре экрана находилась округлая метка белого цвета, служившая для фиксации взгляда, и расположенные вокруг нее три стрелки, менявшие цвет для обозначения инструкций. Пациент выполнял следующие команды: расслабиться, кинестетически представить движение

разгибания кисти левой или правой руки. Для создания конкретного кинестетического образа при воображении движения детям давали инструкцию: «Представь, что у тебя в руке маленький мячик, ты раскрываешь кисть и роняешь его. Почувствуй это движение». При успешном выполнении пациентом команды и выявлении программной классификатором определенных паттернов ЭЭГ, фиксирующая взор метка окрашивалась в зеленый цвет, экзоскелет выполнял соответствующее движение, и кисть руки пассивно разгибалась. Таким образом, генерировался комбинированный зрительный и кинестетический сигнал обратной связи. Курс нейрореабилитации начинался с третьего дня санаторно-курортного лечения. Пациенты проходили по 10 сеансов (ежедневно, за исключением выходного дня в воскресенье) по одинаковой схеме: три сессии в сеанс по 8 мин с перерывом на отдых не менее 5 мин. В течение сеанса задание на представление движений каждой руки повторяли 24 раза. Доля правильных ответов классификатора (при которых срабатывал экзоскелет и пассивно разгибалась кисть) в первом сеансе у разных пациентов составляла 0,18–0,66, достигая, по мере тренировки, к концу курса уровня 0,30–0,84. Остальные подробности реабилитационной методики описаны ранее [7].

Для оценки перестройки взаимосвязей корковых регионов под влиянием нейрореабилитации анализировали когерентность ЭЭГ θ -, α -, β_1 - и β_2 -ритмов в частотных диапазонах 4–8, 8–13, 14–20 и 20–30 Гц соответственно. Участки записей ЭЭГ с амплитудой более 250 мкВ, а также отрезки, содержащие большое количество артефактов, исключали из обработки. Анализировали не менее 10 безартефактных эпох (общая продолжительность записи ЭЭГ не менее 50 с). Поскольку реализация движений и их представление обеспечиваются взаимодействиями внутри лобно-теменной нейронной сети [3], внутриполушарную когерентность биопотенциалов рассчитывали для десяти пар отведений лобных, центральных и теменных областей левого (F3–C3, FC3–C3, C3–CP3, C3–P3, F3–P3) и правого (F4–C4, FC4–C4, C4–CP4, C4–P4, F4–P4) полушарий, а межполушарную — для пяти пар (F3–F4, FC3–FC4, C3–C4, CP3–CP4, P3–P4). При этом использовали программное обеспечение фирмы «Нейрософт» (Россия), входящее в комплект электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-5».

Значения коэффициентов когерентности преобразовали с применением функции натурального логарифма. Числовые значения, выходявшие за пределы 3 σ , отбрасывали. В результате показатели когерентности имели распределения, близкие к нормальным, что позволило анализировать их средствами параметрической статистики.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с использованием программы STATISTICA v.12 (StatSoft Inc.; США). Значения когерентности ЭЭГ для каждого из исследуемых ритмов подвергали дисперсионному анализу ANOVA с повторными измерениями (repeated measures) с факторами ТРЕНИНГ (первый и десятый сеансы) и ПАРЫ (10 или 5 пар отведений). Для оценки изменений когерентности в каждой из пар отведений использовали метод линейных контрастов. Поскольку величины исходных значений коэффициентов корреляции, которые не подвергали логарифмированию, также могут представлять интерес, а их распределение отличалось

от нормального (критерий Шапиро–Уилка), конкретные показатели приводили в тексте в виде медианы и интерквартильного размаха Me [Q_1 ; Q_3]. Распределение индекса Бартел также отличалось от нормального, в связи с чем статистические данные представляли аналогичным образом. Для оценки различий индекса Бартел до и после комплексного лечения использовали Т-критерий Уилкоксона, а расчет корреляций проводили с помощью критерия Спирмена. Различия и коэффициенты корреляции считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели двигательных функций до и после реабилитационных процедур

До начала комплексного лечения с курсом нейрореабилитации значения индекса Бартел составляли 70 [60; 85] баллов, после — 77,5 [74,0; 95,0] баллов (различия достоверны при $p < 0,001$). Таким образом, возможности самостоятельного передвижения и самообслуживания детей существенно выросли.

Динамика когерентности ЭЭГ в результате реабилитационных процедур

Применение ANOVA для анализа изменений внутриполушарной когерентности при представлении движений левой руки выявило эффект фактора ТРЕНИНГ в диапазоне α -ритма: $F_{1,14} = 7,21$; $p = 0,02$. Уровень когерентности во время проведения последнего сеанса вырос по сравнению с первым, особенно в правом, контрлатеральном по отношению к представляемому движению, полушарии. Метод линейных контрастов показал достоверные различия в паре C4–CP4, где рост показателя был значим при $p = 0,004$ (рис. 1А; красная линия). Значение коэффициента когерентности в этой паре увеличилось с 0,38 [0,36; 0,45] до 0,43 [0,39; 0,47].

При представлении движений правой руки выявлен эффект взаимодействия факторов ТРЕНИНГ и ПАРЫ: $F_{9,90} = 2,37$; $p = 0,02$ в диапазоне θ -ритма ЭЭГ. Уровень когерентности в данном частотном диапазоне снижался в парах правого, ипсилатерального полушария. Метод линейных контрастов подтвердил различия в паре C4–FC4, где снижение когерентности оказалось значимым при $p = 0,01$ (рис. 1Б; зеленая линия). В этой паре значения коэффициента когерентности снизились с 0,41 [0,36; 0,42] до 0,36 [0,33; 0,38]. Также при представлении движений правой руки выявлен эффект фактора ТРЕНИНГ в диапазоне β_1 -ритма ЭЭГ: $F_{1,7} = 24,091$ при $p = 0,002$. Уровень когерентности в данном частотном диапазоне также снижался. Метод линейных контрастов подтвердил значимые различия в паре C3–CP3 контрлатерального полушария при $p = 0,03$ и F4–P4 ипсилатерального полушария при $p = 0,01$ (рис. 1Б; синие линии). В этих парах значения коэффициентов когерентности снизились с 0,39 [0,37; 0,42] до 0,37 [0,34; 0,41] и с 0,40 [0,37; 0,43] до 0,38 [0,36; 0,40] соответственно.

В диапазоне β_2 -ритма статистически значимых влияний фактора ТРЕНИНГ и его взаимодействия с фактором ПАРЫ при анализе динамики внутриполушарной когерентности ЭЭГ не обнаружено.

Анализ динамики межполушарной когерентности в диапазоне θ -, α -, β_1 - и β_2 -ритмов ЭЭГ при представлении

детьми движений левой и правой рук, а также внутри- и межполушарной когерентности в состоянии расслабления не выявил влияния фактора ТРЕНИНГ и его взаимодействия с фактором ПАРЫ.

Связь когерентности с показателями двигательных функций

Для оценки взаимосвязей между когерентностью и характеристиками двигательных функций использовали показатели ЭЭГ в процессе завершающего сеанса курса нейрореабилитации, а также величины индекса Бартел, отражающие двигательные функции детей по окончании данного курса. Для анализа отобраны только те пары отведений, для которых выявлены статистически значимые изменения (приведены выше). Обнаружена связь между когерентностью α -ритма в паре C4–CP4 и величиной индекса Бартел ($r = 0,52$; $p = 0,04$), т. е. чем выше когерентность α -ритма в данной паре отведений правого полушария при представлении движений левой руки, тем выше способность пациентов к передвижению и самообслуживанию. Для других частотных диапазонов ЭЭГ значимых корреляций не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

После прохождения курса нейрореабилитации нами обнаружены статистически значимые изменения внутриполушарной когерентности θ -, α - и β_1 -ритмов ЭЭГ в отдельных звеньях лобно-теменных цепей, которые сочетались с улучшением двигательных функций пациентов. В завершающем сеансе представление движения левой руки сопровождалось значимо большим уровнем когерентности α -ритма, чем в начале реабилитации. Каким может быть значение усиления взаимосвязей на частоте данного ритма? Ряд авторов предполагают, что синхронизированные ЭЭГ-осцилляции служат механизмом, обеспечивающим быстрое и избирательное взаимодействие между областями мозга [23–25]. По их мнению, именно α -ритм обеспечивает крупномасштабную синхронизацию, поскольку α -волны присутствуют в коре головного мозга повсеместно и отражают чередование периодов торможения и возбуждения. Синхронизация таких периодов в разных областях мозга позволяет им взаимодействовать более эффективно, что, в частности, необходимо для функционирования лобно-теменной сети. Важно отметить, что активность в частотном диапазоне α -ритма, зарегистрированная нами в центральных и прилегающих к ним отведениях, соответствует низкочастотному компоненту μ -ритма, генерируемого в этих областях неокортекса. Динамика μ -ритма отражает процессы реализации или представления движений и рекомендована в качестве электрофизиологического маркера пластичности кортикальной сенсомоторной системы [8]. В нашем исследовании метод контрастов показал статистическую значимость роста когерентности α -ритма в паре отведений C4–CP4 (рис. 1А), находящихся над постцентральной сенсомоторной корой и нижней теменной долькой [26]. Указанные области у здоровых испытуемых активировались во время задач на представление движений и являлись центрами нейронных сетей, чьи показатели когерентности коррелировали с результатами таких задач [27].

Необходимо добавить, что кинестетическое представление движений требует актуализации информации,

содержащейся в памяти ребенка. Сообщалось, что фазовые взаимодействия в диапазоне α -ритма, выявляемые в центральной и теменной коре, лежат в основе нисходящей модуляции амплитуд локальных осцилляций в сенсорных областях, поддерживая функции внимания и памяти [23]. Таким образом, рост когерентности ЭЭГ в диапазоне α -ритма улучшает взаимодействие областей мозга, актуализирующих двигательные образы в памяти и поддерживающих внимание к ним. В результате кинестетическое представление движений становится более успешным, что отражается в увеличении доли правильных ответов программы-классификатора. Поскольку во время представления движений люди задействуют те же нейронные структуры, что участвуют в реальном выполнении действий [28, 29], успешное представление движений усиливает процессы нейропластичности корковых и подкорковых структур. Все это приводит к улучшению координации реальных движений конечностей, что и отражается в значимом росте индекса Бартел.

Нами выявлено также снижение уровня когерентности θ - и β_1 -ритмов при представлении движения правой руки в последнем сеансе, по сравнению с первым. Ранее у детей с ДЦП были обнаружены повышенные значения когерентности θ -ритма [15, 16], что рассматривалось как проявление компенсаторного механизма при нарушении функциональной связности в диапазоне α -ритма. Таким образом, снижение когерентности θ -ритма может быть расценено как проявление определенных положительных изменений в функционировании неокортекса.

Снижение когерентности β_1 -ритма может быть обусловлено спецификой выполняемой задачи. Частотный диапазон указанного ритма соответствует высокочастотному компоненту μ -ритма. Его динамика отражает активность первичной моторной коры в процессе реального выполнения движений [8]. В условиях наших тренингов детям было необходимо лишь представлять, но не выполнять движение, что вовлекало в основном сенсомоторные области неокортекса. Следует добавить, что когерентность β -ритма растет в условиях выполнения движений, нуждающихся в усиленном контроле [30]. Задача на кинестетическое представление движений такого контроля очевидно не требовала. Можно предположить, что в условиях первого сеанса представление движений давалось сложнее и требовало дополнительной активации первичной моторной области. В дальнейшем представление движений происходило с меньшими усилиями, а активация коры была более локальной.

В заключение отметим следующее. Как было показано ранее, дисфункция лобно-теменной сети у детей с ДЦП способствует двигательным и когнитивным нарушениям [12]. Выявленные нами изменения когерентности ритмов ЭЭГ в звеньях этой сети можно расценить как показатели позитивных сдвигов в функциональном состоянии неокортекса пациентов.

К ограничениям исследования можно отнести отсутствие контрольной группы детей с ДЦП, у которых была бы зарегистрирована ЭЭГ при представлении движений в начале и конце стандартного санаторно-курортного лечения без курса нейрореабилитации на основе НИМК. Временные рамки санаторно-курортного лечения (21 день) не позволяли прибегнуть к перекрестному дизайну исследования, который был бы в этом случае наиболее адекватен и этичен.

ВЫВОДЫ

Комплексная терапия с применением интерфейса «мозг — компьютер — экзоскелет кисти» привела у детей с ДЦП к статистически значимому росту индекса Бартел ($p < 0,001$), свидетельствующему об улучшении показателей подвижности и способности к самообслуживанию. Выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) изменение когерентности внутриполушарных связей в диапазонах θ -, α - и β 1-ритмов. Основой таких изменений может быть усиление процессов пластичности в нейронных

сетях неокортекса, контролирующих планирование, представление и выполнение сложных движений. Полученные данные могут быть использованы для оценки функционального состояния головного мозга больных в процессе реабилитации и разработки новых методов коррекции двигательной сферы детей с ДЦП. В будущих исследованиях представляется целесообразным провести анализ ЭЭГ пациентов с использованием перекрестного дизайна при прохождении ими курса нейрореабилитации на базе центра «Технологии здоровья и реабилитации» Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского.

Литература

1. Sadowska M, Sarecka-Hujar B, Kopyta I. Cerebral palsy: current opinions on definition, epidemiology, risk factors, classification and treatment options. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020; 16: 1505–18. DOI: 10.2147/NDT.S235165.
2. Vallinoja J, Nurmi T, Jaatela J, Wens V, Bourguignon M, Mäenpää H, et al. Functional connectivity of sensorimotor network is enhanced in spastic diplegic cerebral palsy: a multimodal study using fMRI and MEG. *Clinical Neurophysiology*. 2024; 157: 4–14. DOI: 10.1016/j.clinph.2023.10.014.
3. Ogawa T, Shimobayashi H, Hirayama JI, Kawanabe M. Asymmetric directed functional connectivity within the frontoparietal motor network during motor imagery and execution. *Neuroimage*. 2022; 247: 118794. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2021.118794.
4. Федотова И. Р., Бобров П. Д. Предпосылки и особенности использования воображения движения и интерфейса мозг–компьютер в реабилитации при детском церебральном параличе. *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*. 2022; 72 (1): 87–99. DOI: 10.31857/S004446772201004X.
5. Ларина Н. В., Корсунская Л. Л., Власенко С. В. Комплекс «Экзокисть-2» в реабилитации верхней конечности при детском церебральном параличе с использованием неинвазивного интерфейса «мозг–компьютер». *Нервно-мышечные болезни*. 2019; 11 (4): 12–20.
6. Бобров П. Д., Бирюкова Е. В., Поляев Б. А., Лайшева О. А., Усачёва Е. Л., Соколова А. В. и др. Реабилитация больных с детским церебральным параличом с помощью экзоскелета кисти, управляемого интерфейсом «мозг–компьютер». *Вестник РГМУ*. 2020; (4): 34–41. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.047.
7. Павленко В. Б., Власенко С. В., Орехова Л. С., Бирюкова Е. А. Улучшение речи у детей с ДЦП на фоне реабилитации с применением нейроинтерфейса «мозг–компьютер–экзоскелет кисти». *Вестник РГМУ*. 2023; (4): 66–72. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.026.
8. Démas J, Bourguignon M, Périer M, De Tiège X, Dinomais M, Van Bogaert P. Mu rhythm: State of the art with special focus on cerebral palsy. *Ann Phys Rehabil Med*. 2020; 63 (5): 439–46. DOI: 10.1016/j.rehab.2019.06.007.
9. Ларина Н. В., Начарова М. А., Корсунская Л. Л., Власенко С. В., Павленко В. Б. Изменение ЭЭГ в частотном диапазоне α -ритма у детей с детским церебральным параличом при применении роботизированной терапии. *Вестник РГМУ*. 2020; (4): 42–8. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.043.
10. Chiarion G, Sparacino L, Antonacci Y, Faes L, Mesin L. Connectivity analysis in EEG data: a tutorial review of the state of the art and emerging trends. *Bioengineering (Basel)*. 2023; 10 (3): 372. DOI: 10.3390/bioengineering10030372.
11. Jacobs N, Pouwels P, van der Krogt M, Meyns P, Zhu K, Nelissen L, et al. Brain structural and functional connectivity and network organization in cerebral palsy: A scoping review. *Dev Med Child Neurol*. 2023; 65 (9): 1157–73. DOI: 10.1111/dmcn.15516.
12. Qin Y, Li Y, Sun B, He H, Peng R, Zhang T, et al. Functional connectivity alterations in children with spastic and dyskinetic cerebral palsy. *Neural Plast*. 2018; 2018: 7058953. DOI: 10.1155/2018/7058953.
13. Bowyer SM. Coherence a measure of the brain networks: past and present. *Neuropsychiatr Electrophysiol*. 2016; 2: 1–12. DOI: 10.1186/S40810-015-0015-7.
14. Schneider M, Broggin AC, Dann B, Tzanou A, Uran C, Sheshadri S, et al. A mechanism for inter-areal coherence through communication based on connectivity and oscillatory power. *Neuron*. 2021; 109 (24): 4050–67. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.09.037.
15. Koeda T, Takeshita K. Electroencephalographic coherence abnormalities in preterm diplegia. *Pediatr Neurol*. 1998; 18 (1): 51–6. DOI: 10.1016/S0887-8994(97)00155-0.
16. Kułak W, Sobaniec W, Boćkowski L. EEG spectral analysis and coherence in children with hemiparetic cerebral palsy. *Med Sci Monit*. 2005; 11 (9): CR449–55.
17. Kukke SN, de Campos AC, Damiano D, Alter KE, Patronas N, Hallett M. Cortical activation and inter-hemispheric sensorimotor coherence in individuals with arm dystonia due to childhood stroke. *Clin Neurophysiol*. 2015; 126 (8): 1589–98. DOI: 10.1016/j.clinph.2014.11.002.
18. George KA, Damiano DL, Kim Y, Bulea TC. Mu rhythm during standing and walking is altered in children with unilateral cerebral palsy compared to children with typical development. *Dev Neurorehabil*. 2021; 24 (1): 8–17. DOI: 10.1080/17518423.2020.1756005.
19. Wu J, Quinlan EB, Dodakian L, McKenzie A, Kathuria N, Zhou RJ, et al. Connectivity measures are robust biomarkers of cortical function and plasticity after stroke. *Brain*. 2015; 138 (Pt 8): 2359–69. DOI: 10.1093/brain/aww156.
20. Xie J, Jiang L, Li Y, Chen B, Li F, Jiang Y, et al. Rehabilitation of motor function in children with cerebral palsy based on motor imagery. *Cogn Neurodyn*. 2021; 15 (6): 939–48. DOI: 10.1007/s11571-021-09672-3.
21. Mahoney FI, Barthel DW. Functional evaluation: The Barthel index. *Med State Med J*. 1965; 14: 61–5.
22. Wolan-Nieroda A, Łukasiewicz A, Leszczak J, Drużbicki M, Guzik A. Assessment of functional performance in children with cerebral palsy receiving treatment in a day care facility: an observational study. *Med Sci Monit*. 2022; 28:e936207. DOI: 10.12659/MSM.936207.
23. Palva S, Palva JM. Functional roles of alpha-band phase synchronization in local and large-scale cortical networks. *Front Psychol*. 2011; 2: 204. DOI: 10.3389/fpsyg.2011.00204.
24. Chapeton JI, Haque R, Wittig JH Jr, Inati SK, Zaghloul KA. Large-scale communication in the human brain is rhythmically modulated through alpha coherence. *Curr Biol*. 2019; 29 (17): 2801–11. DOI: 10.1016/j.cub.2019.07.014.
25. Myers JC, Smith EH, Leszczynski M, O'Sullivan J, Yates MJ, McKhann G, et al. The spatial reach of neuronal coherence and spike-field coupling across the human neocortex. *J Neurosci*. 2022; 42 (32): 6285–94. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0050-22.2022.
26. Koessler L, Maillard L, Benhadid A, Vignal JP, Felblinger J, Vespignani H, et al. Automated cortical projection of EEG sensors: anatomical correlation via the international 10-10 system. *Neuroimage*. 2009; 46 (1): 64–72. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2009.02.006.
27. Drapkina O, Savosenkov A, Gordileva S, Kurkin S A, Badarin A, Grigor'ev N, et al. Characteristics of the specific brain functional network correlate with the latency of motor imagery. *Eur Phys J*

- Spec Top. 2023; DOI: 10.1140/epjs/s11734-023-01058-2.
28. Jongsma MLA, Steenbergen B, Baas CM, Aarts PB, van Rijn CM. Lateralized EEG mu power during action observation and motor imagery in typically developing children and children with unilateral Cerebral Palsy. *Clin Neurophysiol.* 2020; 131 (12): 2829–40. DOI: 10.1016/j.clinph.2020.08.022.
 29. Galli J, Garofalo G, Brunetti S, Loi E, Portesi M, Pelizzari G, et al. Children with Cerebral Palsy can imagine actions like their normally developed peers. *Front Neurol.* 2022; 13: 951152. DOI: 10.3389/fneur.2022.951152.
 30. Chung JW, Ofori E, Misra G, Hess CW, Vaillancourt DE. Beta-band activity and connectivity in sensorimotor and parietal cortex are important for accurate motor performance. *Neuroimage.* 2017; 144: 164–73. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2016.10.008.
- ## References
1. Sadowska M, Sarecka-Hujar B, Kopyta I. Cerebral palsy: current opinions on definition, epidemiology, risk factors, classification and treatment options. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020; 16: 1505–18. DOI: 10.2147/NDT.S235165.
 2. Vallinoja J, Nurmi T, Jaatela J, Wens V, Bourguignon M, Mäenpää H, et al. Functional connectivity of sensorimotor network is enhanced in spastic diplegic cerebral palsy: a multimodal study using fMRI and MEG. *Clinical Neurophysiology.* 2024; 157: 4–14. DOI: 10.1016/j.clinph.2023.10.014.
 3. Ogawa T, Shimobayashi H, Hirayama JI, Kawanabe M. Asymmetric directed functional connectivity within the frontoparietal motor network during motor imagery and execution. *Neuroimage.* 2022; 247: 118794. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2021.118794.
 4. Fedotova IR, Bobrov PD. Predposylki i osobennosti ispol'zovaniya vooobrazheniya dvizheniya i interfejsa mozg-komp'yuter v reabilitacii pri detskom cerebral'nom paraliche. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova.* 2022; 72 (1): 87–99. DOI: 10.31857/S004446772201004X. Russian.
 5. Larina NV, Korsunskaya LL, Vlasenko SV. Kompleks «Ekskizist'-2» v reabilitacii verhnej konechnosti pri detskom cerebral'nom paraliche s ispol'zovaniem neinvazivnogo interfejsa «mozg-komp'yuter». *Nervno-myshechnye bolezni.* 2019; 11 (4): 12–20. DOI: DOI: 10.17650/2222-8721-2019-9-4-44-50. Russian.
 6. Bobrov PD, Biryukova EV, Polyayev BA, Lajsheva OA, Usachjova EL, Sokolova AV, et al. Rehabilitation of patients with cerebral palsy using hand exoskeleton controlled by brain-computer interface. *Bulletin of RSMU.* 2020; (4): 33–40. DOI: 10.24075/brsmu.2020.047.
 7. Pavlenko VB, Vlasenko SV, Orekhova LS, Biryukova EA. Speech improvement in children with cerebral palsy by "brain-computer-hand exoskeleton" neurointerface rehabilitation. *Bulletin of RSMU.* 2023; (4): 62–67. DOI: 10.24075/brsmu.2023.026.
 8. Démas J, Bourguignon M, Périer M, De Tiège X, Dinomais M, Van Bogaert P. Mu rhythm: State of the art with special focus on cerebral palsy. *Ann Phys Rehabil Med.* 2020; 63 (5): 439–46. DOI: 10.1016/j.rehab.2019.06.007.
 9. Larina NV, Nacharova MA, Korsunskaya LL, Vlasenko SV, Pavlenko VB. Changes in EEG patterns in the α -frequency band following BCI-based therapy in children with cerebral palsy. *Bulletin of RSMU.* 2020; (4): 41–6. DOI: 10.24075/brsmu.2020.043.
 10. Chiarion G, Sparacino L, Antonacci Y, Faes L, Mesin L. Connectivity analysis in EEG data: a tutorial review of the state of the art and emerging trends. *Bioengineering (Basel).* 2023; 10 (3): 372. DOI: 10.3390/bioengineering10030372.
 11. Jacobs N, Pouwels P, van der Krogt M, Meyns P, Zhu K, Nelissen L, et al. Brain structural and functional connectivity and network organization in cerebral palsy: A scoping review. *Dev Med Child Neurol.* 2023; 65 (9): 1157–73. DOI: 10.1111/dmcn.15516.
 12. Qin Y, Li Y, Sun B, He H, Peng R, Zhang T, et al. Functional connectivity alterations in children with spastic and dyskinetic cerebral palsy. *Neural Plast.* 2018; 2018: 7058953. DOI: 10.1155/2018/7058953.
 13. Bowyer SM. Coherence a measure of the brain networks: past and present. *Neuropsychiatr Electrophysiol.* 2016; 2: 1–12. DOI: 10.1186/S40810-015-0015-7.
 14. Schneider M, Brogini A, Dann B, Tzanou A, Uran C, Sheshadri S, et al. A mechanism for inter-areal coherence through communication based on connectivity and oscillatory power. *Neuron.* 2021; 109 (24): 4050–67. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.09.037.
 15. Koeda T, Takeshita K. Electroencephalographic coherence abnormalities in preterm diplegia. *Pediatr Neurol.* 1998; 18 (1): 51–6. DOI: 10.1016/S0887-8994(97)00155-0.
 16. Kułak W, Sobaniec W, Boćkowski L. EEG spectral analysis and coherence in children with hemiparetic cerebral palsy. *Med Sci Monit.* 2005; 11 (9): CR449-55.
 17. Kukke SN, de Campos AC, Damiano D, Alter KE, Patronas N, Hallett M. Cortical activation and inter-hemispheric sensorimotor coherence in individuals with arm dystonia due to childhood stroke. *Clin Neurophysiol.* 2015; 126 (8): 1589–98. DOI: 10.1016/j.clinph.2014.11.002.
 18. George KA, Damiano DL, Kim Y, Bulea TC. Mu rhythm during standing and walking is altered in children with unilateral cerebral palsy compared to children with typical development. *Dev Neurorehabil.* 2021; 24 (1): 8–17. DOI: 10.1080/17518423.2020.1756005.
 19. Wu J, Quinlan EB, Dodakian L, McKenzie A, Kathuria N, Zhou RJ, et al. Connectivity measures are robust biomarkers of cortical function and plasticity after stroke. *Brain.* 2015; 138 (Pt 8): 2359–69. DOI: 10.1093/brain/awv156.
 20. Xie J, Jiang L, Li Y, Chen B, Li F, Jiang Y, et al. Rehabilitation of motor function in children with cerebral palsy based on motor imagery. *Cogn Neurodyn.* 2021; 15 (6): 939–48. DOI: 10.1007/s11571-021-09672-3.
 21. Mahoney FI, Barthel DW. Functional evaluation: The Barthel index. *Md State Med J.* 1965; 14: 61–5.
 22. Wolan-Nieroda A, Łukasiewicz A, Leszczak J, Druzbicki M, Guzik A. Assessment of functional performance in children with cerebral palsy receiving treatment in a day care facility: an observational study. *Med Sci Monit.* 2022; 28:e936207. DOI: 10.12659/MSM.936207.
 23. Palva S, Palva JM. Functional roles of alpha-band phase synchronization in local and large-scale cortical networks. *Front Psychol.* 2011; 2: 204. DOI: 10.3389/fpsyg.2011.00204.
 24. Chapeton JL, Haque R, Wittig JH Jr, Inati SK, Zaghloul KA. Large-scale communication in the human brain is rhythmically modulated through alpha coherence. *Curr Biol.* 2019; 29 (17): 2801–11. DOI: 10.1016/j.cub.2019.07.014.
 25. Myers JC, Smith EH, Leszczynski M, O'Sullivan J, Yates MJ, McKhann G, et al. The spatial reach of neuronal coherence and spike-field coupling across the human neocortex. *J Neurosci.* 2022; 42 (32): 6285–94. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0050-22.2022.
 26. Koessler L, Maillard L, Benhadid A, Vignal JP, Felblinger J, Vespignani H, et al. Automated cortical projection of EEG sensors: anatomical correlation via the international 10-10 system. *Neuroimage.* 2009; 46 (1): 64–72. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2009.02.006.
 27. Drapkina O, Savosenkov A, Gordileeva S, Kurkin S A, Badarin A, Grigor'ev N, et al. Characteristics of the specific brain functional network correlate with the latency of motor imagery. *Eur Phys J Spec Top.* 2023; DOI: 10.1140/epjs/s11734-023-01058-2.
 28. Jongsma MLA, Steenbergen B, Baas CM, Aarts PB, van Rijn CM. Lateralized EEG mu power during action observation and motor imagery in typically developing children and children with unilateral Cerebral Palsy. *Clin Neurophysiol.* 2020; 131 (12): 2829–40. DOI: 10.1016/j.clinph.2020.08.022.
 29. Galli J, Garofalo G, Brunetti S, Loi E, Portesi M, Pelizzari G, et al. Children with Cerebral Palsy can imagine actions like their normally developed peers. *Front Neurol.* 2022; 13: 951152. DOI: 10.3389/fneur.2022.951152.
 30. Chung JW, Ofori E, Misra G, Hess CW, Vaillancourt DE. Beta-band activity and connectivity in sensorimotor and parietal cortex are important for accurate motor performance. *Neuroimage.* 2017; 144: 164–73. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2016.10.008.

ОРФАННАЯ ПАТОЛОГИЯ В РЕСПУБЛИКЕ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ – АЛАНИЯ: СТРУКТУРА, ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Р. А. Зинченко¹✉, И. С. Тебиева^{2,3}, Ю. В. Габисова³, Е. Ю. Шукан⁴, А. В. Хохова^{2,3}, А. В. Марахонов¹, С. И. Куцев¹¹ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия² Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Владикавказ, Россия³ Республиканская детская клиническая больница, Владикавказ, Россия⁴ Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н. А. Семашко, Москва, Россия

В настоящее время известно более 8000–10000 редких болезней (РБ), 75–80% которых наследственные. В Российской Федерации (РФ) пациентам оказывают медицинскую помощь по двум перечням: 17 хронических прогрессирующих и жизнеугрожающих заболеваний (РЖЗ) и 14 высокочастотных нозологий (ВЗН). Целью исследования было оценить спектр, распространенность и генетико-эпидемиологические характеристики РБ из перечней РЖЗ и ВЗН в Республике Северная Осетия – Алания (РСОА) и в РФ в целом. Определено число пациентов из перечней РЖЗ (по РФ всего 18 744 человек, в т. ч. 8713 детей; по РСОА — 129 и 42 соответственно) и ВЗН (по РФ — 28727 /13454 детей; по РСОА — 554 и 64) и рассчитана распространенность на 100 000 человек. Распространенность РБ в мире оценивали по базе Orphanet. Средняя распространенность заболеваний их группы РЖЗ среди всего населения РФ составила 11,51 случаев и среди детей — 25,08. Схожие данные получены для РСОА (19,38 и 29,44 соответственно). Выявлено, что идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, дефект в системе комплемента, болезнь «кленового сиропа», порфирия в РСОА встречаются чаще, чем в среднем по РФ, а галактоземия — реже. Анализ заболеваний из перечня ВЗН показал более низкую по сравнению с РФ и Orphanet распространенность гемофилии и гипопитуитаризма в РСОА, и более высокую для мукополисахаридоза VI типа, гемолитико-уремического синдрома и юношеского артрита с системным началом. В РСОА выявлены особенности спектра генетических вариантов в генах *PAH* (фенилкетонурия) и *CFTR* (муковисцидоз). Таким образом, изучение распространенности РБ в регионах является важным и необходимым условием для повышения настороженности медицинского персонала, расширения и совершенствования оказания медицинской помощи пациентам с РЖЗ и ВЗН.

Ключевые слова: редкие (орфанные) заболевания, хронические прогрессирующие и жизнеугрожающие заболевания, высокочастотные нозологии, распространенность, Республика Северная Осетия – Алания, Российская Федерация

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания ФГБНУ «МГНЦ» Минобр России и Минздрава РСОА.

Вклад авторов: Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, Ю. В. Габисова, А. В. Хохова — обследование пациентов, постановка диагноза, получение информированного согласия и забор биоматериала; Е. Ю. Шукан — сбор данных о количестве пациентов; Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, С. И. Куцев — планирование исследования, выполнение статистического анализа, написание рукописи; А. В. Марахонов — анализ молекулярно-генетических исследований; И. С. Тебиева, А. В. Марахонов, Р. А. Зинченко — редактирование; Р. А. Зинченко, С. И. Куцев — общее руководство, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова» (протокол № 5 от 20 декабря 2010 г.), соответствует стандартам добросовестной клинической практики и доказательной медицины. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в его проведении.

✉ Для корреспонденции: Рена Абульфазовна Зинченко
ул. Москворечье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; renazinchenko@mail.ru

Статья получена: 08.05.2024 Статья принята к печати: 02.06.2024 Опубликовано онлайн: 26.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.025

ORPHAN DISEASES IN THE REPUBLIC OF NORTH OSSETIA–ALANIA: STRUCTURE, POPULATION GENETIC FEATURES, ISSUES AND PROSPECTS

Zinchenko RA¹✉, Tebieva IS^{2,3}, Gabisova YuV³, Shukan EYu⁴, Khokhova AV^{2,3}, Marakhonov AV¹, Kutsev SI¹¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia² North-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia³ Republican Children's Clinical Hospital, Vladikavkaz, Russia⁴ Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

Currently, there are more than 8000–10000 rare disease (RDs), among which 75–80% are hereditary. In the Russian Federation (RF), patients are provided medical care in accordance with two lists: 17 chronic progressive and life-threatening diseases (RLTDs) and 14 high-cost nosologies (HCNs). The study was aimed to assess the range, prevalence, and genetic epidemiological characteristics of the RDs from the lists of RLTDs and HCNs in the Republic of North Ossetia–Alania and RF in general. We determined the number of patients from the RLTD (a total of 18,744 people in the RF, among them 8713 children; 129 and 42 people, respectively, in the Republic of North Ossetia–Alania) and HCN (28727 people/13454 children in the RF; 554 and 64 in the Republic of North Ossetia–Alania) lists and calculated the prevalence per 100,000 population. The global prevalence of RDs was estimated using the Orphanet database. The average prevalence of RLTDs in the whole population of the RF was 11.51 cases and that among children was 25.08. Similar data were obtained for the Republic of North Ossetia–Alania (19.38 and 29.44, respectively). It was found that idiopathic thrombocytopenic purpura, disorder of the complement system, maple syrup urine disease, porphyria were more common in the Republic of North Ossetia–Alania than in the RF in general, while galactosemia was less common. The analysis of disorders from the RLTD list has shown lower prevalence of hemophilia and pituitary dwarfism in the Republic of North Ossetia–Alania compared to the RF and Orphanet, along with the higher prevalence of type VI mucopolysaccharidosis, hemolytic uremic syndrome, and systemic juvenile rheumatoid arthritis. In the Republic of North Ossetia–Alania, the features of the range of genetic variation in the genes *PAH* (phenylketonuria) and *CFTR* (cystic fibrosis) have been identified. Thus, assessment of the RD prevalence in the regions is important and essential for raising awareness of medical personnel, as well as for expansion and improvement of medical care provision to patients with RLTDs and HCNs.

Keywords: rare (orphan) diseases, chronic progressive and life-threatening diseases, high-cost nosologies, prevalence, Republic of North Ossetia–Alania, Russian Federation

Funding: the study was supported as part of the State Assignment of the Research Centre for Medical Genetics and the Ministry of Health of the Republic of North Ossetia–Alania.

Author contribution: Zinchenko RA, Tebieva IS, Gabisova YuV, Khokhova AV — patient examination, making the diagnosis, obtaining the informed consent, and biomaterial collection; Shukan EYu — acquisition of data on the number of patients; Zinchenko RA, Tebieva IS, Kutsev SI — study planning, statistical analysis, manuscript writing; Marakhonov AV — analysis of molecular genetic tests; Tebieva IS, Marakhonov AV, Zinchenko RA — editing; Zinchenko RA, Kutsev SI — general management, editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 5 dated 20 December 2010), it was compliant with the Good Clinical Practice and evidence-based medicine standards. All patients submitted the informed consent to participation in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Rena A. Zinchenko
Moskvorechye, 1, 115522, Moscow, Russia; renazinchenko@mail.ru

Received: 08.05.2024 Accepted: 02.06.2024 Published online: 26.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.025

Основным критерием, определяющим отношение нозологии к редким (орфанным) болезням (РБ), является распространенность патологии в государстве. Этот показатель колеблется в разных странах мира от 1:1250 до 1:10 000 и выше [1–6]. Из известных в настоящее время 8000–10 000 РБ только для 5% болезней разработано лечение, эффективность которого напрямую зависит от сроков начала терапии [2, 7, 8].

В разных странах мира предпринимаются попытки оптимизировать диагностику РБ с помощью различных государственных проектов и программ. В 2008 г. в США впервые усилиями Национального института исследований генома человека созданы условия для всестороннего обследования 964 пациентов с неустановленными диагнозами. Для реализации проекта была сформирована сеть, включающая координационный центр и семь клинических центров, центры секвенирования экзонов и геномов, центр метаболомики и моделирования, биобанк, а также разработана программа по недиагностированным заболеваниям Национального института здоровья. В результате были поставлены диагнозы подавляющему большинству пациентов, выявлено множество новых ассоциаций болезней и генов [9–12].

Подобный комплексный подход к диагностике РБ успешно зарекомендовал себя в Испании [13], Японии [14], Корее [15] и Китае [16]. Высокая эффективность полногеномного секвенирования в диагностике РБ была продемонстрирована и в ходе реализации проекта «100 000 геномов» в Великобритании [17–21].

Особую актуальность приобретают различные генетические исследования, проводимые в формате экспресс-диагностики для выявления РБ у новорожденных, находящихся в отделениях интенсивной терапии в критическом состоянии: полное секвенирование экзона/генома. По данным литературы, 25–50% подобных исследований становятся информативными в отношении диагностики РБ [8].

В последние годы в нашей стране многое сделано для оптимизации диагностики РБ. Такие учреждения, как ФГБНУ «МГНЦ», ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ, ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ, и некоторые другие федеральные медицинские центры имеют возможность проведения дорогостоящих генетических исследований за счет бюджетных средств, но количество подобных исследований ограничено. Организована также работа нескольких Орфанных центров, на базе которых используют мультидисциплинарный подход к диагностике РБ.

В Российской Федерации (РФ) лечение РБ получило законодательное закрепление. На сайте МЗ РФ опубликован список из 283 заболевания или групп РБ [22], из них 17 нозологий входит в перечень хронических прогрессирующих и жизнеугрожающих заболеваний (РЖЗ) [23], а 14 заболеваний — в перечень высокочастотных нозологий (ВЗН).

В январе 2021 г. в соответствии с указом Президента РФ создан Фонд поддержки детей с тяжелыми жизнеугрожающими и хроническими заболеваниями, в том числе РБ «Круг добра» для обеспечения таких детей лекарственными препаратами и медицинскими изделиями, в некоторых случаях не зарегистрированными в РФ, а также техническими средствами реабилитации, не включенными в федеральный перечень реабилитационных мероприятий, технических средств реабилитации и услуг, предоставляемых инвалиду. Фондом совместно с МЗ РФ был создан информационный ресурс в составе единой

государственной системы в сфере здравоохранения. Информационный ресурс содержит сведения о детях, заявлениях родителей (законных представителей детей), заявках на оказание медицинской помощи, сведения о закупках лекарственных препаратов, об их остатках, протоколы экспертных, попечительских советов, перечни лекарственных препаратов, заболеваний и категорий детей, утвержденных советами Фонда.

Цель данной работы — оценить спектр, распространенность и генетико-эпидемиологические характеристики орфанной патологии из перечней РЖЗ и ВЗН у детей и взрослых в Республике Северная Осетия — Алания (РСОА) и в РФ в целом, сравнить полученную информацию с данными мировой литературы, обозначить проблемы и перспективы диагностики и лечения данной группы заболеваний.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были детское (162 452 человека) и взрослое население (680 748 человек) РСОА и больные с РБ на конец 2022 г.: дети от рождения до 18 лет и взрослые.

Количество населения и пациентов в стране определяли по данным Росстата и МЗ РФ на 31.12.2022. Численность населения в РФ составила 146 447 424 взрослых и 27 300 000 детей.

Единственным источником информации, содержащим обобщение основных аналитических материалов о распространенности РБ из перечня РЖЗ в нашей стране, является Ежегодный бюллетень Экспертного совета по РБ Комитета государственной думы по охране здоровья (так называемая «Белая книга»). В нем представлена информация о количестве пациентов с заболеваниями из перечня РЖЗ в РФ. С 2018 г. ежегодно информацию о количестве пациентов предоставляют региональные Министерства здравоохранения субъектов РФ [24] в соответствии с Постановлением Правительства № 403 от 26.04.2012. Держателем регистра является Департамент медицинской помощи детям, службы родовспоможения и общего здоровья МЗ РФ. Данные из регионального сегмента ежегодно, через депутатский запрос получает Комитет Государственной Думы по охране здоровья граждан.

На основании данных из «Белой книги» за 2022 г. рассчитана распространенность отдельных орфанных заболеваний, диагностированных среди детского и взрослого населения РФ и РСОА.

Для оценки статистических данных по распространенности орфанной патологии из перечня ВЗН использованы данные региональных регистров, предоставляемые в Министерство здравоохранения РФ.

Для расчета распространенности (Р) нозологий использовали следующую формулу:

$$P = \frac{\text{Число больных в РФ или РСОА}}{\text{Количество населения в РФ или РСОА}} \times 100\,000.$$

Распространенность орфанной патологии в мире оценивали по базе международного портала о редких заболеваниях Orphanet, созданного в 1997 г. во Франции с целью сбора скудных знаний об орфанных болезнях, улучшения их диагностики и лечения пациентов с РБ. Сегодня это мультиязычный портал, объединяющий 41 страну в Европе и по всему миру [25].

Определена численность взрослых и детей с заболеваниями, входящими в перечни РЖЗ (по РФ всего

18 744 пациентов, в т. ч. 8713 детей; по PCOA — 129 и 42 соответственно) и ВЗН (по РФ всего 28 727 пациентов, в т. ч. 13 454 детей; по PCOA — 554 и 64 соответственно). Проведен ретроспективный анализ медицинских карт пациентов с орфанной патологией за 17 лет, состоящих на учете в медико-генетической консультации ГБУЗ РДКБ PCOA. Для пациентов с наследственным характером заболевания проводится весь необходимый спектр лабораторных и инструментальных методов исследования, а также подтверждающая диагностика в различных структурных подразделениях ФГБНУ «МГНЦ». Часть пациентов по собственной инициативе проводили подтверждающую диагностику в ООО «Геномед».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ данных по заболеваниям из перечня хронических прогрессирующих и жизнеугрожающих заболеваний

Статистические данные о распространенности заболеваний из перечня РЖЗ в мире, представленные в базе Orphanet, данные о количестве пациентов и распространенности этих заболеваний среди детского и взрослого населения РФ и PCOA представлены в табл. 1.

Для всех наследственных РБ проведен анализ с учетом молекулярно-генетической диагностики. Определена распространенность нарушения обмена ароматических аминокислот (classic Phenylketonuria, other hyperphenylalaninemias), которая, по данным Orphanet, составляет 1–9 / 100 000, в РФ — 3,87 среди взрослого населения и 14,2 среди детского населения, что соответствует значению 1:7142. В PCOA данная патология выявлена с распространенностью 10,28 / 100 000 среди всего населения и 9,23 / 100 000 среди детей. Диагноз «Фенилкетонурия» подтвержден молекулярно-генетическим методом. В соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями 7 пациентов с классической ФКУ находятся на диетотерапии [26]. Остальные в лечебном питании не нуждаются. Особенностью является преобладание двух частых генетических вариантов в гене *PAH* (патологические аллели P281L и P211T), у этнических осетин два данных варианта суммарно составили 60% всех выявленных мутаций (P281L — 42,11%, P211T — 18,42%). У детей с ФКУ выявлены также известные генетические варианты (R408W, R261Q, F33S, M1R (c.2T>G), c.529G>A, c.1222C>T, E390G, c.47_48del (p.Ser16*), c.631C>A (p.Pro211Thr), V230I, c.529G>A (p.Val177Met) [27].

По данным Orphanet, распространенность гомоцистеинурии составляет 1–9 / 100 000, данных о распространенности гомоцистеинурии в РФ представлено. Распространенность гомоцистеинурии в РФ составляет среди взрослого/детского населения 0,03/0,10, а гомоцистеинурии — 0,05/0,22. В PCOA выявлен один взрослый пациент с гомоцистеинурией, ее распространенность составила 0,15 на 100 000. Впервые диагноз установлен в возрасте 24 лет. Проведен поиск патогенных мутаций методом экзомного секвенирования. Выявлен описанный ранее как патогенный (HGMD: CS971640) вариант нуклеотидной последовательности NM_000071.2(CBS):c.209+1G>A в гетерозиготном состоянии, затрагивающий инвариантный динуклеотид донорного сайта сплайсинга интрона 3 гена *CBS*, который кодирует цистатинин-β-синтазу. Кроме того, выявлен не описанный ранее как патогенный вариант

нуклеотидной последовательности в экзоне 4 гена *CBS* NM_000071.2:c.239T>C в гетерозиготном состоянии, приводящий к несинонимичной замене p.(Ile80Thr) высоко консервативной позиции этого фермента. С гомоцистеинурией пациентов в регионе не выявлено.

Распространенность галактоземии среди детского населения в PCOA составила 0,88 на 100 000. По данным Orphanet, распространенность данного нарушения углеводного обмена составляет 1–5 случаев на 100 000 человек, а в РФ этот показатель составил 0,34 и 1,70 на 100 000 среди взрослого и детского населения соответственно. В результате ДНК-диагностики в двух случаях диагностирована галактоземия типа Дуарте, обусловленная гомозиготной мутацией N314D в гене *GALT* (генотип N314D/ N314D), в одном случае — галактоземия 1-го типа (недостаточность фермента *GALT*) с мутациями в гене *GALT* Met142Lys/Lys285Asp (p.K285N), в двух случаях у пациентов-сисбсов диагностирована галактоземия II типа (недостаточность фермента *GALK1*), обусловленная гомозиготным генетическим вариантом Q382X в экзоне 8 гена *GALK1* (генотип Q382X/Q382X) [28].

Тирозинемия относится к редко встречающейся патологии, и ее распространенность, по данным Orphanet, составляет менее 1:100 000. По нашим данным, в РФ распространенность среди детского и взрослого населения составила 0,04 и 0,21 на 100 000 соответственно. В PCOA за изучаемый период не зафиксировано ни одного случая данной патологии.

Также в PCOA не зарегистрированы пациенты из группы заболеваний с нарушения обмена жирных кислот. В РФ распространенность составила 0,08 и 0,28 среди взрослого и детского населения соответственно.

Болезнь «кленового сиропа» и другие виды нарушений обмена аминокислот с разветвленной цепью (изовалериановая ацидемия, метилмалоновая ацидемия, пропионовая ацидемия), по данным Orphanet, могут встречаться с частотой 1–9/100 000, однако в РФ заболевание встречается гораздо реже: 0,02–0,18/100 000. Распространенность данной патологии в PCOA составила 0,15/100 000. Среди всей группы патологий выявлен только один пациент, которому диагноз лейциноз (болезнь кленового сиропа) диагностирован в возрасте двух месяцев. При проведении молекулярно-генетического исследования таргетных областей 266 генов выявлен ранее не описанный как патогенный нуклеотидный вариант c.1196>T p.S399F в гомозиготном состоянии в гене *DBT*. Ребенок находится на специализированной смеси без лейцина, изолейцина, валина (Нутриген 14-leu-val-ile). С другими заболеваниями данной группы пациентов не выявлено.

Распространенность сфинголипидозов: болезнь Фабри, Нимана–Пика и острая перемежающаяся (печеночная) порфирия — в РФ среди взрослого и детского населения составила 0,09/0,02 соответственно. В регионе данная патология не диагностирована. Распространенность же данных видов патологии, по данным Orphanet, составляет 1–5 и 1–9 на 100 000 соответственно.

Распространенность нарушения обмена меди (болезнь Вильсона) в РФ составила 0,68/0,49 среди взрослого/ детского населения. В PCOA данная патология среди детского населения не встречается, а распространенность для взрослых составила 1,03/100 000, что несколько выше, чем в среднем по стране.

Распространенность в РФ несовершенного остеогенеза среди взрослого и детского населения составила 0,56/1,50 соответственно, в PCOA эти значения составили

Таблица 1. Количество пациентов, данные по распространенности (на 100 000) орфанной патологией из перечня РЖЗ в мире, РФ и РСО – Алании

№	Наименование патологии	Код заболевания по МКБ-10	Распространенность на 100 000, по данным Orphanet	Российская Федерация всего 146 447 424/дети 27 300 000				Северная Осетия – Алания всего 680 748/ дети 162 452				p-value Российская Федерация и РСО – Алания	
				Пациенты		Распространенность на 100 000		Пациенты		Распространенность на 100 000			
				Всего	Только дети*	Всего	Только дети*	Всего	Только дети*	Всего	Только дети*		
1	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (Маркиафавы-Микели)	D59.5	1–9	485	19	0,33	0,07	4	0	0,59	0,00	0,247	0,737
2	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (синдром Эванса)	D69,3	1–9	5638	1224	3,85	4,48	70	14	10,28	9,23	1,9E-17	0,013
3	Дефект в системе комплемента	D84,1	>1	631	93	0,43	0,34	6	4	0,88	2,64	0,075	5,7E-6
4	Преждевременная половая зрелость центрального происхождения	E22,8	–	1990	1892	13,59	6,93	10	10	1,47	6,59	0,806	0,708
5	Нарушения обмена ароматических аминокислот	E70,0	1–9	5666	3894	3,87	14,26	21	15	3,08	9,89	0,299	0,090
	(клас, ФКУ, др. ГФА)	E70,1											
6	Тирозинемия	E70,2	>1	64	57	0,04	0,21	0	0	0,00	0,00	0,585	0,560
7	Болезнь «кленового сиропа»	E71,0	1–9	28	27	0,02	0,10	1	1	0,15	0,66	0,018	0,045
8	Другие виды нарушений обмена аминокислот с разветвленной цепью (изовалериановая ацидемия,	E71,1	1–9	50	48	0,03	0,18	0	0	0,00	0,00	0,630	0,593
	метилмалоновая ацидемия,		>1										
	пропионовая ацидемия)		1–9										
9	Нарушения обмена жирных кислот	E71,3	–	111	76	0,08	0,28	0	0	0,00	0,00	0,473	0,501
10	Гомоцистинурия	E72,1	1–9	44	28	0,03	0,10	1	0	0,15	0,00	0,082	0,683
11	Глютарикацидурия	E72,3	–	61	54	0,05	0,22	0	0	0,00	0,00	0,594	0,571
12	Галактоземия	E74,2	1–5	503	468	0,34	1,70	6	5	0,88	3,30	0,017	0,187
13	Другие сфинголипидозы: болезнь Фабри (Фабри–Андерсона),	E75,2	1–5	251	69	0,17	0,25	0	0	0,00	0,00	0,280	0,522
	Нимана–Пика		–										
14	Острая перемежающая (печеночная) порфирия	E80,2	1–9	135	5	0,09	0,02	3	0	0,44	0,00	3,1E-3	0,863
15	Нарушения обмена меди (болезнь Вильсона)	E83,0	–	998	133	0,68	0,49	7	0	1,03	0,00	0,275	0,374
16	Незавершенный остеогенез	Q78,0	1–5	824	410	0,56	1,50	7	5	1,02	3,08	0,107	0,103
17	Легочная (артериальная) гипертензия (идиопатическая) (первичная)	I27,0	1–9	1265	216	0,95	0,94	6	1	0,88	0,66	0,961	0,802
Всего				18744	8713	11,51	25,08	129	42	19,38	29,44	0	0,172

Примечание: * — дети до 18 лет.

1,02/3,08, что достоверно выше, чем в целом по стране. Эта особенность обусловлена «эффе́ктом основателя» и наличием 6 пациентов, кумыков по национальности, являющихся кровными родственниками в четырех поколениях. У всех выявлена мутация NM_000088.3(COL1A1):c.1243C>T, p.(Arg415Ter) в

гетерозиготном состоянии (HGND:CM960321). Вариант ассоциирован с несовершенным остеогенезом IV типа с аутосомно-доминантным типом наследования. Клиническая картина у пациентов варьирует от гипермобильности суставов, голубых склер и дисплазии соединительной ткани до множественных переломов.

Четырем пациентам с тяжелым течением заболевания назначено лечение препаратами бисфосфонатов.

Пять нозологий (пароксизмальная ночная гемоглобинурия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, дефект в системе комплемента, преждевременная половая зрелость центрального происхождения и первичная легочная идиопатическая гипертензия) не относятся к генетически обусловленным нозологиям. Частота встречаемости пароксизмальной ночной гемоглобинурии, по данным Orphanet, составляет 1–9/100 000, в РФ — 0,33 и 0,07 для всего населения и среди детей соответственно. В PCOA выявлено 4 взрослых пациента — распространенность составила 0,59 и 0 соответственно. С идиопатической тромбоцитопенической пурпурой в PCOA выявлено 70 пациентов, в том числе 14 детского возраста, распространенность составила 10,28 и 9,23 соответственно, тогда как по РФ распространенность составила 3,85 и 4,48/100 000. По данным Orphanet, распространенность данной патологии составляет 1–9/100 000. С диагнозом «Дефект в системе комплемента» в PCOA выявлены 6 пациентов, в т.ч. четверо детей. Распространенность составила для всего населения 0,88/100 000, а для детского — 2,64/100 000 детей. При этом распространенность заболевания в РФ — 0,43 и 0,34, и соответствует мировым данным по базе Orphanet >1. Преждевременная половая зрелость центрального происхождения выявлена в РФ с распространенностью для всего населения 13,59/100 000, а для детского 6,93/100 000. В PCOA выявлено 10 пациентов детского возраста и распространенность составила 1,47 и 6,59 соответственно. Данных по базе Orphanet не представлено. С первичной легочной идиопатической гипертензией в PCOA выявлено 6 больных, в том числе 1 ребенок, распространенность составила 0,88 и 0,66 соответственно. Полученные результаты соответствуют данным по РФ (0,95 и 0,94 на 100 000 обследованных соответственно) и Orphanet (1–9/1 000 000).

Анализ данных по заболеваниям из перечня высокочастотных нозологий

В региональном компоненте Федерального регистра ВЗН по PCOA имеется информация о 554 пациентах, из них 64 дети (11,55%).

Ниже представлена информация из генетических карт пациентов по заболеваниям, входящим в перечень ВЗН (табл. 2). Для части заболеваний/состояний, не являющихся генетически обусловленными, таких как «Трансплантация органов и тканей», «Гемолитико-уремический синдром» представлена статистическая информация о распространенности без анализа этиологической структуры. Статистика для некоторых из них не представлена как по РФ, так и в базе Orphanet. Для тех же, которые имеют генетическую этиологию, проведен более подробный анализ в PCOA с учетом молекулярной генетической диагностики, особенностей клинического течения и лечебных мероприятий. Средняя распространенность для этой группы заболеваний не рассчитана.

В МГК ГБУЗ «РДКБ» МЗ PCOA имеется информация о 13 пациентах с диагнозом «Гемофилия», все получают специфическую заместительную терапию концентратами факторов свертывания крови. В настоящее время осуществляется молекулярно-генетическое обследование детей на базе ФГБНУ «МГНЦ». Выявлены мутации в гене F8, характерные для Гемофилии А: с. 1630G>A (p.Asp544Asn), —

у двоих сибсов ингушской национальности; del(GRCh37/hg19) — у двух пациентов (русский и грузин), с.3637del (p.Ile1213Phefs*5), inv22, делеция NC_000023.10:g.(?_154128143)_154129718_?)del (GRCh37/hg19), включающая в себя экзоны 20 и 21 гена F8, в гемизиготном состоянии, мутация F8 inv 22 в гемизиготном состоянии, вариант с.3637del (p.Ile1213Phefs*5) в гемизиготном состоянии и др. У пациентов с гемофилией В выявлена мутация в интроне 5 гена F9 (chrX:138630651G>A) в гемизиготном состоянии, затрагивающая канонический донорный сайт сплайсинга, характерная для заболевания.

На учете в PCOA состоят 12 пациентов с гипопитуитаризмом (гипопитуитаризм), среди которых 11 детского возраста, распространенность в PCOA 5,14 и 8,00/100 000 соответственно. В общероссийском регистре распространенность составила 7,92 и 12,74 (табл. 2). Пациенты получают заместительную гормональную терапию. Проведенные молекулярно-генетические исследования генов-кандидатов у пациентов с гипопитуитаризмом не выявили генетических вариантов, вызвавших данную патологию. Полученные результаты соответствуют средним данным по РФ (5,40 и 18,15 на 100 000 обследованных соответственно) и Orphanet (10–50/1 000 000).

Распространенность муковисцидоза в РФ с для всего населения составляет 2,97/100 000, для детского — 10,99/100 000, что соответствует базе Orphanet. В PCOA за исследуемый период диагноз муковисцидоз установлен 12 пациентам — 11 детского возраста (распространенность 2,20 и 6,77 соответственно). По результатам ДНК-диагностики выявлены известные мутации в гене *CFTR*: W1282X, 1677delTA, F508del, 2184insA, 2118del4, 1248+1G>A, R334W, 359insT. Следует отметить, что у этнических осетин чаще всего встречается мутация W1282X, составившая (37,5%) всех патогенных аллелей у больных [29]. Указанная мутация относится к 1 классу мутаций при МВ, для нее не разработана таргетная терапия. Для пациентов проводится симптоматическая терапия в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями [30, 31].

Группа нарушений обмена гликозаминогликанов — мукополисахаридозы представлена в PCOA двумя формами Мукополисахаридоз I и VI типа. Ребенку с Мукополисахаридозом I типа поставлен диагноз на основании фенотипических признаков, выраженного снижения активности альфа-L-илуридазы, высокой концентрации глюкозамингликанов в моче и данных молекулярно-генетического анализа: в экзоне 1 гена *IDUA* обнаружен вариант нуклеотидной последовательности с.1A>C (p.M1?) в гетерозиготном состоянии описанный в базе данных HGMD как патогенный, а в экзоне 5 гена *IDUA* — с.510delinsAAGTTCCA (p.His171Serfs*14) в гетерозиготном состоянии. Решением консилиума назначена ферментзаместительная терапия препаратом Ларонидаза, лечение переносилось удовлетворительно. В 2022 г. проведена трансплантация костного мозга, однако в результате развития реакции «трансплантат против хозяина» ребенок умер в июне 2022 г. в реанимационном отделении.

Мукополисахаридоз VI типа был диагностирован ребенку 2009 г.р., на основании фенотипических признаков, выраженного снижения активности лизосомальной арилсульфатазы, высокой концентрации глюкозамингликанов в моче и данных ДНК-диагностики: в гене *ARSB* выявлена мутация с.691-1 G>A (IVS as G-A-1;

Таблица 2. Количество пациентов, данные по распространенности (на 100 000) орфанной патологией из перечня высокочастотных нозологий (ВЗН) в мире, РФ и РСО — Алании

№	Наименование патологии	Код заболевания по МКБ-10	Распространенность на 100 000, по данным Orphanet	Российская Федерация				Северная Осетия — Алания				p-value Российская Федерация и РСО-Алания	
				Пациенты		Распространенность на 100 000		Пациенты		Распространенность на 100 000			
				Всего	Только дети*	Всего	Только дети*	Всего	Только дети*	Всего	Только дети*	Всего	Только дети*
1	Гемофилия	D66	1–9	11601	3479	7,92	12,74	35	13	5,14	8,00	0,010	0,091
2	Гипофизарный нанизм	E23,0	10–50	7915	4955	5,40	18,15	12	11	1,76	6,77	4,4E-5	6,7E-4
3	Муковисцидоз	E84,0	10–50	4352	2945	2,97	10,79	15	11	2,20	6,77	0,246	0,127
4	Мукополисахаридоз I	E76,0	1–9	90	70	0,06	0,26	1	1	0,15	0,62	0,371	0,369
5	Мукополисахаридоз II	E76,1	1–9	139	104	0,09	0,38	0	0	0	0	0,421	0,431
6	Мукополисахаридоз VI	E76,2	<1	52	27	0,04	0,10	1	1	0,15	0,62	0,127	0,040
7	Болезнь Гоше	E75,2	1–9	455	105	0,31	0,38	1	1	0,15	0,62	0,444	0,637
8	Рассеянный склероз	G35,0	–	–	–	–	–	1	1	0,15	0,62	–	–
9	Гемолитико-уремический синдром	D59,3	1–9	502	312	0,34	1,14	6	2	0,88	1,23	0,017	0,916
10	Юношеский артрит с системным началом	M08, 2	1–9	1846	1148	1,26	4,21	22	11	3,23	6,77	5,3E-6	0,112
11	Апластическая анемия	D61,9	–	1420	142	0,97	0,52	5	1	0,73	0,62	0,534	0,867
12	Трансплантация органов и тканей	Z94	–	–	–	–	–	84	10	12,34	6,16	–	–
13	Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей	C81-C96	–	–	–	–	–	372	1	54,65	0,62	–	–
14	Наследственный дефицит факторов	D68,2		355	167	0,24	0,61	2	0	0,29	0	0,786	0,319
	II (фибриногена),		<1										
	VII (лабильного),		1–9										
	X (Стьюарта-Прауэра)		1–9										
Всего				28727	13454	19,62	49,28	554	64	81,38	39,40	0	0,073

Примечание: * — дети до 18 лет.

IVS3 — 1g>a) в гомозиготном состоянии. Решением консилиума назначена ферментзаместительная терапия гальсульфатазой. Лечение переносится удовлетворительно.

В РФ по данным региональных регистров средняя распространенность мукополисахаридоза I типа составила 0,06 / 100 000 среди всего населения и 0,26 среди детей, мукополисахаридоза II типа — 0,09 и 0,38, мукополисахаридоза VI типа — 0,04 и 0,10 соответственно. По данным Orphanet, распространенность мукополисахаридоза I и II типов составляет 1–9 / 100 000, что выше, чем в исследованиях по РФ и РСОА, а частота встречаемости мукополисахаридоза VI типа схожа с полученными в ходе данного исследования данными — <1 / 100 000.

За анализируемый период в РСОА диагноз «Болезнь Гоше, 3 тип» установлен ребенку 2016 г. р. в возрасте 1,5 лет. В ходе молекулярно-генетического анализа выявлен генетический вариант p.L444P в гене GBA в гомозиготном состоянии, подтвержденный секвенированием по Сэнгеру. Назначена пожизненная заместительная ферментная терапия имиглюцеразой в дозе 60 Ед/кг — 1200 Ед. Однако проводимая терапия

сопровождалась выраженной аллергической реакцией, развитием анафилактического шока и отека Квинке. С начала 2022 г. в связи с прогрессией осложнений инициирована терапия имиглюцеразой с введением по схеме быстрой десенсибилизирующей терапии. Кроме того, учитывая IgE-опосредуемый механизм аллергии у данного пациента, в состав премедикационной терапии включили антагонист IgE омализумаб. В течение 10 месяцев удавалось ввести 800 Ед с интервалом в 2 недели. Однако в октябре 2022 г. ребенок умер на фоне присоединившейся интеркуррентной патологии [32]. Средняя распространенность в РФ составила 0,31 / 100 000 среди всего населения и 0,38 среди детского, что ниже, чем по данным Orphanet (1–9 / 100 000).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведен сравнительный анализ данных по орфанной патологии в РСОА и ранее не опубликованные данные по РФ из перечня РЖЗ. Средняя распространенность группы РЖЗ в РФ составила среди всего населения РФ 11,51 / 100 000 (1 : 8688 человек), 25,08 / 100 000 детей

(1 : 3987 детей). Схожие данные получены для PCSA — 19,38 / 29,44 (1 : 5160 человек / 1 : 3396 детей). Статистически достоверных различий не выявлено (табл. 1).

Распространенность идиопатической тромбоцитопенической пурпуры в PCSA выше, чем средняя по РФ как для всего населения ($p = 1,9E-17$), так и для детского ($p = 0,013$). Сравнительный анализ с данными Orphanet не выявил различий с учетом вариации значений распространенности по различным странам. Частота встречаемости дефекта в системе комплемента оказалась выше в PCSA только для детского населения ($p = 5,7E-6$) и соответствует данным в Европе. Болезнь «кленового сиропа» в PCSA встречается чаще, чем в среднем по РФ ($p = 0,018$ и $p = 0,045$ соответственно), и соответствует данным Orphanet. Распространенность галактоземии в PCSA ниже ($p = 0,017$) среди всего населения, чем средняя по РФ и в Европе, что может быть связано с низкой выявляемостью заболевания в Республике в связи с более мягким течением. В то же время для острой перемежающейся порфирии характерна более высокая распространенность ($p = 3,1E-3$), чем для РФ, и схожа со значениями по Европе. Такие нозологии, как нарушения обмена жирных кислот, глютарикацидурия, тирозинемия, другие виды нарушений обмена аминокислот в PCSA, не зарегистрированы.

Для группы орфанной патологией из перечня высокочастотных нозологий также выявлены различия. Распространенность в PCSA гемофилии (для всего населения $p = 0,010$) и гипопизарного нанизма (для всего населения $p = 4,4E-5$, только для детей $p = 6,7E-4$) оказалась ниже, чем средняя по РФ и данным Orphanet. В то же время встречаемость мукополисахаридоза VI (на детское население $p = 0,040$), гемолизико-уремического синдрома ($p = 0,017$) и юношеского артрита с системным началом ($p = 5,3E-6$) определена выше, чем в РФ, и соответствует данным Orphanet.

Все остальные заболевания из группы РЖЗ и ВЗН показали статистически достоверно схожие значения с данными по РФ и Orphanet.

Следует также обратить внимание на особенный спектр мутаций:

- в гене *PAH* при фенилкетонурии — преобладание двух частых генетических вариантов в гене *PAH* (P281L и P211T), не являющихся характерными как для РФ, так и для всех популяций мира. У этнических осетин два данных варианта суммарно составили 60% всех выявленных мутаций (P281L — 42,11%, P211T — 18,42%). Один из вариантов P211T относится к мягким генетическим вариантам с остаточной активностью фермента фенилаланингидроксилазы 72%, что приводит к более легкой клинической картине заболевания и отсутствию необходимости в заместительной диетотерапии;

- в гене *CFTR* при муковисцидозе — преобладание мутации первого класса W1282X, что ограничивает пациентов в проведении таргетной терапии.

ВЫВОДЫ

На сегодняшний день нет универсального подхода к развитию диагностики, лечению и лекарственному обеспечению пациентов с орфанной патологией, который может быть тиражирован во всем мире. В то же время накопился достаточно большой опыт по решению проблем, связанных с РБ. Определенные достижения существуют и в России. Так сформированы и регулярно пополняются федеральные регистры по различным орфанным заболеваниям и определены уровни финансирования зачастую дорогостоящего лечения. В ходе настоящего исследования определена структура и популяционно-генетические особенности РБ из группы РЖЗ и ВЗН в PCSA и в РФ. Показано наличие особенностей распространения для ряда заболеваний и статистически достоверно схожие значения по большей части заболеваний с данными по РФ и Orphanet. Несмотря на значительный прогресс в области диагностики и лечения орфанной патологии, выявляемость указанных видов нозологий в регионе, так же как в стране, остается недостаточной. Это приводит к необходимости использования мирового опыта организации межрегиональных орфанных центров и более широкому внедрению методов подтверждающей диагностики, секвенирования экзосом/генома за счет бюджетных средств. Отдельной проблемой является ограниченный спектр возможностей бесплатной ДНК-диагностики для взрослых. Неоценимый вклад в повышение доступности лекарственных препаратов и началу терапии в более ранние сроки оказало формирование фонда «Круг добра». В регионе отработана система взаимодействия с фондом. Ежегодно Министерство здравоохранения PCSA при составлении проекта бюджета включает в него потребность в средствах для льготного лекарственного обеспечения указанной категории больных, рассчитанную в соответствии с персональными медицинскими назначениями, индивидуально на каждого пациента. По состоянию на конец 2022 г. в республиканском сегменте информационного ресурса «Круг добра» состояло 22 пациента, страдающих РБ. Все они обеспечены лекарственными препаратами и лечебным питанием в полном объеме. Перерывов в начатой терапии у пациентов, принимающих лекарственные препараты за счет Фонда, нет. С ноября 2021 г. получены лекарственные препараты на сумму 369 165 971,70 руб. Отпущено 188 рецептов на сумму 210 304 075,10 руб. Расширение спектра скринируемой патологии также будет способствовать оптимизации выявляемости РБ на доклиническом этапе. И мы, безусловно, стоим на пороге совершенно новой эпохи, когда ранняя диагностика таких заболеваний может перейти в разряд рутинных мероприятий, а расширение возможностей генной терапии позволит оптимизировать течение большого количества ранее не излечимых заболеваний.

Литература

1. Ferreira CR. The burden of rare diseases. Am J Med Genet. 2019; 179A: 885–92. DOI: 10.1002/ajmg.a.61124.
2. Wakap NS, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. 2020, 28, 165–173. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>.
3. Васильева Т. П., Зинченко Р. А., Комаров И. А., Красильникова Е. Ю., Александрова О. Ю., Коновалов О. Е. и др. Распространенность и вопросы диагностики редких (орфанных) заболеваний среди детского населения Российской Федерации. Педиатрия. Журнал имени Г. Н. Сперанского. 2020; 99 (4): 229–37. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-4-229-237.

4. Зинченко Р. А., Васильева Т. П., Коновалов О. Е., Комаров И. А., Красильникова Е. Ю., Александрова О. Ю. и др. Инвалидность и летальность при редких (орфанных) заболеваниях среди детского населения Российской Федерации. *Педиатрия. Журнал имени Г. Н. Сперанского*. 2020; 99 (3): 271–8. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-3-271-278.
5. Song P, Gao J, Inagaki Y, Kokudo N, Tang W. Rare diseases, orphan drugs, and their regulation in Asia: Current status and future perspectives. *Intractable Rare Dis Res*. 2012; 1 (1): 3–9. Available from: <https://doi.org/10.5582/irdr.2012.v1.1.3> PMID: 25343064.
6. Shafie AA, Supian A, Ahmad Hassali MA, Ngu L-H, Thong M-K, Ayob H, et al. Rare disease in Malaysia: Challenges and solutions. *PLoS ONE*. 2020; 15 (4): e0230850. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230850>.
7. Chiu AT, Chung CC, Wong WH, Lee SL, Chung BH. Healthcare burden of rare diseases in Hong Kong — adopting ORPHAcodes in ICD-10 based healthcare administrative datasets. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2018; 13 (1): 147. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0892-5>.
8. Liu Y, Qian S. Current situation and prospect for the diagnosis and treatment of pediatric critical rare diseases in China. *Pediatric Investigation*. 2024; 8 (1): 66–71. Available from: <https://doi.org/10.1002/ped4.12419>.
9. Taruscio D, Baynam G, Cederoth H, Groft S, Klee E, Kasaki K, et al. The Undiagnosed Diseases Network International: Five years and more! *Mol Genet Metab*. 2020; 129 (4): 243–54.
10. Macnamara EF, D'Souza P. Undiagnosed Diseases Network, Tiffit CJ. The undiagnosed diseases program: Approach to diagnosis. *Transl Sci Rare Dis*. 2019; 4 (3–4): 179–88.
11. Васичкина Е. С., Костарева А. А. Редкие и неизвестные заболевания — современный тренд медицины. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022; 2 (2): 72–83. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-2-72-83.
12. Schoch K, Esteves C, Bican A, Spillman R, Cope H, McConkie-Rosell A, et al. Clinical sites of the Undiagnosed Diseases Network: unique contributions to genomic medicine and science. *Genet Med*. 2021; 23 (2): 259–71.
13. Lopez-Martin E, Martinez-Delgado B, Bermejo-Sanchez E, Alonso J. SpainUDP: The Spanish Undiagnosed Rare Diseases Program. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15 (8): 1746.
14. Takahashi Y, Mizusawa H. Initiative on Rare and Undiagnosed Disease in Japan. *JMAJ*. 2021; 4 (2): 112–8.
15. Kim SY, Lim BC, Lee JS, Kim WJ, Lim H, Ko JM, et al. The Korean undiagnosed diseases program: lessons from a one-year pilot project. *Orphanet J Rare Dis*. 2019; 14: 68.
16. Yang L, Su C, Lee AM, et al. Focusing on rare diseases in China: are we there yet? *Orphanet J Rare Dis*. 2015; 10: 142.
17. Геномика Англии. Протокол проекта «100 000 геномов». 2017 г. Available from: https://figshare.com/articles/journal_contribution/GenomicEnglandProtocol_pdf/4530893/4.
18. Smedley D, Smith KR, Martin A, Thomas EA, McDonagh EM, Cipriani V. 100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care — Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2021; 385 (20): 1868–80. DOI: 10.1056/NEJMoa2035790. PMID: 34758253; PMCID: PMC7613219.
19. Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen J, Danis D, Gourdine J, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47: D1018–D1027. PubMed: 30476213.
20. Martin AR, Williams E, Foulger RE, Leigh S. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet*. 2019; 51: 1560–5. PubMed: 31676867.
21. Rowlands C, Thomas HB, Lord J, Wai H, Arno G, Beaman G, et al. Comparison of in silico strategies to prioritize rare genomic variants impacting RNA splicing for the diagnosis of genomic disorders. *Sci Rep*. 2021; 11: 20607. PubMed: 34663891.
22. Available from: www.rosminzdrav.ru/documents/8048-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy.
23. Шашель В. А., Фирсова В. Н., Трубилина М. М., Подпорина Л. А., Фирсов Н. А. Орфанные заболевания и связанные с ними проблемы. *Медицинский вестник Юга России*. 2021; 12 (2): 28–35. DOI: 10.21886/2219-8075-2021-12-2-28-35.
24. Available from: <http://komitet-zdorov.duma.gov.ru/about/ekspertrnye-sovety/orfany>.
25. Available from: www.orpha.net.
26. Клинические рекомендации. Классическая фенилкетонурия и другие виды гиперфенилаланиемии. 2020. Available from: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/482>.
27. Tebieva IS, Mishakova PV, Gabisova YV, Khokhova AV, Kaloeva TG, Marakhonov AV, et al. Genetic landscape and clinical features of hyperphenylalaninemia in North Ossetia-Alania: High Frequency of P281L and P211T Genetic Variants in the PAH Gene. *Int J Mol Sci*. 2024; 25, 4598. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25094598>.
28. Тебиева И. С., Габисова Ю. В., Зинченко Р. А. Результаты 15-летнего неонатального скрининга в Республике Северная Осетия-Алания. *Медицинская генетика*. 2023; 22 (2): 40–47. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.02.40-47>.
29. Тебиева И. С., Гетоева З. К., Петрова Н. В., Габисова Ю. В., Джаджиева М. Ю., Зинченко Р. А., Джелиев И. Ш. Муковисцидоз: этиология, патогенез, клиника, результаты неонатального скрининга и генетические аспекты в республике Северная Осетия — Алания. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2021; (100) 1: 222–8. DOI: 10.24110/0031-403X-2021-100-1-222-228.
30. Аюпова Г. Р., Миннихметов И. Р., Хусаинова Р. И. Муковисцидоз: современные возможности диагностики и лечения на основе молекулярного патогенеза. *Медицинская генетика*. 2022; 21 (9): 22–27.
31. Клинические рекомендации по кистозному фиброзу (муковисцидозу). 2021; Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/372_2.
32. Мовсисян Г. Б., Роппель А. А., Юхачева Д. В., Щербина А. Ю., Сметанина Н. С., Савостьянов К. В. и др. Редкое наблюдение реакции гиперчувствительности на препараты для ферментной заместительной терапии у ребенка с болезнью Гоше 3-го типа. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2022; 101 (2): 113–21.

References

1. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet*. 2019; 179A: 885–92. DOI: 10.1002/ajmg.a.61124.
2. Wakap NS, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. 2020, 28, 165–173. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>.
3. Vasileva TP, Zinchenko RA, Komarov IA, Krasil'nikova EYu, Aleksandrova OYu, Kononov OE, i dr. Rasprostranennost' i voprosy diagnostiki redkih (orfannyh) zabolevanij sredi detskogo naselenija Rossijskoj Federacii. *Pediatrja. Zhurnal imeni G. N. Speranskogo*. 2020; 99 (4): 229–37. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-4-229-237. Russian.
4. Zinchenko RA, Vasileva TP, Kononov OE, Komarov IA, Krasilnikova EYu, Aleksandrova OYu, i dr. Invalidnost' i letal'nost' pri redkih (orfannyh) zabolevanijah sredi detskogo naselenija Rossijskoj Federacii. *Pediatrja. Zhurnal imeni G. N. Speranskogo*. 2020; 99 (3): 271–8. DOI: 10.24110/0031-403X-2020-99-3-271-278. Russian.
5. Song P, Gao J, Inagaki Y, Kokudo N, Tang W. Rare diseases, orphan drugs, and their regulation in Asia: Current status and future perspectives. *Intractable Rare Dis Res*. 2012; 1 (1): 3–9. Available from: <https://doi.org/10.5582/irdr.2012.v1.1.3> PMID: 25343064.
6. Shafie AA, Supian A, Ahmad Hassali MA, Ngu L-H, Thong M-K, Ayob H, et al. Rare disease in Malaysia: Challenges and solutions. *PLoS ONE*. 2020; 15 (4): e0230850. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230850>.
7. Chiu AT, Chung CC, Wong WH, Lee SL, Chung BH. Healthcare

- burden of rare diseases in Hong Kong — adopting ORPHA codes in ICD-10 based healthcare administrative datasets. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2018; 13 (1): 147. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0892-5>.
8. Liu Y, Qian S. Current situation and prospect for the diagnosis and treatment of pediatric critical rare diseases in China. *Pediatric Investigation*. 2024; 8 (1): 66–71. Available from: <https://doi.org/10.1002/ped4.12419>.
 9. Taruscio D, Baynam G, Cederroth H, Groft S, Klee E, Kasaki K, et al. The Undiagnosed Diseases Network International: Five years and more! *Mol Genet Metab*. 2020; 129 (4): 243–54.
 10. Macnamara EF, D'Souza P. Undiagnosed Diseases Network, Tiffit CJ. The undiagnosed diseases program: Approach to diagnosis. *Transl Sci Rare Dis*. 2019; 4 (3–4): 179–88.
 11. Vasichkina ES, Kostareva AA. Redkie i neizvestnye zabojevanija — sovremennij trend mediciny. *Rossijskij zhurnal personalizirovannoj mediciny*. 2022; 2 (2): 72–83. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-2-72-83. Russian.
 12. Schoch K, Esteves C, Bican A, Spillman R, Cope H, McConkie-Rosell A, et al. Clinical sites of the Undiagnosed Diseases Network: unique contributions to genomic medicine and science. *Genet Med*. 2021; 23 (2): 259–71.
 13. Lopez-Martin E, Martinez-Delgado B, Bermejo-Sanchez E, Alonso J. SpainUDP: The Spanish Undiagnosed Rare Diseases Program. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15 (8): 1746.
 14. Takahashi Y, Mizusawa H. Initiative on Rare and Undiagnosed Disease in Japan. *JMAJ*. 2021; 4 (2): 112–8.
 15. Kim SY, Lim BC, Lee JS, Kim WJ, Lim H, Ko JM, et al. The Korean undiagnosed diseases program: lessons from a one-year pilot project. *Orphanet J Rare Dis*. 2019; 14: 68.
 16. Yang L, Su C, Lee AM, et al. Focusing on rare diseases in China: are we there yet? *Orphanet J Rare Dis*. 2015; 10: 142.
 17. Genomika Anglii. Protokol proekta «100 000 genomov». 2017 g. Available from: https://figshare.com/articles/journal_contribution/GenomicEnglandProtocol.pdf/4530893/4.
 18. Smedley D, Smith KR, Martin A, Thomas EA, McDonagh EM, Cipriani V. 100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care — Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2021; 385 (20): 1868–80. DOI: 10.1056/NEJMoa2035790. PMID: 34758253; PMCID: PMC7613219.
 19. Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen J, Danis D, Gourdiere J, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47: D1018–D1027. PubMed: 30476213.
 20. Martin AR, Williams E, Foulger RE, Leigh S. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet*. 2019; 51: 1560–5. PubMed: 31676867.
 21. Rowlands C, Thomas HB, Lord J, Wai H, Arno G, Beaman G, et al. Comparison of in silico strategies to prioritize rare genomic variants impacting RNA splicing for the diagnosis of genomic disorders. *Sci Rep*. 2021; 11: 20607. PubMed: 34663891.
 22. Available from: www.rosminzdrav.ru/documents/8048-perechen-redkih-orfannyh-zabolevanij.
 23. Shashel VA, Firsova VN, Trubilina MM, Podporina LA, Firsov NA. Orfannye zabojevanija i svjazannye s nimi problemy. *Medicinskij vestnik Juga Rossii*. 2021; 12 (2): 28–35. DOI: 10.21886/2219-8075-2021-12-2-28-35. Russian.
 24. Available from: <http://komitet-zdorov.duma.gov.ru/about/ekspertnye-sovety/orfany>.
 25. Available from: www.orpha.net.
 26. Klinicheskie rekomendacii. Klassicheskaja fenilketonurija i drugie vidy giperfenilalaninemii. 2020. Available from: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/482>.
 27. Tebieva IS, Mishakova PV, Gabisova YV, Khokhova AV, Kaloeva TG, Marakhonov AV, et al. Genetic landscape and clinical features of hyperphenylalaninemia in North Ossetia-Alania: High Frequency of P281L and P211T Genetic Variants in the PAH Gene. *Int J Mol Sci*. 2024; 25, 4598. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25094598>.
 28. Tebieva IS, Gabisova YuV, Zinchenko RA. Rezul'taty 15-letnego neonatal'nogo skrininga v Respublike Severnaja Osetija-Alanija. *Medicinskaja genetika*. 2023; 22 (2): 40–47. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.02.40-47>. Russian.
 29. Tebieva IS, Getoeva ZK, Petrova NV, Gabisova YuV, Dzhadzhieva MYu, Zinchenko RA, Dzhelev ISh. Mukoviscidoz: jetiologija, patogenez, klinika, rezul'taty neonatal'nogo skrininga i geneticheskie aspekty v respublike Severnaja Osetija — Alanija. *Pediatrica. Zhurnal im. G. N. Speranskogo*. 2021; (100) 1: 222–8. DOI: 10.24110/0031-403X-2021-100-1-222-228. Russian.
 30. Ajupova GR, Minniametov IR, Husainova RI. Mukoviscidoz: sovremennye vozmozhnosti diagnostiki i lechenija na osnove molekuljarnogo patogeneza. *Medicinskaja genetika*. 2022; 21 (9): 22–27. Russian.
 31. Klinicheskie rekomendacii po kistoennomu fibrozu (mukoviscidozu). 2021; Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/372_2. Russian.
 32. Movsisjan GB, Roppelt AA, Juhacheva DV, Shherbina AYU, Smetanina NS, Savostjanov KV, i dr. Redkoe nabljudenie reakcii giperchuvstvitel'nosti na preparaty dlja fermentnoj zamestitel'noj terapii u rebenka s boleznu Goshe 3-go tipa. *Pediatrica. Zhurnal im. G. N. Speranskogo*. 2022; 101 (2): 113–21. Russian.

ПОТЕНЦИАЛ НЕКЛАССИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

М. А. Добронос^{1,2}, З. М. Осипова^{1,3} ✉, Н. М. Мышкина¹

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

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

Производство биотерапевтических препаратов, в частности, рекомбинантных белков в клетках млекопитающих может быть затруднено из-за ограничений используемых культур в связи с метаболической нагрузкой. Альтернативным подходом для решения таких задач является наработка белков в клетках других животных (например, культуры клеток насекомых Sf9, S2 и High Five, культуры клеток червей видов *Caenorhabditis elegans* и *Schistosoma mansoni*) или ортогональных клеточных системах, в том числе растительных. С нашей точки зрения, применение неклассических клеточных культур может стать перспективным направлением для получения более доступных и эффективных биотерапевтических препаратов.

Ключевые слова: биотерапевтические препараты, растительные клеточные культуры, метаболическая нагрузка, клеточная линия High Five, клеточная линия Sf9

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 21-74-10152, <https://rscf.ru/project/21-74-10152/>.

Благодарности: авторы благодарят А. Д. Барыкина из отдела биоорганической химии ИБХ РАН за плодотворное обсуждение идеи публикации.

Вклад авторов: М. А. Добронос — поиск и анализ литературы, написание рукописи; З. М. Осипова — руководство проектом, редактирование рукописи; Н. М. Маркина — идея рукописи, поиск и анализ литературы, написание рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Зинаида Михайловна Осипова
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; zkaskova@ibch.ru

Статья получена: 20.04.2024 **Статья принята к печати:** 12.05.2024 **Опубликована онлайн:** 13.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.022

POTENTIAL OF NON-TRADITIONAL CELL CULTURES FOR PRODUCTION OF BIOTHERAPEUTIC PROTEINS

Dobronos MA^{1,2}, Osipova ZM^{1,3} ✉, Myshkina NM¹

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

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

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Production of biotherapeutic drugs in mammalian cells, recombinant proteins in particular, may be handicapped by the limitations imposed on the cultures by metabolic burden. An alternative solution is to produce proteins in cells of other animals (e.g., Sf9, S2 and High Five insect cell lines, *Caenorhabditis elegans* and *Schistosoma mansoni* cell line) or orthogonal cell systems, including plant-based. In our opinion, non-traditional cell cultures may become promising tool for production of affordable and effective biotherapeutic drugs.

Keywords: biotherapeutic drugs, plant cell cultures, metabolic burden, High Five cell line, Sf9 cell line

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-74-10152, <https://rscf.ru/project/21-74-10152/>

Acknowledgements: the authors thank A.D. Barykin from the Department of Bioorganic Chemistry of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences for the fruitful discussion of the idea of this publication.

Author contribution: Dobronos MA — literature search and analysis, manuscript authoring; Osipova ZM — project management, manuscript editing; Markina NM — manuscript idea, literature search and analysis, manuscript authoring.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zinaida Mikhailovna Osipova
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997; zkaskova@ibch.ru

Received: 20.04.2024 **Accepted:** 12.05.2024 **Published online:** 13.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.022

Повышение эффективности производства биотерапевтических препаратов — одна из ключевых задач современной фармацевтики. В зависимости от желаемого состава препарата лимитирующей стадией может быть поиск природного источника или разработка его искусственного аналога, увеличение эффективности производства источником или решение задачи по оптимизации очистки от примесей и неэффективных форм [1, 2]. Наш коллектив авторов хочет осветить потенциал использования неклассических клеточных культур для решения вышеперечисленных проблем.

Самое широкое применение клеточные культуры нашли в производстве биотерапевтических белковых препаратов, среди которых наиболее значимы моноклональные

антитела. Флагманом считают культуру клеток яичника китайского хомячка (chinese hamster ovary, CHO), которая сочетает в себе простоту культивации и быстрый рост, гарантирует корректную трансляцию, сворачивание и посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, а также способна к выделению в культуральную среду больших количеств продукта, что позволяет достичь наибольших выходов целевого препарата среди всех клеточных культур млекопитающих [3]. Недостатки всех культур клеток млекопитающих, включая CHO, — высокая стоимость и необходимость особых условий работы и оборудования, а также подверженность метаболической нагрузке (metabolic burden). Внешние проявления метаболической нагрузки выражены в том, что, начиная

с определенных значений выхода рекомбинантного белка перестают работать стандартные технологии по его увеличению, такие как повышение числа копий рекомбинантного гена, использование более сильных регуляторных последовательностей и т. д. [4]. Причина заключается в том, что на данном этапе рекомбинантные процессы начинают конкурировать за ресурсы клеточной машинерии со внутренними процессами клетки-хозяина, необходимыми для поддержания ее жизнеспособности: всего насчитывается порядка 8–10 точек напряженности, включающих в себя процессы транскрипции, трансляции, посттрансляционных модификаций и экспорта белков [5]. Для преодоления негативных последствий метаболической нагрузки используют различные механизмы балансировки метаболизма, однако этот процесс очень трудоемкий, поскольку необходимо определить все лимитирующие стадии [6] и подобрать такой метод их преодоления, который не скажется на общей жизнеспособности клетки-продуцента [7, 8]. Однако даже успешная балансировка метаболизма может не привести к значительному повышению выхода рекомбинантного белка, поскольку производство некоторых биотерапевтических белков может быть настолько трудозатратным для клетки млекопитающего, что все попытки его оптимизации будут упираться в физиологические пределы клетки-хозяина. Так, например, рекомбинантное производство фактора свертывания крови VIII (F8) в культуре CHO может быть оценено в «энергетическую стоимость» около 10 000 молекул АТФ в расчете на одну функциональную молекулу F8 [5].

Альтернативным подходом может стать применение для наработки белковых препаратов такого организма-продуцента, физиологические ресурсы которого исходно выше, чем у клеток млекопитающих: клетки других видов животных или ортогональные клеточные системы, например культура клеток растений (см. таблицу). Одно из основных преимуществ биотерапевтических соединений растительного происхождения заключается в их высокой безопасности. Это обусловлено невозможностью заражения человеческими патогенами, отсутствием продукции эндотоксинов и сниженной иммуногенностью, в результате чего улучшается переносимость препаратов, а побочные эффекты минимизируются. Например, талиглюцераза альфа (β -D-глюкозил-N-ацилсфингозинглюкогидролаза), вырабатываемая в клетках трансгенной моркови для лечения болезни Гоше 1-го типа, в ходе клинических испытаний не продемонстрировала явных побочных эффектов, связанных с N-гликановыми остатками. Также не было обнаружено антител к данному препарату [9]. Кроме того, культуры растительных клеток подходят для пероральной доставки биологических препаратов без очистки или с минимальной очисткой. Стенки растительных клеток могут защищать биопрепараты от ферментативной деградации в желудочно-кишечном тракте, а также способствовать доставке этих препаратов в лимфоидную ткань кишечника в активной форме. Производство пероральных биофармацевтических препаратов из съедобных растительных тканей показало свою эффективность и в клинических испытаниях вакцин [10].

Другим важным аспектом применения культур растительных клеток является достижение высокого уровня экспрессии мультибелковых комплексов, требующих сложных процессов сворачивания и сборки. Для увеличения выхода таких белков могут быть

использованы стратегии конструирования одного вектора с набором рекомбинантных генов и совместный биосинтез рекомбинантных белков вместе с шаперонами того же происхождения [11]. Кроме того, введение экзогенной сигнальной последовательности, направляющей белок по определенному секреторному пути, может способствовать увеличению выхода малых белков массой менее 30 кДа. Оптимизация процесса ферментации, включая непрерывную или полунепрерывную ферментацию, рассматривается нами как универсальный метод для повышения выхода белка при использовании как культур растительных клеток, так и культур клеток насекомых.

Для производства биотерапевтических белков в системах бакуловирусной экспрессии также широко применяют клеточные линии насекомых *Spodoptera frugiperda* Sf21, Sf9 и *Trichoplusia ni* ВТ1 5B1-4 (High Five) — адгезивные неперемиссивные культуры, полученные из тканей яичников соответствующих насекомых [12]. Имея схожие механизмы посттрансляционной модификации белков, культуры клеток насекомых представляют собой удобный, экономически выгодный и масштабируемый инструмент для производства вакцинных антигенов и вирусоподобных частиц [13]. Кроме того, сконструированные бакуловирусы с промоторами млекопитающих обладают значительным потенциалом в качестве векторов для доставки генов в клетки млекопитающих [14]. Паттерн гликозилирования в этих экспрессионных системах немного отличается от человеческого, однако задачи гуманизированного гликозилирования можно успешно решить с помощью параллельной экспрессии гликотрансфераз млекопитающих, а также удаления специфических для насекомых альфа-1,3-фукозилированных гликанов, которые могут быть аллергенными для человека. В культурах клеток насекомых производят белки-антигены, потенциально являющиеся вакцинными кандидатами против COVID-19 [15–17] и малярии [18].

Использование технологии CRISPR может значительно ускорить получение стабильных экспрессионных гликоинженерных линий насекомых. Ранее было показано, что CRISPR можно применять для нокаутирования генов в клеточных линиях *Drosophila* и *Bombyx*, а также для нокаута гена N-ацетилглюкозаминидазы на клеточной линии S2, что приводит к кратному увеличению количества концевых остатков GlcNAc в рекомбинантном эритропоэтине человека [19]. Перспективным направлением представляется также модификация линий Sf9 и High Five, например, множественная дупликация генов гликотрансферазы млекопитающих может обеспечить еще более высокий уровень экспрессии белков с корректным гликозилированием и фолдингом.

Альтернативным решением для ряда биомедицинских применений могут также стать клеточные линии червей. Так, эмбриональные клеточные культуры из *C. elegans* используют для изучения процессов дифференцировки клеток, морфогенеза и динамики генной экспрессии, что открывает широкий спектр недоступных ранее экспериментальных возможностей [20]. Соматические клетки из различных тканей *C. elegans* (включая нейроны, мышечные клетки, клетки гиподермы и кишечника) могут быть культивированы для целенаправленного изучения тканево-специфических взаимодействий и сигнальных путей [21]. Клеточная культура паразитического плоского червя *Schistosoma mansoni*, способная к непрерывной культивации в течение 6 месяцев [22], также

Таблица. Сравнение наиболее распространенных типов экспрессионных клеточных культур [11, 24, 25]

Экспрессионная платформа	Достоинства	Недостатки	Посттрансляционные модификации	Стоимость, сложность очистки	Возможность масштабирования	Безопасность
Бактерии (<i>E. coli</i>)	Низкая стоимость Простота генной инженерии Быстрый рост культуры и высокий выход целевого продукта Отработанные стратегии оптимизации экспрессии	Некорректный фолдинг некоторых белков и образование телец включений. Наличие эндотоксинов	Ненативные Отсутствие гликозилирования Трудности с образованием дисульфидных связей	Низкая	+++	Средняя
Дрожжи (<i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i>)	Низкая стоимость Простота генной инженерии Быстрый рост культуры и высокий выход целевого продукта Отработанные стратегии оптимизации Корректный фолдинг больших (> 30 кДа) белков	Клеточная стенка может затруднять процесс очистки	Ненативные Существуют штаммы с возможностями ограниченного гликозилирования	Низкая	+++	Средняя
Растительные системы (BY-2, NT-1)	Быстрый рост культуры и высокий выход целевого продукта Возможность экспрессии мультибелковых комплексов	Генетическая нестабильность линий при длительных культивациях Повышенный риск контаминации культуры	Ненативные (требуется оптимизация генетических векторов)	Средняя / Отсутствует для съедобных растений	+++	Очень высокая
Клетки насекомых (Sf21, Sf9, Hi5)	Экспрессия эукариотических мультибелковых комплексов с корректным фолдингом Более высокие выходы продукта	Экспрессия с использованием сильных промоторов может нарушать фолдинг Нецелевое гликозилирование	Упрощенное N-гликозилирование	Средняя	+++	Низкая
Клетки млекопитающих (CHO, HEK293)	Нативное липидное окружение и условия фолдинга Возможность индуцибельной экспрессии с помощью транзientной трансфекции Возможность использования FACS (сортировка клеток, основанная на флуоресценции) на стабильных линиях	Низкий уровень экспрессии Сверхэкспрессия некоторых белков невозможна из-за токсичности Длительная оптимизация условий экспрессии	Нативные	Средняя	++	Низкая
Системы бесклеточной экспрессии	Быстрый метод экспрессии Возможность получения токсичных белков Детальный контроль параметров среды во время экспрессии	Высокая стоимость Недостаток <i>in vivo</i> факторов, обеспечивающих фолдинг	Необходимы дополнительные компоненты (например, микросомы ЭПР)	Низкая	+	Очень высокая

может стать интересным инструментом для изучения взаимодействий паразит–хозяин, а также тестирования антигельминтных препаратов. Многие виды морских червей являются источниками биологически активных соединений, в том числе пептидов с антимикробным, противовоспалительным, иммуномодулирующим, антиоксидантным и антигипоксическим действием [23]. Разработка и оптимизация технологий выделения и длительной культивации клеток червей могла бы дать толчок для скрининга и последующей эффективной наработки таких биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование неклассических клеточных культур является перспективным направлением повышения эффективности производства биотерапевтических препаратов. Ряд особенностей механизмов экспрессии в альтернативных культурах позволяет минимизировать побочные эффекты и улучшить переносимость получаемых белковых препаратов. Также альтернативные организмы-продуценты помогают обойти ограничения, связанные с повышенной метаболической нагрузкой в культурах клеток

млекопитающих. Это открывает двери для разработки и производства более эффективных и доступных

биотерапевтических препаратов, способствуя прогрессу в области фармацевтики и медицины.

Литература

- Daboussi F, Lindley ND. Challenges to Ensure a Better Translation of Metabolic Engineering for Industrial Applications. In: Selvarajoo K, editor. *Comput Biol Mach Learn Metab Eng Synth Biol.*, New York, NY: Springer US; 2023: 1–20. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2617-7_1.
- Rudge SR, Ladisch MR. Industrial Challenges of Recombinant Proteins. In: Silva AC, Moreira JN, Lobo JMS, Almeida H, editors. *Curr Appl Pharm Biotechnol*, Cham: Springer International Publishing; 2020: p. 1–22. Available from: https://doi.org/10.1007/10_2019_120.
- Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O'Sullivan F, et al. Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol.* 2011; 11: 78. Available from: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-78>.
- Frei T, Cella F, Tedeschi F, Gutiérrez J, Stan G-B, Khammash M, et al. Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. *Nat Commun.* 2020; 11: 4641. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18392-x>.
- Gutiérrez JM, Feizi A, Li S, Kallehauge TB, Hefzi H, Grav LM, et al. Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nat Commun.* 2020; 11: 68. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13867-y>.
- Kaste JAM, Shachar-Hill Y. Model validation and selection in metabolic flux analysis and flux balance analysis. *Biotechnol Prog.* 2024; 40: e3413. Available from: <https://doi.org/10.1002/btpr.3413>.
- Eisenhut P, Marx N, Borsi G, Papež M, Ruggeri C, Baumann M, et al. Manipulating gene expression levels in mammalian cell factories: An outline of synthetic molecular toolboxes to achieve multiplexed control. *New Biotechnol.* 2024; 79: 1–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.11.003>.
- Kol S, Ley D, Wulff T, Decker M, Arnsdorf J, Schoffelen S, et al. Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat Commun.* 2020; 11: 1908. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15866-w>.
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrahi S, et al. A Plant-Derived Recombinant Human Glucocerebrosidase Enzyme — A Preclinical and Phase I Investigation. *PLOS ONE.* 2009; 4: e4792. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004792>.
- Fausther-Bovendo H, Kobinger G. Plant-made vaccines and therapeutics. *Science* 2021; 373: 740–1. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf5375>.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 1415–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt1027>.
- Woo S-D, Roh JY, Choi JY, Jin BR. Propagation of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus in nonpermissive insect cell lines. *J Microbiol Seoul Korea.* 2007; 45: 133–8.
- Hong M, Li T, Xue W, Zhang S, Cui L, Wang H, et al. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.994743>.
- Hu Y-C, Yao K, Wu T-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines.* 2008; 7: 363–71. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.7.3.363>.
- Fernandes B, Castro R, Bhoelan F, Bemelman D, Gomes RA, Costa J, et al. Insect Cells for High-Yield Production of SARS-CoV-2 Spike Protein: Building a Virosome-Based COVID-19 Vaccine Candidate. *Pharmaceutics.* 2022; 14: 854. Available from: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040854>.
- Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Sci.* 2022; 31: e4300. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.4300>.
- Li T, Zheng Q, Yu H, Wu D, Xue W, Xiong H, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 2076–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821583>.
- Fernandes B, Sousa M, Castro R, Schäfer A, Hauser J, Schulze K, et al. Scalable Process for High-Yield Production of PfCyRPA Using Insect Cells for Inclusion in a Malaria Virosome-Based Vaccine Candidate. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.879078>.
- Mabashi-Asazuma H, Kuo C-W, Khoo K-H, Jarvis DL. Modifying an Insect Cell N-Glycan Processing Pathway Using CRISPR-Cas Technology. *ACS Chem Biol.* 2015; 10: 2199–208. Available from: <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00340>.
- Strange K, Christensen M, Morrison R. Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1003–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.143>.
- Espejo L, Hull B, Chang LM, DeNicola D, Freitas S, Silbar V, et al. Long-Term Culture of Individual *Caenorhabditis elegans* on Solid Media for Longitudinal Fluorescence Monitoring and Aversive Interventions. *JoVE J Vis Exp.* 2022; e64682. Available from: <https://doi.org/10.3791/64682>.
- Hobbs DJ, Fryer SE, Duimstra JR, Hedstrom OR, Brodie AE, Collodi PA, et al. Culture of Cells from Juvenile Worms of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 1993; 79: 913–21. Available from: <https://doi.org/10.2307/3283730>.
- Lazcano-Perez F, Roman-Gonzalez SA, Sanchez-Puig N, Espinosa RA-. Bioactive Peptides from Marine Organisms: A Short Overview. *Protein Pept Lett.* 2002; 19: 700–7. Available from: <https://doi.org/10.2174/092986612800793208>.
- Jayakrishnan A, Wan Rosli WR, Tahir ARM, Razak FSA, Kee PE, Ng HS, et al. Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci.* 2024; 6: 9. Available from: <https://doi.org/10.3390/sci6010009>.
- Cid R, Bolívar J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules.* 2021; 11: 1072. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom11081072>.

References

- Daboussi F, Lindley ND. Challenges to Ensure a Better Translation of Metabolic Engineering for Industrial Applications. In: Selvarajoo K, editor. *Comput Biol Mach Learn Metab Eng Synth Biol.*, New York, NY: Springer US; 2023: 1–20. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2617-7_1.
- Rudge SR, Ladisch MR. Industrial Challenges of Recombinant Proteins. In: Silva AC, Moreira JN, Lobo JMS, Almeida H, editors. *Curr Appl Pharm Biotechnol*, Cham: Springer International Publishing; 2020: p. 1–22. Available from: https://doi.org/10.1007/10_2019_120.
- Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O'Sullivan F, et al. Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol.* 2011; 11: 78. Available from: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-78>.
- Frei T, Cella F, Tedeschi F, Gutiérrez J, Stan G-B, Khammash M, et al. Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. *Nat Commun.* 2020; 11: 4641. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18392-x>.

5. Gutierrez JM, Feizi A, Li S, Kallehauge TB, Hefzi H, Grav LM, et al. Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nat Commun.* 2020; 11: 68. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13867-y>.
6. Kaste JAM, Shachar-Hill Y. Model validation and selection in metabolic flux analysis and flux balance analysis. *Biotechnol Prog.* 2024; 40: e3413. Available from: <https://doi.org/10.1002/btpr.3413>.
7. Eisenhut P, Marx N, Borsi G, Papež M, Ruggeri C, Baumann M, et al. Manipulating gene expression levels in mammalian cell factories: An outline of synthetic molecular toolboxes to achieve multiplexed control. *New Biotechnol.* 2024; 79: 1–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.11.003>.
8. Kol S, Ley D, Wulff T, Decker M, Arnsdorf J, Schoffelen S, et al. Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat Commun.* 2020; 11: 1908. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15866-w>.
9. Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrahi S, et al. A Plant-Derived Recombinant Human Glucocerebrosidase Enzyme — A Preclinical and Phase I Investigation. *PLOS ONE.* 2009; 4: e4792. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004792>.
10. Fausther-Bovendo H, Kobinger G. Plant-made vaccines and therapeutics. *Science* 2021; 373: 740–1. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf5375>.
11. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 1415–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt1027>.
12. Woo S-D, Roh JY, Choi JY, Jin BR. Propagation of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus in nonpermissive insect cell lines. *J Microbiol Seoul Korea.* 2007; 45: 133–8.
13. Hong M, Li T, Xue W, Zhang S, Cui L, Wang H, et al. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.994743>.
14. Hu Y-C, Yao K, Wu T-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines.* 2008; 7: 363–71. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.7.3.363>.
15. Fernandes B, Castro R, Bhoelan F, Bemelman D, Gomes RA, Costa J, et al. Insect Cells for High-Yield Production of SARS-CoV-2 Spike Protein: Building a Virosome-Based COVID-19 Vaccine Candidate. *Pharmaceutics.* 2022; 14: 854. Available from: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040854>.
16. Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Sci.* 2022; 31: e4300. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.4300>.
17. Li T, Zheng Q, Yu H, Wu D, Xue W, Xiong H, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 2076–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821583>.
18. Fernandes B, Sousa M, Castro R, Schäfer A, Hauser J, Schulze K, et al. Scalable Process for High-Yield Production of PfCyRPA Using Insect Cells for Inclusion in a Malaria Virosome-Based Vaccine Candidate. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.879078>.
19. Mabashi-Asazuma H, Kuo C-W, Khoo K-H, Jarvis DL. Modifying an Insect Cell N-Glycan Processing Pathway Using CRISPR-Cas Technology. *ACS Chem Biol.* 2015; 10: 2199–208. Available from: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00340>.
20. Strange K, Christensen M, Morrison R. Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1003–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.143>.
21. Espejo L, Hull B, Chang LM, DeNicola D, Freitas S, Silbar V, et al. Long-Term Culture of Individual *Caenorhabditis elegans* on Solid Media for Longitudinal Fluorescence Monitoring and Aversive Interventions. *JoVE J Vis Exp.* 2022: e64682. Available from: <https://doi.org/10.3791/64682>.
22. Hobbs DJ, Fryer SE, Duimstra JR, Hedstrom OR, Brodie AE, Collodi PA, et al. Culture of Cells from Juvenile Worms of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 1993; 79: 913–21. Available from: <https://doi.org/10.2307/3283730>.
23. Lazcano-Perez F, Roman-Gonzalez SA, Sanchez-Puig N, Espinosa RA-. Bioactive Peptides from Marine Organisms: A Short Overview. *Protein Pept Lett.* 2002; 19: 700–7. Available from: <https://doi.org/10.2174/092986612800793208>.
24. Jayakrishnan A, Wan Rosli WR, Tahir ARM, Razak FSA, Kee PE, Ng HS, et al. Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci.* 2024; 6: 9. Available from: <https://doi.org/10.3390/sci6010009>.
25. Cid R, Bolívar J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules.* 2021; 11: 1072. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom11081072>.

АСПЕКТЫ ХИМИИ И ПАТОХИМИИ ХРУСТАЛИКА

С. В. Смирнов ✉, О. Ю. Кузнецова, М. А. Постников

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

Хрусталик (*lens cristalina*) является частью светопроводящей и светопреломляющей системы глаза. Главные свойства хрусталика — прозрачность и светопреломление. Питательные вещества поступают к нему через капсулу путем диффузии и активного транспорта. Энергетические потребности бессосудистого эпителиального образования в 10–20 раз ниже, чем потребности других органов и тканей. Они удовлетворяются посредством анаэробного гликолиза. На сегодняшний день недостаточно сведений, отражающих особенности базового химического механизма существования хрусталика в норме, механизмы его функциональной «выживаемости» на фоне соматической патологии, в частности, диабета. В работе представлен взгляд авторов на отдельные химические аспекты, проясняющие патохимические изменения хрусталика с возможными механизмами его «адаптации»/«защиты» на фоне системной патологии на молекулярном уровне. В частности, на участие ферментов окислительного и неокислительного этапов пентозофосфатного шунта — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы/транскетолазы, относящихся к семейству белков собственной кристаллиновой фракции, в механизмах защиты хрусталика от окислительного и осмотического стресса, участие альдо- и кеторедуктаз в патохимических изменениях хрусталика, а также роль «малых молекул» NO, NO₃⁻, B₆, PQQ с антиоксидантным цитопротекторным эффектом.

Ключевые слова: хрусталик, альдоредуктаза, кеторедуктаза, транскетолаза, кристаллины, ключевые аспекты патохимии

Вклад авторов: С. В. Смирнов — анализ литературы, сбор данных в сфере фундаментальной биоорганической химии; О. Ю. Кузнецова — интерпретация научных данных, подготовка рукописи; М. А. Постников — дизайн рукописи.

Благодарности: выражаем благодарность за помощь профессору кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ, д. м. н. Ф. Н. Гильмиевой в подготовке и редакции материалов и дизайна рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Вячеславович Смирнов
ул. Арцыбушевская, 171, 443001, Самара, Россия; s.v.smirnov@samsmu.ru

Статья получена: 28.02.2024 **Статья принята к печати:** 06.05.2024 **Опубликована онлайн:** 29.05.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.019

ASPECTS OF THE LENS CHEMISTRY AND PATHOCHEMISTRY

Smirnov SV ✉, Kuznetsova OYu, Postnikov MA

Samara State Medical University, Samara, Russia

The lens (*lens cristalina*) is part of the light conducting and light refracting system of the eye. Transparency and light refraction are the main properties of the lens. Nutrients are supplied to the lens through the capsule by diffusion and active transport. The energy needs of the avascular epithelial structure are 10–20 lower compared to that of other organs and tissues. Such needs are satisfied through anaerobic glycolysis. Currently, there is insufficient information about the fundamental chemical mechanism underlying the existence of the lens in the healthy body, the mechanisms of its functional “survival” against the background of somatic disorder, such as diabetes. The paper reports the authors’ view of certain chemical aspects clarifying pathochemical alterations of the lens with the possible mechanisms underlying its “adaptation”/“protection” associated with the systemic disorder at the molecular level. In particular, the view of the involvement of glucose-6-phosphate dehydrogenase/transketolase, the enzymes of the oxidative and non-oxidative phases of the pentose phosphate pathway belonging to the native crystalline fraction protein family, in the mechanisms underlying protection of the lens against the oxidative and osmotic stress, involvement of aldo-keto reductases in pathochemical alterations of the lens, as well as the role the NO, NO₃⁻, B₆, PQQ small molecules having an antioxidant cytoprotective effect is reported.

Keywords: lens, aldo-, ketoreductase, transketolase, crystallines, key pathochemistry aspects

Author contribution: Smirnov SV — literature review, data acquisition in the field of fundamental bioorganic chemistry; Kuznetsova OYu — research data interpretation, manuscript writing; Postnikov MA — manuscript design.

Acknowledgements: the authors would like to thank F.N. Gilmiyarova, D. Sc. (Med.), Professor at the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnosis, Samara State Medical University, for her help in manuscript writing, editing, and design.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey V. Smirnov
Arcybushevskaya, 171, 443001, Samara, Russia; s.v.smirnov@samsmu.ru

Received: 28.02.2024 **Accepted:** 06.05.2024 **Published online:** 29.05.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.019

Хрусталик (*lens cristalina*) является частью светопроводящей и светопреломляющей системы глаза. Главные свойства хрусталика — прозрачность и светопреломление. По степени преломления световых лучей он занимает второе место после роговицы. Оптическая сила этой живой биологической линзы состоит в пределах 19,00 дптр. Хрусталик имеет слоистую структуру. Питательные вещества поступают через капсулу путем диффузии и активного транспорта. Энергетические потребности данного бессосудистого эпителиального образования в 10–20 раз ниже, чем потребности других тканей и преимущественно за счет анаэробного гликолиза [1, 2]

Особенности химического состава

Первые химические исследования хрусталика проведены в конце XIX в., когда У. Морнером был выделен растворимый белок, названный кристаллином. В 1950-х гг. сначала В. Н. Орехович, а потом Р. А. Резник выделили из растворимых фракций белков хрусталика три фракции разной молекулярной массы, которые были названы α-, β- и γ-кристаллинами. Хрусталик содержит около 35% белков, 1% липидов и 64% воды. Белки хрусталика разделяют на водорастворимые и водонерастворимые. Более 90% растворимых белков составляют α-, β- и

γ -кристаллины. Для хрусталика характерен неоднородный белковый состав: в ядре преобладают фракции высокомолекулярных форм α -, β - и γ -кристаллина, а в кортексе основные белки — α - и β_L -кристаллины. α -Кристаллины (шапероны, молекулярный вес 160–1000 кДа) имеют преимущественно две изоформы — α_A -кристаллины и α_B -кристаллины, тормозят агрегацию поврежденных белков и таким образом поддерживают прозрачность хрусталика. β -Кристаллины (до 60%) включают в себя кислую подгруппу (β_A -кристаллины) и щелочную подгруппу (β_B -кристаллины) по четыре изоформы в каждой (обозначают арабскими цифрами от 1 до 4). И, наконец, γ -кристаллины представлены семью изоформами, их обозначают арабскими буквами A–F и S. γ -Кристаллины существуют исключительно в виде мономеров по 20 кДа и выполняют как и предыдущая группа структурную функцию [3, 4]. Из низкомолекулярных соединений обнаружены в существенных количествах витамины. Аскорбиновая кислота играет определенную роль в энергопродуцирующих процессах: транспортируя в хрусталик водород, входит в состав антиокислительной системы хрусталика. Витамины A, B₁, B₂, B₅ влияют на митотическую активность эпителия хрусталика; витамин E рассматривают как возможный антиокислительный фактор, предотвращающий развитие помутнений хрусталика. В хрусталике обнаружено несколько аналогов глутатиона, содержащихся в меньших количествах, причем в каждом из них заменен остаток цистеина. Лейцинаминопептидаза хрусталика наряду с транскетолазой является тоже неотъемлемой частью семейства белков кристаллиновой фракции [5].

Особенности базовых путей метаболизма

Для снабжения энергией расщепление глюкозы осуществляется путем аэробного и анаэробного гликолиза, прямого апопотомического окисления глюкозы (пентозофосфатный путь) и цикла Кребса. Возможен также сорбитный путь усвоения глюкозы хрусталиком. Однако на фоне патологии, например развития диабетической ретинопатии, усиливается другое направление утилизации излишне поступающих извне углеводов — полиольный путь, реализуемый посредством ключевого фермента, альдозоредуктазы. Данная группа ферментов, относящаяся к первому классу оксидоредуктаз, работает с никотинамидным кофактором, причем с его фосфорилированной формой, необходимой в tandemном связывании с активным центром данной редуктазы [6–9]. У нас возник вопрос: почему на фоне диабета и кетоацидоза тканей такое основное вещество, как финальный метаболит гликолитической деградации углеводов — пировиноградная кислота, прежде чем попасть в митохондрию (пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) внутренней мембраны), в цитозоле не оказывает эффекта на присутствующий здесь же фермент альдозоредуктазу, обладая высокой карбонильной активностью? Тем более, что в нативных условиях преобладают енольные формы биоорганических веществ с кето-енольной таутомерией и наличие в линейной структуре молекулы сопряженной карбонильной группы с кратной связью позволяет такой форме быть самой по себе мощным нуклеофильным агентом. Или определенный эффект все же возможен? И как он осуществляется в условиях молекулярного окружения в цитозоле? С одной стороны, может происходить преимущественное превращение его в лактат, а с другой — связывание со специальным

цитозольным транспортером в митохондрию, который переносит его по механизму симпорта с протоном (энергетизированная, электрически заряженная внутренняя мембрана митохондрий способна дезэнергизироваться и разряжаться и все это опосредуется за счет работы протонной H⁺/АТФазы). По всей видимости, аффинитет к данному белку у пирувата достаточно высок, иначе бы определенный его пул устремлялся к соответствующим компартаментам клетки и мог снижать активность первой стадии полиольного пути, а именно ковалентное взаимодействие с активным структурным мотивом таких редуктаз, в частности с аминокислотой тирозином, ибо монокарбоновые кислоты способны принимать участие в реакциях, протекающих по механизму Фриделя–Крафтса, а в данном случае в виде перегруппировки по Фрису, наиболее характерной для фенолов. К этой группе соединений можно смело отнести и фенольный радикал аминокислоты тирозина. Согласно имеющимся научным данным для такой реакции в некоторых случаях не нужен катализатор особенно в случае образования конечного ароматического кетона с меньшей энергией активации молекулы, что стабилизирует продукт реакции и делает его менее активным в отличие от исходных реагентов за счет M- и I-эффекта карбонильной группы. Возможно, именно этот механизм лежит в основе частичного блока цитозольных альдо- и кеторедуктаз и сохраняет жизнеспособность хрусталика глаза в течение длительного времени при хронизации диабетической патологии. Данный вопрос требует более тщательного изучения и осмысления в условиях применения ЯМР-спектроскопии и кинетического изотопного эффекта, возможно, открывающего науке более тонкие механизмы реализации освещенного выше патохимического процесса.

Влияние NO на полиольный путь

Известно, что ингибиторы альдозоредуктазы (ARI) и ингибиторы сорбитолдегидрогеназы (SDI) вызывают изменения в содержании сорбита и фруктозы. Активность альдозоредуктазы снижается под действием оксида азота (NO). Поскольку супероксид уменьшает количество NO, активность альдозоредуктазы повышается при окислительном стрессе, а снижение реактивных форм кислорода ингибирует альдозоредуктазу. Индуцируемая сорбитом гиперосмолярность приводит к истощению органических осмолитов-антиоксидантов (например, таурина) [10].

Участие нитрат-иона как донора оксида азота

Данное соединение азота по своей химической природе относится к двухатомным нейтральным молекулам, но является свободнорадикальным бесцветным газом с периодом полураспада 2–30 с и средним временем жизни в биологических тканях 5–6 с. Молекула имеет неспаренный электрон на внешней π -орбитали, что и превращает его в высокоспиновый радикал. Нитрат-ион вполне может вступать в реакции с другими свободными радикалами и способен к образованию ковалентных связей. Именно данное свойство позволяет как активировать, так и блокировать (обрыв цепи) реакции, протекающие по механизму свободно-радикального замещения (S_R). Наряду с окислением гуанидиновой группы протеиногенной α -аминокислоты L-аргинина, поставляющей тканям организма данный вазоактивный метаболит, недавно

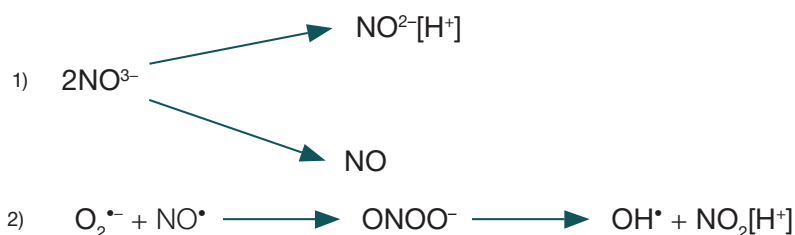


Рис. 1. Патохимические пути с участием кислородсодержащих соединений азота

было установлено и другой его источник. Так установлено, что NO генерируют в хрусталике не только изоформы (1–3) NO-синтазы (NOS), он может неферментативно образоваться в тканях из другого соединения — нитрата. В частности, возможна реакция прямого асимметрического деления или восстановления (по гетеролитическому механизму) самого нитрат-иона приводящего к образованию нитрит-иона и NO (рис. 1). Такой процесс, возможно, может идти преимущественно в условиях подкисления среды, т. е. в условиях ишемии, что не может не отразиться на функционировании хрусталика глаза. По нашему мнению, следует учитывать и то обстоятельство, что в этих же условиях происходит распад одного из таких сильнейших окислителей в органическом мире как пероксонитрит-ион (ONOO^-), генерирующий в условиях ацидоза бурый газ (в нативных условиях в виде нитрит-иона) и гидроксильный радикал ($\text{OH}^\cdot$). В таком случае идет увеличение как по первой реакции (гетеролиз нитрата), так и по второй реакции (распад пероксонитрита при закислении среды) пула интрацеллюлярного нитрит-иона, что, по всей видимости, сдвигает равновесие общего патохимического процесса в сторону реагентов (исходных веществ) и снижает общий уровень содержания NO, что особенно актуально для процесса накопления пероксонитрита в ходе реализации химических путей перекисного окисления липидов (LOP). Однако в ходе длительной эволюции на молекулярном уровне произошло вовлечение в процесс «спасения» хрусталика при таких реакциях необходимого уровня NO. Для выживания эпителиальной ткани хрусталика этот уровень достигается за счет образования S-нитрозоглутатиона. Именно он является эндогенным долгоживущим донором такой активной малой молекулы, как NO. Это особенно значимо в условиях ишемии с последующей реперфузией, при которых нарушаются функции эндотелия приносящих сосудов капсулы хрусталика и усиливается выброс свободных радикалов и, как следствие, идет ограничение биосинтеза NO.

Влияние витаминов B6 и PQQ

Ингибиторы альдозоредуктазы были широко изучены с использованием множества различных химически не связанных соединений.

Пиридоксамин первоначально был описан как ингибитор образования конечных продуктов гликации (AGE) после реакции Амадори, но он ингибирует также образование конечных продуктов продвинутого липоокисления (ALE) на белке в ходе LOP. Введение в течение 28 недель 1 г на 1 л питьевой воды снижало регрессию диабетических капилляров у крыс с диабетом на 71%. На сегодняшний день неясно, ингибирует это лечение потерю перитицтов, в том числе в приносящих артериолах капсулы хрусталика, или нет?

Витамин PQQ (старое название — B₁₄), являясь мощным цитопротектором, как антиоксидант более активен

в качестве восстановителя, чем витамин С; в качестве окислителя-восстановителя активнее, чем производные витамина B₂; в качестве соединения с карбонильной активностью активнее, чем витамин B₆ — в связи с тем, что является коферментом глюкозодегидрогеназы (первого ключевого фермента семейства кристаллинов хрусталика глаза), фактически представляющей собой также одну из кристаллиновых фракций белков. Нам представляется, что это не что иное как возникшая в ходе миллионов лет эволюции биоорганическая химическая редукция («упрощение») окислительного этапа пентозофосфатного пути на фоне функциональной специализации самого хрусталика. По аналогии с данным утверждением можно сделать умозаключение, что транскетолазу, в свою очередь, можно рассматривать как аналогичную редукцию неокислительного этапа пентозофосфатного пути, чего вполне достаточно для «выживаемости» ткани хрусталика при различных изменениях гомеостатических условий на фоне выраженной органной (тканевой) специализации.

Второй ключевой фермент семейства кристаллинов: транскетолаза как «редуцированный» пентозофосфатный путь хрусталика глаза

У млекопитающих транскетолазы соединяет пентозофосфатный путь с гликолизом, направляя избыток сахарофосфатов в основные пути метаболизма углеводов. Ее присутствие необходимо для выработки NADPH, особенно в тканях, активно участвующих в биосинтезе, в том числе хрусталика. Коферментная форма витамина B₁, тиаминпирофосфат (TPP) является важным кофактором наряду с кальцием и работает в комплексе с ним (данный комплекс как электронодефицитная система аналогична комплексу АТФ/Mg²⁺). Вход в активный сайт этого фермента состоит из нескольких боковых цепей аргинина, гистидина, серина и аспартата. Хотя фермент способен связывать разные типы субстратов, он обладает высокой специфичностью к стереоконфигурации гидроксильных групп сахаров. Эти гидроксильные группы в положении углеродной цепи C-3 и C-4 донора кетозы должны находиться в конфигурации D-трео, чтобы правильно соответствовать положениям C-1 и C-2 на акцепторе альдозы. His263 используется в качестве донора протонов для комплекса субстрат-акцептор-TPP, который затем может генерировать эритрозо-4-фосфат. Боковые цепи гистидина и аспартата используются для эффективной стабилизации субстрата и участвуют в его депротонировании. Фосфатная группа субстрата тоже играет важную роль в стабилизации субстрата при его попадании в активный центр, а также ионная природа связи у солевого мостика от Arg359 к ней. Катализ инициируется депротонированием B1 в тиазолиевом кольце. Затем карбанион связывается с карбонилом донорного субстрата, разрывая таким образом связь между C-2 и C-3. Этот кето-фрагмент остается ковалентно связанным с углеродом C-2 TPP. Затем высвобождается

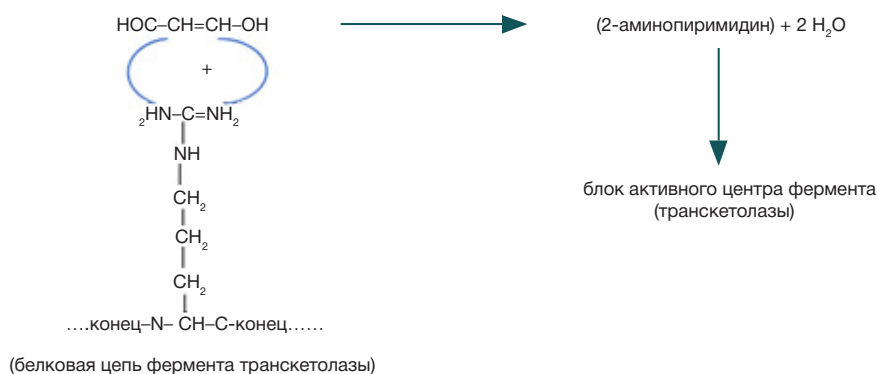


Рис. 2. Один из возможных механизмов блока активного центра транскетолазы с участием енольной формы малондальдегида

донорный субстрат. Акцепторный субстрат поступает в активный сайт, где фрагмент, связанный с промежуточным α - β -дигидроксиэтил-TPP, переносится к акцептору [11, 12].

Ингибирование транскетолаз конечными продуктами AGE и LOP

Гликирование белков (гликация) — процесс, известный как реакция Майяра. В ходе реакции Майяра происходит также образование промежуточных соединений, таких как глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозон, которые могут образовываться как в результате аутоокисления моносахаридов (например, глюкозы в реакции Вольфа), так и в результате перегруппировки основания Шиффа (реакция Намики) или соединения Амадори (реакция Ходжа — им еще в 1953 г. был установлен факт взаимодействия глюкозы с глицином, дающий не менее 24 соединений). Поскольку гликируются свободные аминокислоты, потенциально любой белок может быть подвержен этому процессу, что особенно актуально для белковых фракций хрусталика преимущественно основной природы. AGE, как свободные, так и связанные с белками, обнаруживаются в плазме приносящих кровеносных сосудов в том числе хрусталика глаза. Описано не менее 20 различных AGE, из них *N*-карбоксиметиллизин, пентозидин и гидроимидазолон являются относительно инертными и могут выступать в качестве биомаркеров содержания AGE в тканях. Реакция Майяра протекает в несколько этапов. Первоначально глюкоза (или другие редуцирующие углеводы, такие как фруктоза, пентоза, галактоза, манноза, ксилулоза) реагирует со свободной аминокислотой аминокислот с образованием нестабильного соединения — основания Шиффа. Основание Шиффа (альдимин) претерпевает спонтанные перестройки с образованием относительно стабильного кетоамина (1-амино-1-дезоксид-2-кетоза) — соединения Амадори [13–15]. Дальнейшая деградация этих ранних продуктов гликирования приводит к гетерогенной группе необратимых соединений — AGE. На рис. 2 представлен один из возможных, по нашему мнению, механизмов патохимического блока транскетолазы с выключением самого фермента. Малоновый диальдегид как биомаркер окислительного стресса эпителиальной клетки хрусталика

глаза плюс аргинин (2-амино-5-гуанидинпентановая кислота) в транскетолазе — это реакция конденсации и одновременно межмолекулярной циклизации с образованием 2-аминопиридина. Реакция протекает по механизму бимолекулярного нуклеофильного присоединения. При этом благодаря наличию в енольной форме малонового диальдегида как карбонильной группы, так и сопряженной с ней кратной связи, он превращается в мощный нуклеофил, атакующий по первой стадии электрофильный центр аргинина в виде иминного азота $=NH_2^+$ с образованием производных пиридина (по аналогии с халконами, применяемыми при искусственном синтезе противоопухолевых средств на основе аминопиридинового каркаса в процессах исследования молекулярного докинга при получении новых лекарственных форм).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы постарались разобраться, какие химические вещества и как взаимодействуют друг с другом в процессе основного метаболизма и патохимии хрусталика. Одной из наиболее распространенных причин снижения зрения является катаракта — частичное или полное помутнение вещества и/или капсулы хрусталика, поэтому мы затронули тему катаракта и фундаментальных химических причин их возникновения на фоне одной из наиболее важных медико-социальных проблем — сахарного диабета. Патогенез диабетической патологии хрусталика очень сложен и многофакторен. Большой вклад в его прогрессирование вносят AGE, которые реализуют свой потенциал с помощью влияния на структуру белков и активации оси AGE–RAGE, что влечет за собой целый ряд патологических изменений. Ввиду многочисленных негативных воздействий AGE необходим поиск новых химико-фармацевтических технологических стратегий и в первую очередь таргетных, направленных на снижение уровня AGE. Прерывание каскада запускаемых взаимодействием AGE–RAGE патохимических событий также может являться перспективным и оправданным направлением для разработки новых подходов к профилактике и лечению диабетических осложнений таких высокоспециализированных функциональных структур глаза, как его хрусталик.

Литература

1. Соустов Л. В., Челноков Е. В., Киселев А. Л. и др. Исследование молекулярных механизмов УФ-индуцированной кристаллинов хрусталика глаза и возможностей поддержания его прозрачности. Альманах клинической медицины. 2006; 12: 34–35.
2. Кривандин А. В., Муругова Т. Н., Кукин А. И. и др. Исследование структуры β -кристаллина методом малоуглового рассеяния нейтронов с вариацией контраста. Биохимия. 2010; 75 (11): 1499–507.
3. Муранов К. О., Островский М. А. Молекулярная физиология и патология хрусталика глаза. М.: Торус Пресс, 2013; 295 с.
4. Муранов К. О., Островский М. А. Биохимия хрусталика глаза: норма и катарактогенез (обзор). Биохимия. 2022; 87 (2): 177–193.
5. Муранов К. О., Полянский Н. Б., Клейменов С. Ю., Островский М. А. Способность шапероноподобного белка α -кристаллина предотвращать агрегацию, но не рефолдинг β -кристаллина, поврежденного УФ. Химическая физика. 2019; 38 (12): 33–37.
6. Мальцев Э. В., Павлюченко К. П. и др. Биологические особенности и заболевания хрусталика. Одесса: Астропринт, 2002; 448 с.
7. Королева И. А., Егоров А. Е. Метаболизм хрусталика: особенности и пути коррекции. Клиническая офтальмология. 2015; 15 (4): 191–5.
8. Селиванова О. М., Глякина А. В., Суворина М. Ю. и др. Структурно-функциональные особенности α -кристаллина. Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018; 3 (3): 673–9.
9. Кривандин А. В., Муранов К. О., Яковлев Ф. Ю. и др. Устойчивость четвертичной структуры α -кристаллина к УФ-облучению. Биохимия. 2009; 74 (6): 779–90.
10. Chihara Nishimura, Yoshiharu Matsuura, Yasuo Kokai, T. Geoffrey Flynn, Tai Akera. P-530 — Cloning and expression of human aldose reductase. Japanese Journal of Pharmacology. 1990; 52 (1): 366.
11. Доступно по ссылке (ссылка активна на 26.02.2024): <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/transketolase>.
12. Доступно по ссылке (ссылка активна на 26.02.2024): <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/protein-glycation>.
13. Кудрявцева Ю. В., Чупров А. Д., Иванова И. П. Оценка уровня окислительных процессов липидов и белков в хрусталике глаза в зависимости от возраста. Кубанский научный медицинский вестник. 2011; 124 (1): 179–82.
14. Синицын С. А. Белки хрусталика глаза: устойчивость к агрегации, индуцированной УФ-излучением. В сборнике: физические методы в естественных науках: материалы 56-й Международной научной конференции студентов и молодых ученых; 22–27 апреля 2018 г.; Новосибирск.
15. Синицын С. А., Шерин П. С. УФ-индуцированные модификации белков хрусталика глаза. В сборнике: VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов; 22–25 октября 2019 г.; Кольцово.

References

1. Soustov LV, Chelnokov EV, Kiselev AL, i dr. Issledovanie molekulyarnykh mehanizmov UF-inducirovannoy kristallinov hrustalika glaza i vozmozhnostey podderzhanija ego prozrachnosti. Al'manah klinicheskoy mediciny. 2006; 12: 34–35. Russian.
2. Krivandin AV, Murugova TN, Kuklin AI, i dr. Issledovanie struktury β -kristallina metodom malouglovogo rassejanija nejtronov s variaciej kontrasta. Biohimija. 2010; 75 (11): 1499–507. Russian.
3. Muranov KO, Ostrovskij MA. Molekuljarnaja fiziologija i patologija hrustalika glaza. M.: Torus Press, 2013; 295 s. Russian.
4. Muranov KO, Ostrovskij MA. Biohimija hrustalika glaza: norma i kataraktogenez (obzor). Biohimija. 2022; 87 (2): 177–193. Russian.
5. Muranov KO, Poljanskij NB, Klejmenov SJu, Ostrovskij MA. Sposobnost' shaperonopodobnogo belka α -kristallina predotvrashhat' agregaciju, no ne refolding β -kristallina, povrezhdennogo UF. Himicheskaja fizika. 2019; 38 (12): 33–37. Russian.
6. Malcev JeV, Pavljuchenko KP i dr. Biologicheskie osobennosti i zabolevanija hrustalika. Odessa: Astroprint, 2002; 448 s.
7. Koroleva IA, Egorov AE. Metabolizm hrustalika: osobennosti i puti korrekcii. Klinicheskaja oftal'mologija. 2015; 15 (4): 191–5. Russian.
8. Selivanova OM, Glijakina AV, Suvorina MJu, i dr. Strukturno-funkcional'nye osobennosti α -kristallina. Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii. 2018, 3 (3): 673–9. Russian.
9. Krivandin AV, Muranov KO, Jakovlev FJu i dr. Ustojchivost' chetvertichnoj struktury α -kristallina k UF-oblucheniju. Biohimija. 2009; 74 (6): 779–90. Russian.
10. Chihara Nishimura, Yoshiharu Matsuura, Yasuo Kokai, T. Geoffrey Flynn, Tai Akera. P-530 — Cloning and expression of human aldose reductase. Japanese Journal of Pharmacology. 1990; 52 (1): 366.
11. Dostupno po ssylke (ssylka aktivna na 26.02.2024): <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/transketolase>.
12. Dostupno po ssylke (ssylka aktivna na 26.02.2024): <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/protein-glycation>.
13. Kudrjavceva JuV, Chuprov AD. Ivanova IP. Ocenka urovnja oksiditel'nyh processov lipidov i belkov v hrustalike glaza v zavisimosti ot vozrasta. Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik. 2011; 124 (1): 179–82. Russian.
14. Sinicyn S. A. Belki hrustalika glaza: ustojchivost' k agregacii, inducirovannoj UF-izlucheniem. V sbornike: fizicheskie metody v estestvennyh naukah: materialy 56-j Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii studentov i molodyh uchenyh; 22–27 aprelja 2018 g.; Novosibirsk. Russian.
15. Sinicyn SA, Sherin PS. UF-inducirovannye modifikacii belkov hrustalika glaza. V sbornike: VI Mezhdunarodnaja konferencija molodyh uchenyh: biofizikov, biotehnologov, molekulyarnykh biologov; 22–25 oktjabrja 2019 g.; Kol'covo. Russian.

ТИАМИН-ЗАВИСИМАЯ МЕГАЛОБЛАСТНАЯ АНЕМИЯ (СИНДРОМ РОДЖЕРСА) У РЕБЕНКА ТРЕХ ЛЕТ

Т. В. Конюхова ✉, Е. В. Трухина

Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Тиамин-зависимая мегалобластная анемия (ТЗМА), или синдром Роджерса, — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся развитием мегалобластной анемии, сахарным диабетом и прогрессирующей нейросенсорной тугоухостью. У части пациентов выявляют офтальмологические нарушения (пигментную ретинопатию, атрофию зрительного нерва, макулопатию, нистагм), поражение сердца (пароксизмальную мерцательную аритмию, наджелудочковую тахикардию, врожденные пороки сердца, нарушения внутрисердечной проводимости) и неврологические нарушения (эпилепсию, нарушение мозгового кровообращения). ТЗМА развивается вследствие мутации в гене *SLC19A2*, кодирующем белок-переносчик тиамина ThTr-1, который экспрессируется в гемопоэтических стволовых клетках, бета-клетках поджелудочной железы и клетках внутреннего уха. В статье представлен клинический случай ТЗМА у ребенка трех лет, с дебютом заболевания на первом году жизни в виде анемии и сахарного диабета. На фоне проводимой терапии тиамином у пациента достигнута выраженная положительная динамика в виде нормализации показателей периферического анализа крови. Описание собственного клинического наблюдения, а также представление обзора литературы направлено на повышение осведомленности врачей всех специальностей о данном синдроме. Атипичная клиническая картина и отсутствие знаний о ТЗМА часто являются причиной задержки постановки диагноза и начала терапии.

Ключевые слова: тиамин-зависимая мегалобластная анемия, синдром Роджерса, костный мозг, кольцевые сидеробласты, сахарный диабет, нейросенсорная глухота, ген *SLC19A2*

Вклад авторов: Е. В. Трухина — сбор данных, подготовка списка литературы; Т. В. Конюхова — разработка дизайна статьи, написание текста рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Владимировна Конюхова
ул. Саморы Машела, д. 1, г. Москва, 117997, tkonuhova@mail.ru

Статья получена: 16.05.2024 **Статья принята к печати:** 02.06.2024 **Опубликована онлайн:** 24.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.024

THIAMINE RESPONSIVE MEGALOBlastic ANEMIA (ROGERS SYNDROME) IN A THREE-YEAR-OLD CHILD

Konyukhova TV ✉, Trukhina EV

Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Thiamine responsive megaloblastic anemia (TRMA), or Rogers syndrome, is a rare autosomal recessive disease characterized by the development of megaloblastic anemia, diabetes mellitus, and progressive sensorineural hearing loss. In some cases, the syndrome causes ophthalmological disorders (retinitis pigmentosa, optic nerve atrophy, maculopathy, nystagmus), heart diseases (paroxysmal atrial fibrillation, supraventricular tachycardia, congenital heart defects, intracardiac conduction disorders) and neurological disorders (epilepsy, cerebrovascular accidents). TRMA develops due to a mutation in the *SLC19A2* gene, which encodes ThTr-1 (thiamine transporter protein) expressed in hematopoietic stem cells, pancreatic beta cells, and inner ear cells. The article presents a clinical case of TRMA in a three-year-old child, with the onset in the first year of life, manifesting as anemia and diabetes mellitus. Thiamine therapy ensured a pronounced positive dynamics: the patient's peripheral blood parameters normalized. The clinical description and the literature review herein aim to raise awareness of doctors of all specialties about this syndrome. An atypical clinical picture and lack of knowledge about TRMA often delay the diagnosis and start of therapy.

Keywords: thiamine-responsive megaloblastic anemia, Rogers syndrome, bone marrow, ring sideroblasts, diabetes, sensorineural deafness, gene *SLC19A2*

Author contribution: Trukhina EV — data collection, compilation of the list of references; Konyukhova TV — development of the article's design, manuscript authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Ethics Committee of Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatyana V. Konyukhova
Samory Mashela, 1, Moscow, 117997, tkonuhova@mail.ru

Received: 16.05.2024 **Accepted:** 02.06.2024 **Published online:** 24.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.024

Тиамин-зависимая мегалобластная анемия (ТЗМА, OMIM 249270), или синдром Роджерса, является крайне редким аутосомно-рецессивным заболеванием с характерной клинической триадой: мегалобластной анемией, прогрессирующей нейросенсорной тугоухостью и сахарным диабетом. У некоторых пациентов диагностируют врожденные пороки сердца, атрофию зрительных нервов, отмечают возникновение нарушений мозгового кровообращения [1–3]. Из гематологических проявлений отмечается наличие кольцевых сидеробластов в костном мозге, лейкопения и тромбоцитопения отсутствуют либо умеренно выражены, редко обнаруживают панцитопению [4, 5]. ТЗМА развивается в результате изменений гена *SLC19A2*, кодирующего белок-переносчик

тиамина (thiamine transporter 1, ThTr-1). Ген *SLC19A2* экспрессируется, главным образом, в гемопоэтических стволовых клетках, бета-клетках поджелудочной железы и клетках внутреннего уха [6]. В других органах тиамин транспортируется в клетки с помощью белка-переносчика ThTr-2, который остается функционально активным [7].

Распространенность ТЗМА достоверно не известна. Описано 183 пациента из 138 семей. Большинство случаев заболевания (62%) зарегистрировано в семьях с близкородственным браком: в странах Ближнего Востока (37,7%), Южной Азии (21,9%) и Средиземноморья (17%) с дебютом в период младенчества и подросткового возраста [8]. Впервые заболевание описали Л. Е. Rogers и соавторы в 1969 г. у 11-летней девочки с двухсторонней

Таблица 1. Результаты исследования гемограммы наблюдаемого пациента

Показатели	08.02.2024	Ед. измерения	Норма
Лейкоциты	9,12	10 ⁹ /л	6,05–9,85
Эритроциты	2,55	10 ¹² /л	4,2–4,6
Гемоглобин	74	г/л	115–138
Гематокрит	20,8	%	31–40
Средний объем эритроцита	81,6	фл	75–100
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	29	пг	25–33
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците	356	г/л	322–368
Относительная ширина распределения эритроцитов по объему	15,4	%	11–16
Тромбоциты	103	10 ⁹ /л	204–356

нейросенсорной тугоухостью, сахарным диабетом и рецидивирующей мегалобластной анемией. Было предположено, что причиной анемии является нарушение метаболизма витамина В1, что подтвердилось коррекцией анемии после перорального приема тиамина [9].

Описание клинического случая

Мальчик трех лет, рожден от первой беременности, первых самостоятельных родов на сроке 38–39 недель, вес при рождении — 3280 г, рост — 51 см. Оценка по шкале Апгар 7/8 баллов. Этническая принадлежность — ингуш. Родители ребенка не состоят в близкородственном браке. Анамнез заболевания: в возрасте 10 месяцев впервые были отмечены изменения в общем анализе крови (ОАК) — снижение гемоглобина до 85 г/л, в течение двух месяцев получал препараты железа (без эффекта). В дальнейшем нуждался в периодических заместительных трансфузиях эритроцитарной массы. В возрасте одного года установлен диагноз «Сахарный диабет» (гипергликемия — до 31 ммоль/л, гликированный гемоглобин — 9,1%). Назначена инсулинотерапия в базис-болюсном режиме (аспарт и деглудек). Родители обратили внимание на отсутствие слуха и речи у ребенка в возрасте двух лет. После обследования подтверждена двусторонняя нейросенсорная тугоухость 4-й степени. В возрасте трех лет отмечены изменения в ОАК в виде анемии (гемоглобин — 62 г/л) и тромбоцитопении (тромбоциты — 18 тыс./мкл). Сочетание клинических проявлений (сахарный диабет, нейросенсорная тугоухость, анемия, тромбоцитопения) с наибольшей вероятностью позволили предположить у ребенка наличие ТЗМА. Ребенка 08.02.2024 госпитализируют в НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачева для уточнения диагноза и определения дальнейшей тактики терапии.

При поступлении состояние тяжелое по заболеванию, стабильное, ребенка не лихорадит. Физическое развитие соответствует возрасту. Кожные покровы бледные, единичные петехии на туловище. Отеков нет. Язык чистый, влажный. Костно-мышечная система без особенностей. Периферические лимфоузлы не увеличены. Сердечно-сосудистая система: тоны сердца ясные, тахикардия до 128–132 ударов в минуту. В легких дыхание пуэрильное, равномерно проводится по всем полям, хрипов нет. Живот мягкий, безболезненный, печень выступает на 2 см

из-под реберной дуги, селезенка не пальпируется. Диурез не учитывается. Стул ежедневный, без патологических примесей.

Основные лабораторные показатели при поступлении пациента в НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева представлены в табл. 1, 2. Отмечены признаки анемии, тромбоцитопении, а также повышение содержания лактата, гликозилированного гемоглобина (7,78%).

Пациенту выполнили костномозговую пункцию из двух анатомических точек (гребни подвздошных костей). Морфологическое исследование аспирата костного мозга (КМ) проводили при помощи светооптической микроскопии в окрашенных мазках по методу Паппенгейма–Крюкова. Дифференцировка клеток КМ и их процентное соотношение представлены в табл. 3.

Оба пунктата богаты миелокариоцитами, полиморфны и схожи между собой по составу, включают небольшое количество нейтрального жира, скопления стромальных элементов.

Содержание бластных клеток составляет 0,8% и 0,4% по точкам соответственно.

Нейтрофильный росток сохранен, с чертами диспоза в части клеток (гипогранулярность, кольцевые п/я нейтрофилы). Моноцитарный росток сохранен, без существенных морфологических особенностей. Лимфоидный росток сужен. Эритроидный росток расширен, с чертами диспоза (двуядерность, тельца Жолли, кариорексис). Эритропоэз с чертами мегалобластности в большинстве клеток (рис. 1). Гемоглобинизация задержана на базофильных формах. Мегакариоцитарный росток расширен, представлен мегакариоцитами на разных стадиях созревания. Часть мегакариоцитов с отшнуровкой тромбоцитов. При окраске на сидеробласты (реакция Перлса) позитивная реакция выявляется в 50% эритрокариоцитов, по характеру распределения позитивного материала 45% эритрокариоцитов отнесены к кольцевым сидеробластам (рис. 2); в 5% — позитивный материал расположен в виде немногочисленных рассеянных гранул, в 50% эритрокариоцитов реакция негативна.

Проведенные инструментальные исследования

Электрокардиография (ЭКГ). Нормальное положение ЭОС. Ускоренный правопредсердный ритм, на этом

Таблица 2. Результаты исследования биохимического анализа крови наблюдаемого пациента

Показатели	08.02.24	Ед. измерения	Норма
Глюкоза	4,11	ммоль/л	2,6–24,9
Лактат	2,1	ммоль/л	0,5–1,6
Железо	13,2	мкмоль/л	9–21,5

Таблица 3. Результат исследования аспирата КМ наблюдаемого пациента

Клеточные элементы	Норма, %	Точка 1, %	Точка 2, %
Недифференцированные бластные клетки	1,6–3,4	0,8	0,4
Миелобласты	1,6–3,0	1,2	0,8
Промиелоциты	2,3–4,0	4	3,6
Миелоциты	7,2–11,3	13,6	24
Метамиелоциты	5,5–8,5	8	7,2
Палочкоядерные нейтрофилы	14,8–22,4	18	9,2
Сегментоядерные нейтрофилы	9,8–20,5	18,4	20,8
Сумма нейтрофилов	40,0–66,7	62	64,8
Эозинофильные миелоциты		–	–
Эозинофильные метамиелоциты		–	–
Эозинофилы палочкоядерные		–	–
Эозинофилы сегментоядерные		2,4	2,4
Сумма эозинофилов	3,3–6,4	2,4	2,4
Базофилы	0–0,2	0,8	0,4
Промоноциты		–	–
Моноциты	0,03–3,0	3,2	2,8
Сумма моноцитов		3,2	2,8
Лимфоциты	12,1–17,9	2,4	2,4
Плазматические клетки	0,03–0,3	–	–
Эритробласты	1,0–1,9	3,2	1,6
Нормобласты базофильные	1,3–2,4	8,8	8
Нормобласты полихроматофильные	8,2–10,8	13,2	12,4
Нормобласты оксифильные	5,9–8,8	2	4
Сумма эритрокариоцитов	16,4–23,9	27,2	26
Индекс созревания нейтрофилов	0,5–0,9	0,7	1,16
Индекс гемоглобинизации	0,8–0,9	0,56	0,63
Лейко-эритробластическое соотношение	3,3–4,5	2,6	2,8

фоне зарегистрирована частая суправентрикулярная экстрасистолия (единичные и парные преждевременные сокращения), средняя частота сердечных сокращений (ЧСС) составляет 149 уд./мин. Полная блокада правой ножки пучка Гиса.

Эхокардиография (Эхо-КГ). Исследование проведено на фоне тахикардии. Оба предсердия увеличены до резкой степени. Левый желудочек увеличен незначительно, глобальная систолическая функция находится на нижней границе нормы, может быть незначительно сниженной.

Системный сердечный выброс сохранен на уровне выше средних значений. Правый желудочек увеличен умеренно, глобальная систолическая функция снижена. Вторичная (возможно, за счет нарушения локальной кинетики миокарда левого желудочка) недостаточность митрального клапана легкой степени.

Холтеровское мониторирование ЭКГ (ХМ-ЭКГ). В течение суток регистрировалась тахикардия, все средние значения ЧСС превышали возрастную норму. Циркадианный профиль ритма ригидный. Наджелудочковая тахикардия

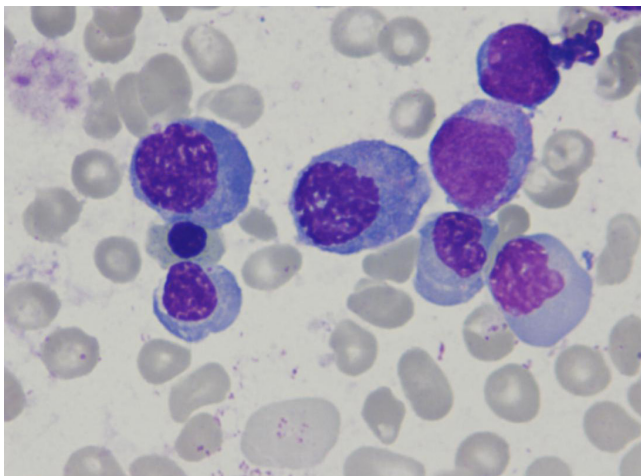


Рис. 1. Костный мозг: мегалобластический тип эритропоэза. Окраска по Паппенгейму–Крюкову. Увеличение: $\times 1000$

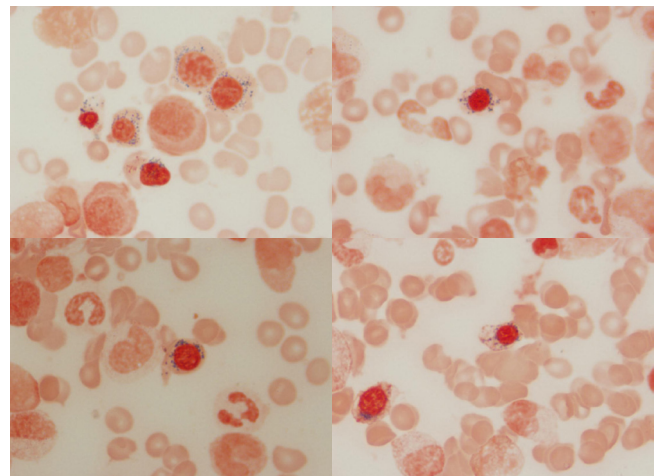


Рис. 2. Костный мозг: кольцевые сидеробласты. Окраска берлинской лазурью. Увеличение: $\times 1000$

Таблица 4. Результаты исследования гемограммы наблюдаемого пациента

Показатели	29.02.24	Единицы измерения	Норма
Лейкоциты	10,26	$10^9/\text{л}$	6,05–9,85
Эритроциты	3,88	$10^{12}/\text{л}$	4,2–4,6
Гемоглобин	112	г/л	115–138
Гематокрит	33,2	%	31–40
Средний объем эритроцита	85,6	фл	75–100
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	28,9	пг	25–33
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците	337	г/л	322–368
Относительная ширина распределения эритроцитов по объему	14,9	%	11–16
Тромбоциты	343	$10^9/\text{л}$	204–356

возвратного типа. Частая политопная желудочковая экстрасистолия. Частая предсердная экстрасистолия.

Заключение кардиолога. Фибрилляция предсердий, суправентрикулярная экстрасистолия. Дилатационная кардиомиопатия (первичная? аритмогенная дисфункция миокарда?) с незначительным снижением сократительной способности миокарда левого желудочка. Недостаточность митрального клапана 2-й ст., трикуспидальной — 1-й ст. Сердечная недостаточность 1-й ст. Рекомендована антиаритмическая терапия: амиодарон (200 мг) — 100 мг внутрь утром и 50 мг внутрь вечером, торасемид (5 мг) по — таблетке 2 раза/сутки внутрь, калия и магния аспарагинат по 1 таблетке 2 раза/сутки внутрь, пропранолол по 5 мг 3 раза/сутки после еды внутрь.

Заключение офтальмолога. OU-гиперметропия/миопический астигматизм средней степени. Частичная атрофия зрительных нервов.

Совокупность клинических и лабораторных данных: мегалобластная анемия в сочетании с тромбоцитопенией, наличие кольцевых сидеробластов в КМ; эндокринные нарушения (сахарный диабет); нейросенсорная тугоухость; нарушение сердечного ритма может соответствовать ТЗМА. С целью подтверждения диагноза рекомендовано проведение полного экзомного секвенирования. Иницирована специфическая терапия тиамин: 150 мг/м²/сут (100 мг/сут) в/в (с 09.02 по 29.02). Далее с 01.03 тиамин 150 мг/м²/сут (100 мг/сут) внутрь.

По результатам исследования в гене SLC19A2 обнаружена замена нуклеотида с.1223+1G > A в гомозиготном состоянии. На основании полученных результатов установлен клинический диагноз «Тиамин-зависимая мегалобластная анемия».

На фоне проводимой терапии тиамин достигнута выраженная положительная динамика — показатели периферической крови нормализовались и сохраняются стабильными (табл. 4).

Обсуждение клинического случая

В статье приводится редкий случай ТЗМА у пациента трех лет, проявившейся на первом году жизни анемией, сахарным диабетом, нейросенсорной тугоухостью. Учитывая данный симптомокомплекс, в качестве одной из диагностических версий можно рассматривать ТЗМА. По литературным данным у описанных ранее пациентов с ТЗМА анемия была выявлена в 95,4% случаев, сахарный диабет

в 92,7%, потеря слуха — в 92,7%. У 70,8% пациентов была диагностирована мегалобластная анемия [8]. Дальнейший диагностический поиск позволил выявить у пациента наличие мегалобластной, сидеробластной анемии в КМ, а также нарушение зрения и нарушение сердечного ритма. Таким образом, при наличии у ребенка классической триады ТЗМА (мегалобластная анемия, сахарный диабет и нейросенсорная тугоухость) и эффективности проводимой терапии тиамин, клинический диагноз не вызывает сомнений.

Редкость ТЗМА и, как следствие, отсутствие клинической настороженности затрудняют раннюю постановку диагноза. В нашем случае клинический диагноз был установлен ребенку только на третьем году жизни.

В настоящее время единственным способом лечения ТЗМА является пожизненная терапия тиамин, которая приводит к нивелированию симптомов анемии у 97,1% пациентов и к снижению дозы или прекращению введения инсулина у 69,9% пациентов [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТЗМА является крайне редким аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующимся рядом патологических состояний, таких как мегалобластная анемия, сахарный диабет, потеря слуха и зрения. Разнообразие клинических проявлений требует мультидисциплинарного подхода к лечению и наблюдению пациентов с ТЗМА. Несмотря на то что данное заболевание хорошо изучено, в настоящее время единственным доступным вариантом лечения остается пероральный прием высоких доз тиамина для коррекции анемии. Лечение тиамин снижает потребность в инсулине и может задержать начало развития сахарного диабета, а также предотвратить потерю зрения. Потеря слуха при ТЗМА необратима и не может быть предотвращена лечением тиамин. В настоящее время генетическое консультирование является наиболее эффективной стратегией предотвращения возникновения заболевания. Родственникам пациента с ТЗМА необходимо проводить молекулярно-генетическое исследование вместе с потенциальными партнерами, чтобы определить риск рождения больного ребенка. Кроме того, необходим пренатальный скрининг беременным женщинам, у которых имеется высокий риск рождения ребенка с ТЗМА, так как введение тиамина во время беременности может минимизировать или отсрочить появление симптомов ТЗМА.

Литература

1. Sako S, Tsunogai T, Oishi K. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. 2003 Oct 24 [updated 2022 Jul 28]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301459.
2. Meire FM, Van Genderen MM, Lemmens K, Ens-Dokkum MH. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome (TRMA) with cone-rod dystrophy. *Ophthalmic Genet.* 2000; 21 (4): 243–50. PMID: 11135496.
3. Di Candia F, Di Iorio V, Tinto N, Bonfanti R, Iovino C, Rosanio FM, et al. An Italian case series' description of thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome: importance of early diagnosis and treatment. *Ital J Pediatr.* 2023; 49 (1): 158. DOI: 10.1186/s13052-023-01553-1. PMID: 38037112; PMCID: PMC10691017.
4. Bay A, Keskin M, Hizli S, Uygun H, Dai A, Gumruk F. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Int J Hematol.* 2010; 92 (3): 524–6. DOI: 10.1007/s12185-010-0681-y. Epub 2010 Sep 11. PMID: 20835854.
5. Abboud MR, Alexander D, Najjar SS. Diabetes mellitus, thiamine-dependent megaloblastic anemia, and sensorineural deafness associated with deficient alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity. *J Pediatr.* 1985; 107 (4): 537–41. DOI: 10.1016/s0022-3476(85)80011-1. PMID: 4045602.
6. Subramanian VS, Subramanya SB, Said HM. Relative contribution of THTR-1 and THTR-2 in thiamin uptake by pancreatic acinar cells: studies utilizing Slc19a2 and Slc19a3 knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302 (5): G572–8. DOI: 10.1152/ajpgi.00484.2011. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22194418; PMCID: PMC3311432.
7. Lua H, Lub H, Vauchera J, Tra C, Vollenweider P, Castioni J. L'anémie mégalo-blastique thiamine dépendante ou syndrome de Rogers: une revue de la littérature. Thiamine-responsive megaloblastic anemia or Rogers syndrome: A literature review. *La Revue de Médecine Interne.* 2019; 40 (1): 20–27.
8. Zhang S, Qiao Y, Wang Z, Zhuang J, Sun Y, Shang X, et al. Identification of novel compound heterozygous variants in SLC19A2 and the genotype-phenotype associations in thiamine-responsive megaloblastic anemia. *Clin Chim Acta.* 2021; 516: 157–68. DOI: 10.1016/j.cca.2021.01.025. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33571483.
9. Viana MB, Carvalho RI. Thiamine-responsive megaloblastic anemia, sensorineural deafness, and diabetes mellitus: A new syndrome? *J Pediatr.* 1978; 93 (2): 235–8. DOI: 10.1016/s0022-3476(78)80503-4. PMID: 671156.
10. Faraji-Goodarzi M, Tarhani F, Taei N. Dyserythropoiesis and myelodysplasia in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Clin Case Rep.* 2020; 8 (6): 991–4. DOI: 10.1002/ccr3.2791. PMID: 32577249; PMCID: PMC7303871.

References

1. Sako S, Tsunogai T, Oishi K. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. 2003 Oct 24 [updated 2022 Jul 28]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301459.
2. Meire FM, Van Genderen MM, Lemmens K, Ens-Dokkum MH. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome (TRMA) with cone-rod dystrophy. *Ophthalmic Genet.* 2000; 21 (4): 243–50. PMID: 11135496.
3. Di Candia F, Di Iorio V, Tinto N, Bonfanti R, Iovino C, Rosanio FM, et al. An Italian case series' description of thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome: importance of early diagnosis and treatment. *Ital J Pediatr.* 2023; 49 (1): 158. DOI: 10.1186/s13052-023-01553-1. PMID: 38037112; PMCID: PMC10691017.
4. Bay A, Keskin M, Hizli S, Uygun H, Dai A, Gumruk F. Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Int J Hematol.* 2010; 92 (3): 524–6. DOI: 10.1007/s12185-010-0681-y. Epub 2010 Sep 11. PMID: 20835854.
5. Abboud MR, Alexander D, Najjar SS. Diabetes mellitus, thiamine-dependent megaloblastic anemia, and sensorineural deafness associated with deficient alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity. *J Pediatr.* 1985; 107 (4): 537–41. DOI: 10.1016/s0022-3476(85)80011-1. PMID: 4045602.
6. Subramanian VS, Subramanya SB, Said HM. Relative contribution of THTR-1 and THTR-2 in thiamin uptake by pancreatic acinar cells: studies utilizing Slc19a2 and Slc19a3 knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302 (5): G572–8. DOI: 10.1152/ajpgi.00484.2011. Epub 2011 Dec 22. PMID: 22194418; PMCID: PMC3311432.
7. Lua H, Lub H, Vauchera J, Tra C, Vollenweider P, Castioni J. L'anémie mégalo-blastique thiamine dépendante ou syndrome de Rogers: une revue de la littérature. Thiamine-responsive megaloblastic anemia or Rogers syndrome: A literature review. *La Revue de Médecine Interne.* 2019; 40 (1): 20–27.
8. Zhang S, Qiao Y, Wang Z, Zhuang J, Sun Y, Shang X, et al. Identification of novel compound heterozygous variants in SLC19A2 and the genotype-phenotype associations in thiamine-responsive megaloblastic anemia. *Clin Chim Acta.* 2021; 516: 157–68. DOI: 10.1016/j.cca.2021.01.025. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33571483.
9. Viana MB, Carvalho RI. Thiamine-responsive megaloblastic anemia, sensorineural deafness, and diabetes mellitus: A new syndrome? *J Pediatr.* 1978; 93 (2): 235–8. DOI: 10.1016/s0022-3476(78)80503-4. PMID: 671156.
10. Faraji-Goodarzi M, Tarhani F, Taei N. Dyserythropoiesis and myelodysplasia in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Clin Case Rep.* 2020; 8 (6): 991–4. DOI: 10.1002/ccr3.2791. PMID: 32577249; PMCID: PMC7303871.