

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»  
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

# КРЫМСКИЙ ЖУРНАЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

CRIMEAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

2021, том 11, № 2

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

*А. В. Кубышкин* (главный редактор)  
*И. И. Фомочкина* (заместитель главного редактора)  
*М. А. Плотникова* (ответственный секретарь)  
*В. А. Белоглазов, К. А. Ефетов, А. М. Кацев*

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

*Л. ДуБаске* (Вашингтон, США), *Е. В. Евстафьева* (Симферополь, Россия),  
*В. П. Завьялов* (Турку, Финляндия), *И. Л. Кляритская* (Симферополь, Россия),  
*Я. Коки* (Люблин, Польша), *Ю. Л. Криворутченко* (Симферополь, Россия),  
*А. В. Матвеев* (Симферополь, Россия), *О. Матсуо* (Осакасама, Япония),  
*В. Ю. Михайличенко* (Симферополь, Россия), *С. Н. Орлов* (Монреаль, Канада),  
*А. В. Петров* (Симферополь, Россия), *А. Петросян* (Оаха, США),  
*М. Покорский* (Ополе, Польша), *О. А. Притуло* (Симферополь, Россия),  
*А. Г. Резников* (Киев, Украина), *И. Д. Сапегин* (Симферополь, Россия),  
*Г. М. Тарман* (Инсбрук, Австрия), *Т. Трояновский* (Люблин, Польша),  
*С. Э. Шибанов* (Симферополь, Россия), *Я. М. Шуба* (Киев, Украина),  
*А. Б. Хайтович* (Симферополь, Россия)

На первой странице обложки — репродукция картины Роберта Тома «Сушрута-врач-хирург Древней Индии»

АДРЕС РЕДАКЦИИ:  
295051, бульвар Ленина, 5/7, г. Симферополь, ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского»  
Медицинская академия имени С. И. Георгиевского  
E-mail: nauka\_3@ma.cfuv.ru

Журнал является правопреемником Трудов КГМУ, издающихся с 1935 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций Российской Федерации. Свидетельство ПИ № ФС77-61787 от 18 мая 2015 г.

Индекс издания ISSN: 2224-6444 (печатная версия), 2244-6452 (online)

С 07 декабря 2015 года журнал включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук».

В соответствии с распоряжением Минобрнауки России от 28 декабря 2018 года № 90-р, журнал считается включенным в Перечень ВАК по следующим научным специальностям и соответствующим им отраслям наук:

03.01.02 – Биофизика (медицинские науки); 03.01.03 – Молекулярная биология (биологические науки); 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки); 03.01.07 – Молекулярная генетика (биологические науки); 03.01.08 – Биоинженерия (биологические науки); 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика (медицинские науки); 03.03.01 – Физиология (медицинские науки); 03.03.02 – Антропология (медицинские науки); 03.03.03 – Иммунология (медицинские науки); 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (медицинские науки); 03.03.05 – Биология развития, эмбриология (медицинские науки); 03.03.06 – Нейробиология (медицинские науки); 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки); 14.03.02 – Патологическая анатомия (медицинские науки); 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки); 14.03.05 – Судебная медицина (медицинские науки); 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки); 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики (медицинские науки); 14.03.08 – Авиационная, космическая и морская медицина (медицинские науки); 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки); 14.03.10 – Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки); 14.03.11 – Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки).

Подписной индекс издания в каталоге Агентства «Роспечать» — 80124

Рекомендовано к печати ученым советом Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол № 6 от 27.05.2021)

**УЧРЕДИТЕЛЬ:**

ФГАОУ ВО «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»  
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## ORIGINAL ARTICLES

<b>Демяшкин Г. А., Корякин С. Н., Вадюхин М. А., Щекин В. И.</b> МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕННИКОВ В УСЛОВИИ КОРРЕКЦИИ ГИПОСПЕРМАТОГЕНЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ) .....	6
<b>Demyashkin G. A., Koryakin S. N., Vadyukhin M. A., Shchekin V. I.</b> MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TESTIS UNDER CONDITIONS OF CORRECTION OF HYPOSPERMATOGENESIS (EXPERIMENTAL RESEARCH) .....	6
<b>Додохова М. А., Котиева И. М., Сафроненко А. В., Алхусейн-Кулягинова М. С., Милаева Е. Р., Шпаковский Д. Б., Макаренко Ю. М., Терехов А. Ю., Сергеева Е. О.</b> ОЦЕНКА КАРДИОТОКСИЧЕСКИХ ПОБОЧНЫХ ЯВЛЕНИЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ДОКЛИНИЧЕСКОМ ЭТАПЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	11
<b>Dodokhova M. A., Kotieva I. M., Safronenko A. V., Alkhuseyn-Kulyaginova M. S., Milaeva E. R., Shpakovsky D. B., Makarenko Yu. M., Terekhov A. Yu., Sergeeva E. O.</b> ASSESSMENT OF CARDIOTOXIC SIDE EFFECTS IN THE ADMINISTRATION OF ORGANOTIN COMPOUNDS AT THE PRECLINICAL STAGE OF THE STUDY .....	11
<b>Евстафьева Е. В., Залата О. А., Слюсаренко А. Е.</b> ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ЗАДЕРЖКОЙ ПСИХИЧЕСКОГО И ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ.....	19
<b>Evstafeva E. V., Zalata O. A., Slusarenko A. E.</b> FEATURES OF THE ELEMENT STATUS OF EARLY AGE CHILDREN WITH MENTAL AND PHYSICAL RETARDATION.....	19
<b>Игнатенко Т. С., Майлян Э. А., Капанадзе Г. Д.</b> КОНЦЕНТРАЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ .....	28
<b>Ignatenko T. S., Maylyan E. A., Kapanadze G. D.</b> CONCENTRATIONS OF SEVERAL CYTOKINES IN BLOOD SERUM IN WOMEN WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS .....	28
<b>Косолапова И. В., Дорохов Е. В., Коваленко М. Э.</b> ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕВАТЕЛЬНОЙ МУСКУЛАТУРЫ У ДЕТЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ОККЛЮЗИЕЙ .....	34
<b>Kosolapova I. V., Dorokhov E. V., Kovalenko M. E.</b> FUNCTIONAL FEATURES OF CHEWING MUSCLE IN CHILDREN WITH PHYSIOLOGICAL OCCLUSION .....	34
<b>Попов К. А., Денисова Я. Е., Столярова А. Н., Азимов Э. А., Есауленко Е. Е., Быков М. И., Балачевская О. В., Басов А. А.</b> ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА В ПРОЦЕССЕ РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВАСКУЛЯРНОЙ ЭКСКЛЮЗИИ .....	40

<b>Popov K. A., Denisova Ya. E., Stolyarova A. N., Azimov E. A., Esaulenko E. E., Vykov M. I., Balachevskaya O. V., Basov A. A.</b>	
DYNAMICS OF CHANGES IN OXIDATIVE HOMEOSTASIS PARAMETERS DURING RAT LIVER REPERFUSION AFTER VASCULAR EXCLUSION .....	40

<b>Штыгашева О. В., Агеева Е. С.</b>	
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕНДЕНЦИИ КАРДИОЭЗОФАГЕАЛЬНОГО РАКА ЖЕЛУДКА И РАКА ПИЩЕВОДА В РЕСПУБЛИКЕ ХАКАСИЯ.....	47
<b>Shtygasheva O. V., Ageeva E. S.</b>	
EPIDEMIOLOGICAL TRENDS OF CARDIOESOPHAGEAL GASTRIC CANCER AND ESOPHAGOS CANCER IN THE REPUBLIC OF KHAKASIA .....	47

## ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ

## HISTORY OF MEDICINE

<b>Агеева Е. С., Демиденко Л. А.</b>	
ВИННИЦКИЙ ИЛЬЯ МАРКОВИЧ .....	55
<b>Ageeva E. S., Demidenko L. A.</b>	
VINNITSKY ILYA MARKOVICH .....	55

## ОБЗОРЫ

## REVIEWS

<b>Архипенко А. Л., Беренштейн М. В., Ухаботина А. В., Фомочкина И. И., Нуридинона Э. С.</b>	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ .....	64
<b>Archipenko A. L., Berenshtein M. V., Ukhabotina A. V., Fomochkina I. I., Nuriddinova E. S.</b>	
MOLECULAR-GENETIC APPROACHES TO DIAGNOSTICS OF HEREDITARY PATHOLOGY .....	64

<b>Иванцова Н. Л., Белякова А. Г., Дмитриевская М. И., Усеинова А. Н., Мельникова В. М., Абрамова К. И.</b>	
ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВУЮ СИСТЕМУ, У БОЛЬНЫХ С COVID-19.....	75
<b>Ivantsova N. L., Belyakova A. G., Dmitrievskaya M. I., Useinova A. N., Melnikova V. M., Abramova K. I.</b>	
PECULIAR PROPERTIES OF USAGE OF DRUGS THAT AFFECT THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN PATIENTS WITH COVID-19 .....	75

<b>Каде А. Х., Занин С. А., Сидоренко А. Н., Цымбалов О. В., Муратова А. Ю.</b>	
РОЛЬ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ФАКТОРА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ.....	82
<b>Kade A. Kh., Zanin S. A., Sidorenko A. N., Tsymbalov O. V., Muratova A. Yu.</b>	
ROLE OF HIF IN HEALTH AND DISEASE .....	82

<b>Хайтович А. Б., Ткач В. В., Ткач А. В.</b>	
СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2 .....	88
<b>Khaitovich A. B., Tkach V. V., Tkach A. V.</b>	
SPECIFIC LABORATORY METHODS IN DIAGNOSTICS OF INFECTION CAUSED BY THE SARS-COV-2 VIRUS .....	88

<b>Шатохина А. С., Быков И. М., Филиппов Е. Ф., Курзанов А. Н.</b>	
СУЩЕСТВУЮЩИЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ САЛИВАДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	106

<b>Shatokhina A. S., Bykov I. M., Filippov E. F., Kurzanov A. N.</b> EXISTING AND POTENTIAL POSSIBILITIES OF SALIVARY DIAGNOSTICS IN BREAST CANCER .....	106
<b>Varghese Jeffy Vianneys, Sorokina L. E., Rebik A. A., Regan O. V.</b> GENOMIC SCIENCE-BASED PERSONALIZED TREATMENT FOR CANCER .....	115
<b>Варгхесе Джеффи Вианнейс, Сорокина Л. Е., Ребик А. А., Реган О. В.</b> ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ РАКА – ДОСТИЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ .....	115

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕННИКОВ В УСЛОВИИ КОРРЕКЦИИ ГИПОСПЕРМАТОГЕНЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Демяшкин Г. А.<sup>1,2</sup>, Корякин С. Н.<sup>2</sup>, Вадюхин М. А.<sup>1</sup>, Щекин В. И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), 119048 Трубецкая улица, 8 стр.2, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Пыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ (ФГБУ «НМИЦ радиологии»), 249036, ул. Королева, 4, Обнинск, Россия.

**Для корреспонденции:** Демяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: dr.dga@mail.ru

**For correspondence:** Grigory Demyashkin, PhD, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: dr.dga@mail.ru

### Information about authors:

**Demyashkin G. A.**, <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

**Koryakin S. N.**, <https://orcid.org/0000-0003-0128-4538>

**Vadyukhin M. A.**, <https://orcid.org/0000-0002-6235-1020>

**Shchekin V. I.**, <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время бесплодие затрагивает до 15% супружеских пар во всем мире, половина из которого обусловлено «мужским фактором». Для изучения механизмов нарушения сперматогенеза требуется создание моделей с использованием лекарственных препаратов, обладающих высокой гонадотоксичностью или облучения с последующим применением методов, способствующих повышению функции и качества сперматозоидов, одним из которых является плазма, обогащенная тромбоцитами (Leukocyte-poor platelet-rich plasma, LP-PRP). Цель исследования: морфологическая оценка сперматогенеза при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами, после облучения электронами в дозе 2 Грей. Материал и методы. Самцы Wistar (220±20 г; 9 – 10 недель; n=60) были случайным образом поделены на 3 группы (условные названия): I – Контроль; II – облучение электронами, доза 2 Гр; III – введение LP-PRP+IGF после облучения в течение 35 дней. Результаты. Через неделю после облучения обнаружили снижение количества половых клеток, уменьшение высоты сперматогенного эпителия. Положительные эффекты после применения LP-PRP+IGF наблюдали уже на второй неделе, которые сохранялись на протяжении всего эксперимента. Заключение. Компоненты плазмы, обогащенной тромбоцитами, способствуют активации сперматогоний и восстановлению пула половых клеток, тем самым оказывая положительное влияние на сперматогенез.

**Ключевые слова:** сперматогенез, бесплодие, облучение, обогащенная тромбоцитами плазма.

### MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TESTIS UNDER CONDITIONS OF CORRECTION OF HYPOSPERMATOGENESIS (EXPERIMENTAL RESEARCH)

Demyashkin G. A.<sup>1,2</sup>, Koryakin S. N.<sup>2</sup>, Vadyukhin M. A.<sup>1</sup>, Shchekin V. I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia.

<sup>2</sup>Medical Radiological Scientific Center named after A.F. Tsyba – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russia.

### SUMMARY

Currently, infertility affects up to 15% of married couples worldwide, half of which is due to the «male factor». To study the mechanisms of impaired spermatogenesis, it is required to create models using drugs with high gonadotoxicity or radiation, followed by the use of methods that improve the function and quality of spermatozoa, one of which is Leukocyte-poor platelet-rich plasma (LP-PRP). Purpose of the study: morphological assessment of spermatogenesis using platelet-rich plasma after electron irradiation at a dose of 2 Gray. Material and methods. Wistar males (220±20 g; 9 – 10 weeks; n= 60) were randomly divided into 3 groups (conventional names): I – Control; II – electron irradiation, dose 2 Gray; III – administration of LP-PRP+IGF after irradiation for 35 days. Results. A week after irradiation, a decrease in the number of germ cells and a decrease in the height of the spermatogenic epithelium were found. Positive effects after the application of LP-PRP+IGF were observed already in the second week, which persisted throughout the entire experiment. Conclusion. The components of platelet-rich plasma contribute to the activation of spermatogonia and the restoration of the pool of germ cells, thereby having a positive effect on spermatogenesis.

**Key words:** spermatogenesis, infertility, radiation, platelet-rich plasma.

В настоящее время бесплодие затрагивает до 15% супружеских пар во всем мире, половина из которого обусловлена «мужским фактором», а у 2% мужчин наблюдаются субоптимальные параметры сперматозоидов (азооспермия), причинами которых могут быть один или сочетание нескольких факторов – инфекционный, аутоиммунный, идиопатический и др. [1; 2; 3].

Для изучения механизмов нарушения сперматогенеза требуется создание моделей с использованием лекарственных препаратов, обладающих гонадотоксичностью или облучения [4].

Облучение всего тела может вызвать обратимые или необратимые повреждения семенника – одного из наиболее радиочувствительных органов в дозах облучения от 0,1 Гр и выше из-за наличия сенсibilизированных активно пролиферирующих половых клеток. Сообщалось о снижении количества и появлении морфологических аномалий сперматозоидов при дозах облучения крыс от 1 до 2 Гр. [5; 6].

Одним из методов, способствующих повышению функции и качества сперматозоидов, в последнее время является применение плазмы, обогащенной тромбоцитами (Leukocyte-poor platelet-rich plasma, LP-PRP), потенциальный терапевтический эффект которой обусловлен наличием биологически активных веществ, способных повышать качественные и количественные параметры сперматозоидов [7].

Одним из ключевых факторов роста тромбоцитов в LP-PRP является инсулиноподобный фактор роста-1 (Insuline-like growth factor-1, IGF-1), который может способствовать генерации округлых и удлинённых сперматид в культивируемых MTF (mouse testicular fragment) новорожденных.

Исходя из вышесказанного, мы полагаем, что LP-PRP улучшает морфофункциональные характеристики половых клеток и является регенеративным субстратом за счет выделения биологически активных веществ, играющих важную роль в процессе сперматогенеза, а дополнительное введение IGF приведет к повышению эффективности LP-PRP в экспериментальной модели гипосперматогенеза у животных.

Цель исследования: морфологическая оценка сперматогенеза при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами, после облучения электронами в дозе 2 Грей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное морфологическое исследование проводили на базах Сеченовского университета и Экспериментального сектора Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба.

Животные для исследования *in vivo*. Самцов крыс Wistar (220±20 г; 9–10 недель; n=60) содержали в виварии при контролируемой температуре (22°C) и световом периоде (12L:12D) со свободным доступом к воде и крысиному корму.

### *Дизайн эксперимента.*

Экспериментальные животные были случайным образом поделены на 3 группы (условные названия): I – Контроль, II – 2PT, III – 2PT+LP-PRP+IGF. I группе (n=10) вводили 0,9% физиологический раствор NaCl интраперитонеально на протяжении всего эксперимента; II группа (n=30) однократное прицельное облучение электронами тазово-брюшного сегмента (фиксация животных в специально сконструированных распорках) с использованием линейного акселератора (линейный акселератор «NOVAC-11», мощность дозы 1 Гр/мин, энергия 10 МэВ, частота 9 Гц, размер поля – Ø 100 мм; доза – 2 Гр); III группа (n=20) после однократного облучения животные получали LP-PRP (200 мкл, интраперитонеальная инъекция один раз в неделю в течение 4 недель) и IGF (14 МЕ/кг, 0.333 мг/кг, подкожная инъекция один раз в неделю в течение 4 недель).

Животных всех групп (I – III) выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика. Сроки умерщвления: I группа – на 42 сутки от начала эксперимента; II группа – по 5 крыс на 7, 14, 21, 28, 35, 42 сутки после облучения электронами; III группа – по 5 крыс на 14, 21, 28 и 35 сутки после облучения электронами. При выборе срока эксперимента учитывали физиологическую длительность сперматогенеза у крыс, которая, в среднем, составляет 45 дней.

Плазму, обогащенную тромбоцитами (LP-PRP), изготавливали согласно стандартной методике [8].

### *Морфологический блок.*

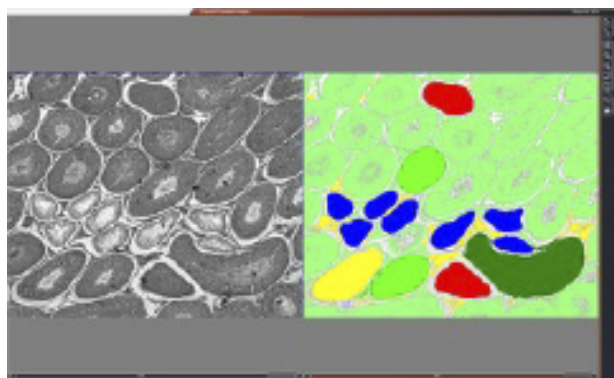
После извлечения оценивали внешний вид семенников, состояние паренхимы на разрезе, взвешивали (в граммах) и измеряли, фиксировали в растворе Буэна, приготавливали парафиновые блоки, а затем срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартной методике.

Морфологический и морфометрический анализ проводили в 10-ти случайно выбранных полях зрения микроскопа при увеличении ×200 и ×400 в 4-х случайных срезах с каждого образца, перемещая предметные стёкла с равными интервалами вдоль осей X и Y, с использованием полуавтоматического анализатора изображения. Световую микроскопию осуществляли с помощью системы видео-микроскопии (микроскоп Leica DM2000, Германия; камера Leica ICC50 HD; компьютер Platrun LG), а морфометриче-

ские данные получали с использованием ПО Olympus DP2-BSW (с версий 2.1 по 2.2, сборка 6212, Токио, Япония) (рис.1).

В каждом из полей рассчитывали следующие параметры: объем семенника; диаметр извитых семенных канальцев; количество мужских гамет, клеток Сертоли и Лейдига; высоту сперматогенного эпителия; объем интерстициальной ткани.

Тестикулярную оценку проводили с использованием критериев S. Johnsen.



**Рис. 1. Морфометрические данные семенников с использованием программных обеспечений для обработки и анализа изображения Leica Application Suite (LAS); синим цветом выделены семенные канальцы с признаками аплазии.**

Статистический анализ. Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с ис-

пользованием компьютерной программы SPSS 12.00 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Сравнение между группами проводилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA со значимостью  $p < 0.01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Макро- и микроскопическая оценка.

В образцах второй группы отмечали деструктивные изменения семенников (площадь – 2590000 мкм<sup>2</sup>): уменьшение количества извитых семенных канальцев в 1,5 раза и половых клеток по сравнению с нормой, дегенерацию сперматид и сперматозоидов; снижение количества клеток Сертоли и Лейдига без изменений их структуры. На долю семенных канальцев со снижением высоты сперматогенного эпителия (ниже 50 мкм) и появлением признаков аплазии (площадь – 28079,84 мкм<sup>2</sup>; диаметр – 189,083 мкм;  $p < 0.01$ ) приходилось до 1/8 части семенника (1 – 2 поперечных среза канальцев в поле зрения); средний балл по Johnsen – 7.00±0.4 при  $p < 0.01$ . После введения LP-PRP+IGF отмечали восстановление гистоархитектоники, а также увеличение объема и размеров семенников (площадь – 2867000 мкм<sup>2</sup>), количества канальцев (до 1300) и гамет, восстановление высоты сперматогенного эпителия и волокнистого компонента интерстициальной ткани практически до нормальных значений (табл. 1, 2, 3) (рис. 2).

Таблица 1

**Вес и объем семенников в экспериментальных группах, при  $p < 0.01$**

Группы	Вес семенников, г	Объем семенников, мкм <sup>3</sup>
контроль (42 сут.)	1.5±0.1	1397.5±14.3
2PT (42 сут.)	0.8±0.05*	688.3±7.2*
2PT+LP-PRP+IGF (35 сут.)	1.06±0.09**	831±12.6**

Примечание: \*  $p < 0.01$  (контроль и 2PT); \*\*  $p < 0.01$  (контроль и 2PT+LP-PRP+IGF)

Таблица 2

**Морфометрические данные семенных канальцев в экспериментальных группах, при  $p < 0.01$**

Группа	Площадь семенного канальца, мкм <sup>2</sup>	Диаметр семенного канальца, мкм	Объем интерстициальной ткани, мкм <sup>3</sup>	Высота сперматогенного эпителия, мкм
контроль (42 сут.)	224151.32±103.7	344.4±6.4	93.1±7.3	110.9±13.05
2PT (42 сут.)	173252.09±72.07*	310.57±2.1*	189.2±14.1*	68.2±7.67*
2PT+LP-PRP+IGF (35 сут.)	196748.73±87.63**	328.69±4.9**	146.9±8.5**	87.8±10.86**

Примечание: \*  $p < 0.01$  (контроль и 2PT); \*\*  $p < 0.01$  (контроль и 2PT+LP-PRP+IGF)

Положительные эффекты после применения LP-PRP+IGF наблюдали уже на второй неделе. Окончательное восстановление пула половых

клеток и нормальное функционирование сперматогенеза наблюдали к концу исследования (на 35 сутки).



Таблица 3

Количество половых клеток в семенных каналах при облучении электронами разными дозами, при  $p < 0.01$

Группы	Сперматогонии (А и В) $\times 10^6$	Сперматоциты $\times 10^6$	Сперматиды $\times 10^6$	Клетки Сертоли $\times 10^6$	Клетки Лейди-га $\times 10^6$
контроль (42 сут.)	117.2 $\pm$ 5.6	110.3 $\pm$ 3.1	163.2 $\pm$ 3.18	12.0 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.2
2РТ (42 сут.)	43.6 $\pm$ 2.5*	101.0 $\pm$ 1.5*	150.6 $\pm$ 1.9*	10.0 $\pm$ 0.5*	7.0 $\pm$ 0.1*
2РТ+LP-PRP+IGF (35 сут.)	75.9 $\pm$ 3.7**	105.8 $\pm$ 2.2**	156.0 $\pm$ 2.5**	9.8 $\pm$ 0.6**	6.9 $\pm$ 0.11**

Примечание: \*  $p < 0.01$  (контроль и 2РТ); \*\*  $p < 0.01$  (контроль и 2РТ+LP-PRP+IGF)

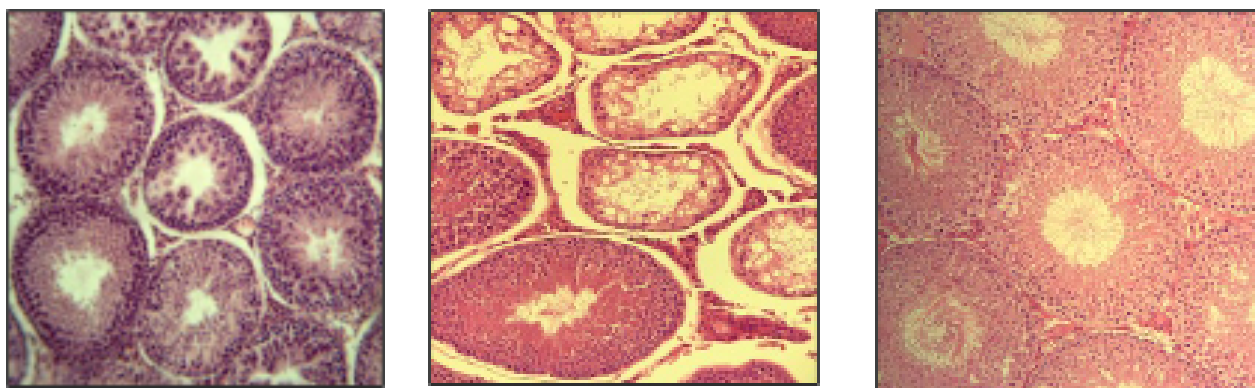


Рис. 2. Семенник, морфологическая картина экспериментальных групп; окраска – гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 200$ . А – контроль; Б – на 7 сутки после облучения (2 Гр, однократно), маркер – семенные каналцы с признаками аплазии; В – на 35 сутки после облучения (2 Гр, однократно) и введения LP-PRP+IGF.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мужской фактор остается одной из ведущих причин, приводящей к бесплодию в супружеских парах, так как нарушение репродуктивной функции напрямую связано со структурными изменениями в яичках [9].

Для понимания механизмов нарушения сперматогенеза необходимо их изучение с использованием моделей, а также применение перспективных методов коррекции, что послужило темой настоящего исследования.

Для ингибирования сперматогенеза у животных впервые был использован импульсный ускоритель электронов «NOVAC-11». Уже через неделю были обнаружены нарушения гистоархитектоники семенника, снижение количества половых клеток (после облучения происходит образование сшивок и подавление репликации ДНК, а также апоптоз, возникающий под действием ионизирующего излучения на митотически активные клетки [10]), уменьшение высоты сперматогенного эпителия, но с сохранением его целостности. Описанные патоморфологические

изменения в группе облученных животных (2РТ) сохранялись на протяжении всего эксперимента, что позволило вводить LP-PRP+IGF животным III-й группы многократно. Полученные результаты, на первый взгляд, противоречат данным других исследований [11], однако обнаруженные морфологические изменения можно объяснить более мягким действием электронов на структуру семенника в отличие от гамма-облучения. Преимуществом прицельного облучения, применяемого в данном исследовании в сравнении с введением химиопрепаратов, а также общего облучения, является протекция других органов и систем от возможной деструкции и других неблагоприятных последствий [4].

Согласно имеющимся данным в специализированной литературе, различные факторы роста играют важную роль в улучшении качественных характеристик мужских гамет и их микроокружения – улучшают пролиферацию, дифференцировку и предотвращают апоптоз [3].

Многие исследователи часто используют LP-PRP для восстановления семенников после моделирования в них бесплодия, однако резуль-

таты таких экспериментов противоречивы. В исследовании Mauduit et al. отмечали снижение экспрессии факторов роста на фоне облучения животных в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр и 4 Гр, поэтому для усиления эффекта LP-PRP и ускорения процессов восстановления сперматогенеза после облучения мы дополнительно вводили IGF животным III группы, что, скорее всего, было обосновано, учитывая наблюдаемые положительные эффекты [10]. В то же время, исследования, в которых животным вводили только PRP не показали подобного эффекта [4].

Используемая для коррекции гипосперматогенеза плазма, обогащенная тромбоцитами, активированная CaCl<sub>2</sub>, в комбинации с IGF в настоящем исследовании привела к активации низкодифференцированных сперматогоний В-типа и восстановлению пула половых клеток, что частично совпадает с данными других исследователей [4]. Количество клеток Сертоли и Лейдига на протяжении эксперимента во всех группах практически оставалось неизменным в связи с их большей устойчивостью к воздействию радиации [11].

Следует отметить, что появление положительной динамики в семенниках животных на фоне комбинированного применения LP-PRP+IGF связано с правильно подобранной концентрацией и частотой введения LP-PRP и IGF.

Таким образом, возникшие патоморфологические изменения герминативного и стромального компонентов семенников под действием ионизирующего излучения приводят к гипосперматогенезу, что может быть использовано в качестве модели, например, секреторной формы мужского бесплодия, а все вышеперечисленные факторы и биохимические процессы могут быть вовлечены в механизм улучшения PRP-зависимых параметров сперматогенеза и морфологии сперматозоидов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компоненты плазмы, обогащенной тромбоцитами, способствуют активации сперматогоний и восстановлению пула половых клеток, тем самым оказывая положительное влияние на сперматогенез. На основании выявленных качественных и количественных патоморфологических изменений семенных канальцев, возникших на фоне применения импульсного ускорителя электронов «NOVAC-11», можно использовать его при моделировании гипосперматогенеза.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Kumar N., Singh A. K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):191-196. doi:10.4103/0974-1208.170370
2. Chalyi M. E., Akhvediani N. D., Kharchilava R. R. Male infertility. *Urologiia.* 2017;(S2):4-19. (In Russ.)
3. Demyashkin G. A. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya.* 2018;60:208-218. (In Russ.) doi:10.31116/tsitol.2018.03.07.
4. Dehghani F., Sotoude N., Bordbar H., Panjeshahin M., Karbalay-Doust S. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan. *Platelets.* 2018;30(6):1-8. doi:10.1080/09537104.2018.1478400
5. Khan S., Adhikari J. S., Rizvi M. A. Radioprotective potential of melatonin against 60Co  $\gamma$ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci.* 2015;22:61. doi.org/10.1186/s12929-015-0156-9
6. Dergilev A. A., Palyga G. F., Chibisova O. F., Ivanov V. L., Panfilova V. V., Zhavoronkov L. P. Radiation and spermatogenesis: experimental estimation of radiation effect at doses below castrate level on ontogenesis. *Radiation and Risk.* 2012;21(4):51-60. (In Russ.)
7. Al-Nasser R. The Effectiveness of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) in the Therapy of Infertile Men with Non-Abstractive Azoospermia, *J Reprod Med Gynecol Obstet.* 2018;3:011. doi: 10.24966/RMGO-2574/100011
8. Filardo G., Kon E., Roffi A. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2015;23:2459-2474
9. Demyashkin G. A. Inhibin B in seminiferous tubules of human testes in normal spermatogenesis and in idiopathic infertility. *Syst Biol Reprod Med.* 2019;65(1):20-28. doi:10.1080/19396368.2018.1478470
10. Marzban M., Anjamshoa M., Jafari P., Masoumi H., Ahadi R., Fatehi D. Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: radioprotective role of silymarin. *Electron Physician.* 2017;9(6):4524-4532. doi: 10.19082/4524
11. Mauduit C., Siah A., Foch M., Chapet O., Clippe S., Gerard J., Benahmed M. Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2001;50;203-12. doi:10.1016/S0360-3016(01)01461-4.

УДК:546.81:547.1:616.12-099

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-2-11-18

## ОЦЕНКА КАРДИТОКСИЧЕСКИХ ПОБОЧНЫХ ЯВЛЕНИЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ДОКЛИНИЧЕСКОМ ЭТАПЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Додохова М. А.<sup>1</sup>, Котиева И. М.<sup>2</sup>, Сафроненко А. В.<sup>3</sup>, Алхусейн-Кулягинова М. С.<sup>4</sup>,

Милаева Е. Р.<sup>5</sup>, Шпаковский Д. Б.<sup>5</sup>, Макаренко Ю. М.<sup>6</sup>, Терехов А. Ю.<sup>7</sup>, Сергеева Е. О.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биомедицины и психофизиологии, <sup>2</sup>кафедра патологической физиологии, <sup>3</sup>кафедра фармакологии и клинической фармакологии, <sup>4</sup>кафедра химии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, Нахичеванский пер., 29, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>5</sup>Кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Химический факультет, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 3, г. Москва, Россия

<sup>6</sup>ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро», 344085, ул. Благодатная, 170а, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>7</sup>Кафедра патологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 357501, ул. Калинина, 11, Пятигорск, Россия

**Для корреспонденции:** Додохова Маргарита Авдеевна, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биомедицины и психофизиологии, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: dodohova@mail.ru.

**For correspondence:** Dodokhova Margarita Avdeevna, PhD, Associate Professor of the Department of Biomedicine and Psychophysiology, Rostov State Medical University, e-mail: dodohova@mail.ru.

### Information about authors:

**Dodokhova M. A.**, <https://orcid.org/0000-0003-3104-827X>

**Safronenko A. V.**, <https://orcid.org/0000-0003-4625-6186>

**Kotieva I. M.**, <https://orcid.org/0000-0002-2796-9466>

**Alkhuseyn-Kulyaginova M. S.**, <https://orcid.org/0000-0001-5123-5289>

**Milaeva E. R.**, <https://orcid.org/0000-0002-5489-3866>

**Shpakovsky D. B.**, <https://orcid.org/0000-0002-7824-3382>

**Makarenko Yu. M.**, <https://orcid.org/0000-0001-8354-6487>

**Terekhov A. Yu.**, <https://orcid.org/0000-0002-7781-362X>

**Sergeeva E. O.**, <https://orcid.org/0000-0001-7496-3967>

### РЕЗЮМЕ

Важнейшей задачей доклинического исследования перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства (ЛС) является оценка безопасности их применения. Изучение кардиотоксичности оловоорганических соединений (ООС) бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me5) произведено при однократном внутривенном введении в максимально переносимой дозе (МПД) в эксперименте на 30 крысах линии Wistar (самки) весом 190-210гр. По результатам патоморфологического исследования и изменению активности маркерных ферментов крови (КК - креатинкиназа (КФ 2.7.3.2), ЛДГ - лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27), АсАт - аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1), АлАт - аланинаминотрансфераза (КФ 2.6.1.2)) через 14 суток после введения субстанций морфо-функциональные изменения были охарактеризованы как потенциально обратимые.

**Ключевые слова:** оловоорганические соединения, кардиотоксичность, противоопухолевые средства, антиоксиданты, исследования *in vivo*.

### ASSESSMENT OF CARDIOTOXIC SIDE EFFECTS IN THE ADMINISTRATION OF ORGANOTIN COMPOUNDS AT THE PRECLINICAL STAGE OF THE STUDY

**Dodokhova M. A.<sup>1</sup>, Kotieva I. M.<sup>1</sup>, Safronenko A.V.<sup>1</sup>, Alkhuseyn-Kulyaginova M. S.<sup>1</sup>, Milaeva E. R.<sup>2</sup>,  
Shpakovsky D. B.<sup>2</sup>, Makarenko Yu. M.<sup>3</sup>, Terekhov A. Yu.<sup>4</sup>, Sergeeva E. O.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>State Medical Institution of the Rostov region «Pathological and Anatomical Bureau» Rostov-on-Don, Russia

<sup>4</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

### SUMMARY

The most important task of preclinical research of promising candidates for antitumor drugs is to assess the safety

of their use. The study of the cardiotoxicity of organotin compounds (OOS) dimethyltin bis (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) (Me3) and (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) triphenyltin (Me5) was carried out with a single intragastric administration at the maximum tolerated dose (MTD) in an experiment on 30 Wistar rats (female) weighing 190-210gr. According to the results of pathomorphological studies and changes in the activity of marker blood enzymes (CK - creatine kinase (EC 2.7.3.2), LDH - lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27), AsAt - aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1), AlAt - alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2)), morpho-functional changes were characterized as potentially reversible 14 days after administration of the substances.

**Key words:** organotin compounds, cardiotoxicity, antitumor agents, antioxidants, studies in vivo.

Современные подходы к раннему выявлению и комплексному лечению злокачественных новообразований (ЗН) привели к значительному увеличению продолжительности жизни пациентов во всех клинических группах диспансерного наблюдения. Имеющийся на сегодняшний день арсенал химиотерапевтических средств обладает широким спектром побочных эффектов и при длительной терапии существенно повышается вероятность их развития. Наиболее неблагоприятно влияют на выживаемость и качество жизни кардиологические осложнения, как в период терапии, так и после ее окончания [1; 2; 3]. Основными механизмами морфо-функциональных нарушений работы клеток миокарда являются окислительный и нитратный стрессы, образование белковых продуктов, которые приводят к воспалению кардиомиоцитов, нарушению кальциевого гомеостаза, программируемой гибели клеток, набуханию клеточных структур [4; 5]. Дисфункция миокарда под влиянием противоопухолевых агентов может иметь необратимый (1-й тип) или обратимый характер (2-й тип) [6; 7]. Клинически дисфункция миокарда и I и II типа представляет собой большую опасность для жизни человека, так как может приводить к фатальным осложнениям, таким как: сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, в том числе инфаркт миокарда, нарушения ритма и проводимости, вплоть до фибрилляции, артериальная гипертензия, тромбоэмболические осложнения; лёгочная гипертензия; пороки клапанов сердца; перикардиты [8; 9]. Вероятность и тяжесть осложнений напрямую зависит от кумулятивной дозы противоопухолевого лекарственного средства (ЛС), возраста пациента и наличия у него сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в анамнезе. По времени возникновения выделяют острую и хроническую кардиотоксичность [10; 11; 12]. Различные проявления кардиотоксичности ЛС могут стать причиной прерывания и/или отмены противоопухолевой терапии. Большое количество работ посвящено поиску кардиопротекторных агентов, снижающих риск и тяжесть осложнений при химиотерапии ЗН, большой группой таких соединений являются антиоксиданты [13; 14; 15].

На этапе разработки и доклинического исследования новых противоопухолевых ЛС обя-

зательным является изучение безопасности их применения, в том числе и оценка кардиотоксичности. Оловоорганические соединения, рассматриваемые нами как перспективные кандидаты в ЛС, проявили выраженный цитотоксический эффект по отношению к линиям опухолевых клеток человека [16; 17; 18] и на моделях перевиваемых опухолей *in vivo* [19; 20]. Различные органические лиганды в молекуле ООС модулируют биологическую активность и определяют класс безопасности субстанций. Различные исследования показывают, что ООС влияют на макромолекулы клетки (ДНК или белки), а также на энергетику клетки и функции митохондрий, взаимодействуют с клеточными мембранами, увеличивают концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитоплазме [21]. Для большинства ООС показано, что они вызывают апоптотическую гибель клетки. Апоптоз вызывается либо за счет влияния ООС на редокс-сигнальные пути клеток (накопление активных метаболитов кислорода (АМК)), либо нарушением проницаемости мембран митохондрий, активации каспаз или ввиду взаимодействия с ДНК, уменьшением выработки антиапоптотического белка Bcl-2 [22]. Кроме того, ингибирование ферментов, вызванное ООС, также связано с их антипролиферативной активностью. Известно, что один из механизмов действия ООС определяется их способностью связываться с сульфгидрильными группами белка тубулина, играющего ключевую роль в формировании микротрубочек и клеточной пролиферации. В результате, нарушается репликация и транскрипция ДНК, что приводит к задержке клеточного цикла и, в конечном итоге, - к апоптозу [23; 24; 25].

Гибридные молекулы ООС бис (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметиллолова (Me3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифениллолова (Me5) содержат протекторный фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола, обладающий антиоксидантной активностью [26]. Направленный синтез ООС Me3 и Me5 позволил сочетать противоопухолевый эффект и снижение общей токсичности, в том числе и на клетки миокарда [27].

Целью нашего исследования явилось изучение активности маркеров токсического повреждения кардиомиоцитов в крови, а также описание гистопатологической картины сердца через

14 суток после однократного внутрижелудочного введения Me3 и Me5 крысам линии Wistar в МПД.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Соединения.**

ООС Me3 и Me5 были синтезированы по описанным методикам [23; 25]. Подлинность и строение ООС были доказаны проведением ядерно – магнитной и инфракрасной спектроскопии.

**Животные.**

Экспериментальное исследование было выполнено на 30 крысах Wistar (самки). Животные получены из питомника НИЦ «Курчатовский институт» - «ПЛЖ «Рапполово», после карантинного изолирования (14 суток), животные были рандомизированы по весу.

**Дизайн исследования.**

Животные были разделены на 3 группы: I – однократное внутрижелудочное введение суспензии Me3 в 1% растворе желатина в МПД 2000 мг/кг (n=10); II – однократное внутрижелудочное введение суспензии Me5 в 1% растворе желатина в МПД 750 мг/кг (n=10); III – контрольная группа - 1% раствор желатина вводился в эквивалентных режимах и объемах (n=10).

Объем вводимой суспензии не превышал 2 мл.

Все исследования выполнялись в соответствии с Международными и Российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных.

МПД для субстанций Me3 и Me5 были определены в предварительной серии эксперимента при определении класса токсичности и LD50 [28; 29].

Через 14 суток после введения субстанций была произведена эвтаназия путем декапитации на гильотине, патолого - анатомическое вскрытие производилось по известной методике [30]. Применялась стандартная подготовка сердечной ткани для гистологического исследования, срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Световая микроскопия и фотофиксация проводилась с использованием микроскопа Leica DM1000. Гистопрепараты описывались с учетом наличия и выраженности следующих признаков: неравномерная окраска миокарда (пересокращение и перерастяжение кардиомиоцитов), состояние кровенаполнения миокарда (диффузное венозно-капиллярное полнокровие, неравномерное и слабое кровенаполнение миокарда), наличие нарушений реологии крови (стазы, сладжи, тромбы), состояние межмышечной стромы (отёк, сдавление, очаговая или диффузная клеточная инфильтрация), состояние кардиомиоцитов (дистрофия и ее вид, атрофия, некроз), признаки возможного наруше-

ния ритма сердца (фрагментация, волнообразная деформация мышечных волокон миокарда).

Для биохимической оценки функционально-метаболического состояния кардиомиоцитов нами произведен анализ изменения активности следующих ферментов крови: КК - креатинкиназа (КФ 2.7.3.2), ЛДГ - лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27), АсАт - аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1), АлАт - аланинаминотрансфераза (КФ 2.6.1.2). Для определения был использован автоматический биохимический анализатор ACCENT 300 и стандартные наборы фирмы CORMAY (Польша)

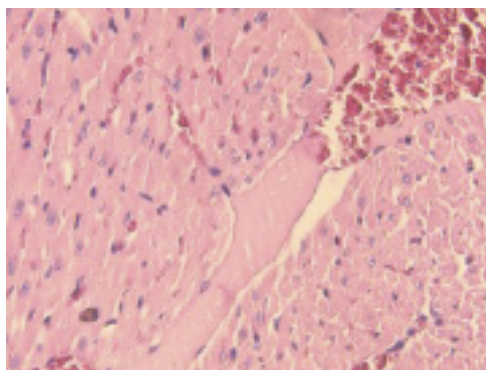
Результаты исследования выражались в виде средней величины показателя  $\pm$  ошибка средней величины. Совокупность показателей в группе проверялась на нормальность распределения посредством теста Андерсона-Дарлинга. Различия показателей в опытной группе по отношению к контрольной оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при вероятности выше 95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

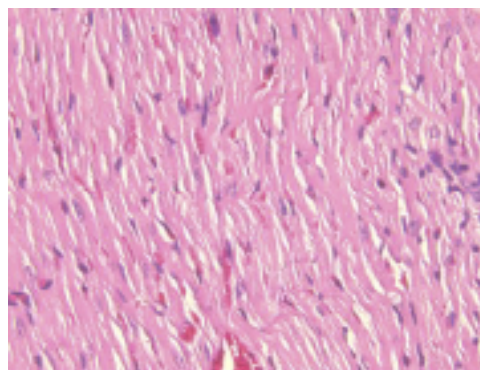
Дозы Me3 2000 мг/кг и Me5 750 мг/кг вызвали токсические эффекты у крыс, но не приводили к гибели животных в эксперименте (14 дней).

При окраске гистопрепаратов гематоксилином и эозином в обеих опытных группах выявлены признаки: равномерная окраска красителями, полнокровие сосудов разной степени выраженности, строма обычного строения, дистрофические изменения разной степени выраженности от легкой (Me5) до средней (Me3), отсутствие признаков возможного нарушения ритма, в группе I – нарушения реологии крови в виде мелкоочаговых кровоизлияний, в группе II – очаговых диапедезных кровоизлияний. Ведение 1% раствора желатина никак не влияло на макроскопическую картину сердца. Микрофотографии гистопрепаратов приведены на рисунке 1.

В сыворотке крови животных оценивали активности ЛДГ, КК, АсАт и АлАт. В обеих опытных группах под влиянием ООС произошли изменения активности маркерных ферментов ишемического и цитолитического повреждения кардиомиоцитов. Наиболее выраженное увеличение активности было отмечено для ферментов образования макроэргического соединения креатинфосфата и обратимого превращения пировиноградной кислоты в молочную. Активность ЛДГ при введении Me3 и Me5 увеличилась на 96,7% и 64,2% соответственно ( $p < 0,05$ ). Повышение активности КК при введении Me3 было достоверно ( $p < 0,05$ ) более значительным (138,2%), чем при введении Me5 (32%). Ста-



Группа I (Me3)  
МПД=2000 мг/кг



Группа II (Me5)  
МПД=750 мг/кг

Рис.1. Микрофотографии гистопрепаратов

статистически значимое увеличение активности аминотрансфераз отмечалось только для Me5 ( $p < 0,05$ ) АсАт на 25,3%, АлАт на 31%. Числен-

ные значения активности маркерных ферментов повреждения кардиомиоцитов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Активность биохимические маркеры повреждения кардиомиоцитов ( $M \pm m$ ,  $p$ )

Показатели	Группы	Группа I n=10 (опытная – Me3)	Группа II n=10 (опытная – Me5)	Группа III n=10 (контр- ольная - 1% раствор желатина)
ЛДГ, ед/л		1281,2 $\pm$ 74,0 $p < 0,05$	1069,6 $\pm$ 75,0 $p < 0,05$	651,5 $\pm$ 22,9
КК, ед/л		6479,5 $\pm$ 277,1 $p < 0,05$	3584 $\pm$ 192,8 $p < 0,05$	2719,6 $\pm$ 135,3
АлАт, ед/л		45,9 $\pm$ 3,4	56,2 $\pm$ 3,1 $p < 0,05$	42,9 $\pm$ 2,1
АсАт, ед/л		70,4 $\pm$ 5,6	81,1 $\pm$ 9,1 $p < 0,05$	64,8 $\pm$ 2,4

## ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация цитотоксического механизма противоопухолевых субстанций осуществляется на все клетки организма в той или иной степени. Кардиомиоциты характеризуются постоянной внутриклеточной регенерацией и большой чувствительностью к оксидативному стрессу [31]. Применяемые в клинике современные противоопухолевые лекарственные препараты являются преимущественно литическими агентами, вызывающими апоптоз и атрофию клеток с развитием фатальных осложнений.

При исследовании влияния Me3 и Me5 на сердечную мышцу выявлены общие черты и характерные особенности двух близких по структуре соединений. Дистрофия – морфологические изменения, характеризующие нарушения тканевого и клеточного метаболизма, ведущие к структурным изменениям. Дистрофия легкой и средней степени тяжести рассматривается нами как выраженное функциональное напряжение миокарда на лекарственное воздействие. Данные нарушения, как правило, заканчиваются са-

моразрешением, и, теоретически, они обратимы. Через 14 суток после введения испытуемых субстанций повреждения кардиомиоцитов, которые диагностированы по увеличению активности кардиотропных маркеров в крови, в некротические изменения не трансформировались. Это позволяет предположить у ООС, содержащих протекторный фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола, второй тип кардиотоксичности (обратимая дисфункция).

Для успешной химиотерапии наибольшую перспективу имеют, на наш взгляд, гибридные молекулы, содержащие цитотоксический и протекторный фрагмент, сочетающие противоопухолевый и кардиозащитный эффект.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что ООС, содержащие фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола, Me3 и Me5 при однократном внутривенном введении крысам (самкам) линии Wistar в МПД 2000 мг/кг и 750 мг/кг соответственно, вызывали изменения морфо-функционального состояния кардиомиоци-

тов, не требующие медикаментозной коррекции (дисфункцию второго типа).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

- Обрезан А. Г., Куликов Н. В. Кардиоваскулярный риск у больных онкологическими заболеваниями. *Медицинский альянс*. 2019;7(3):100-104. doi: 10.36422/2307-6348-2019-7-3-100-104
- Каприн А. Д., Мацкеплишвили С. Т., Потиевская В. И., Поповкина О. Е., Болотина Л. В., Шкляева А. В., Полуэктова М. В. Сердечно-сосудистые заболевания у онкологических больных. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2019;8(2):139-147. doi:10.17116/onkolog20198021139
- Chang H. M., Okwuosa T. M., Scarabelli T., Moudgil R., Yeh E. T. H. Cardiovascular complications of cancer therapy: best practices in diagnosis, prevention, and management: Part 2. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(20):2552-2565. doi: 10.1016/j.jacc.2017.09.1095
- ElGhandour A. H., Sorady M., Azab S., El Rahman M. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic marker of doxorubicin cardiac toxicity. *Hematology Reviews*. 2009;1(1):6. doi: 10.4081/hr.2009.e6
- Iqubal A., Iqubal M. K., Sharma S., Ansari M. A., Najmi A. K., Ali S. M., Ali J., Haque S. E. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci*. 2019;218:112-131. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.018
- Бедрицкий С. А., Ларионова В. Б., Снеговой А. В. Клинические рекомендации по кардиоваскулярной токсичности индуцированной химиотерапией и таргетными препаратами / ОСОО «Ассоциация онкологов России». М., 2014. 9 с. Доступно по: <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/14.pdf>. Ссылка активна на 01.06.2020.
- Чазова И. Е., Тюляндин С. А., Виценя М. В., Овчинников А. Г., Полтавская М. Г., Гиляров М. Ю., Мартынюк Т. В., Панченко Е. П., Федоткина Ю. А., Стенина М. Б., Трофимова О. П., Агеев Ф. Т. Руководство по диагностике, профилактике и лечению сердечно-сосудистых осложнений противоопухолевой терапии. Часть I. Системные гипертензии. 2017;14(3):6-20. doi:10.26442/2075-082X\_14.3.6-20
- Ayza M.A., Zewdie K. A., Tesfaye B. A., Wondafrash D. Z., Berhe A. H. The Role of Antioxidants in Ameliorating Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;(2020):4965171. doi:10.1155 / 2020 / 4965171
- Потиевская В. И., Ахобеков А. А., Кононова Е. В. Взаимосвязь нарушений ритма сердца с противоопухолевой терапией онкологических заболеваний. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(5):2417. doi:10.15829/1728-8800-2020-2417
- Семенова А. И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение). *Практическая онкология*. 2009;10(3):68-76.
- Albini A., Pennesi G., Donatelli F., Cammarota R., De Flora S., Noonan D. M. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardiooncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(1):14-25. doi:10.1093/jnci/djp440
- Bonneterre J., Roche H., Kerbrat P., Fumoleau P., Goudier M.J., Fargeot P., Montcuquet P., Clavere P., Barats J. C., Monnier A., Veyret C., Datchary J., Van Praagh I., Chapelle-Marcillac I. Long-term cardiac follow-up in relapse-free patients after six courses of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, with either 50 or 100 mg of epirubicin, as adjuvant therapy for node-positive breast cancer: French Adjuvant Study Group. *J Clin Oncol*. 2004;22(15):3070-3079. doi:10.1200/jco.2004.03.098
- Пивнюк В. М., Пономарева О. В., Юрченко О. В., Носко М. М., Дехтярь Т. В., Чехун В. Ф. Терапия пациентов со злокачественными лимфомами с использованием липосомальной формы доксорубина: результаты 15-летнего наблюдения. *Онкология*. 2013;15(2):136-140.
- Самура Б. Б. Сердечно-сосудистые осложнения химиотерапии онкогематологических заболеваний: современные подходы к профилактике и лечению. *Запорожский медицинский журнал*. 2013;3(78):84-89.
- Калюта Т. Ю., Киселев А. Р., Базарбаева А. Х. Кардиотоксичность лекарственных препаратов: возможности профилактики и коррекции (ОБЗОР). *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2020;16(3):736-743.
- Attanzio A., Ippolito M., Girasolo M.A., Saiano F., Rotondo A., Rubino S., Mondello L., Capobianco M. L., Sabatino P., Tesoriere L., Casella G. Anti-cancer activity of di- and tri-organotin(IV) compounds with D-(+)-Galacturonic acid on human tumor cells. *J Inorg Biochem*. 2018;188:102-112. doi:10.1016/j.jinorgbio.2018.04.006
- Ullah H., Previtali V., Mihigo H. B., Twamley B., Rauf M. K., Javed F., Waseem A., Baker R. J., Rozas I. Structure-activity relationships of new Organotin(IV) anticancer agents and their cytotoxicity profile on HL-60,

- MCF-7 and HeLa human cancer cell lines. *Eur J Med Chem.* 2019;181:111544. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.07.047
18. Attanzio A., D'Agostino S., Busà R., Frazzitta A., Rubino S., Girasolo M. A., Sabatino P., Tesoriere L. Cytotoxic Activity of Organotin(IV) Derivatives with Triazolopyrimidine Containing Exocyclic Oxygen Atoms. *Molecules.* 2020;25(4):E859. doi: 10.3390/molecules25040859
19. Höti N., Zhu D. E., Song Z., Wu Z., Tabassum S., Wu M. p53-dependent apoptotic mechanism of a new designer bimetallic compound tri-phenyl tin benzimidazolethiol copper chloride (TPT-CuCl<sub>2</sub>): in vivo studies in Wistar rats as well as in vitro studies in human cervical cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(1):22-33. doi: 10.1124/jpet.104.069104.
20. Li Y. L., Wang Z. W., Guo P., Tang L., Ge R., Ban S. R., Chai Q. Y., Niu L., Li Q. S. Diorganotin(IV) derivatives of substituted N-hydroxybenzamides with selective cytotoxicity in vitro and potent antitumor activity in vivo. *J Inorg Biochem.* 2014;133:1-7. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.12.002
21. Alama A., Tasso B., Novelli F., Sparatore F. Organometallic compounds in oncology: Implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discov. Today.* 2009;14:500–508. doi: 10.1016/j.drudis.2009.02.002
22. Zhang Y. Y., Zhang R. F., Zhang S. L., Cheng S., Li Q. L., Ma C. L. Syntheses, structures and anti-tumor activity of four new organotin(IV) carboxylates based on 2-thienylselenoacetic acid. *Dalton Trans.* 2016;45:8412–8421. doi: 10.1039/c6dt00532b
23. Мухатова Е. М., Осипова В. П., Коляда М. Н., Мовчан Н. О., Шпаковский Д. Б., Грачева Ю. А., Орлова С. И., Милаева Е. Р. Синтез и антиоксидантная активность новых олово-органических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола. Доклады Академии наук. 2013;451(1):46-49 doi:10.7868/S0869565213190134
24. Jenkins R. O., Craig, P. J., Francesconi K. A., Harrington C. F. Environmental and biological aspects of organometallic compounds. O' Hare ed. *Comprehensive Organometallic Chemistry III.* Oxford: Elsevier: 2006;11:603-661. doi: 10.1016/B0-08-045047-4/00178-3
25. Shpakovsky D. B., Banti C. N., Mukhatova E. M., Gracheva Yu. A., Osipova V. P., Berberova N.T., Albov D.V., Antonenko T.A., Aslanov L.A., Milaeva E.R., Hadjikakou S.K. Synthesis, antiradical activity and in vitro cytotoxicity of novel organotin complexes based on 2,6-di-tert-butyl-4-mercaptophenol. *Dalton Trans.* 2014;43(18):6880-6890. doi: 10.1039/C3DT53469C
26. Milaeva E. R., Tyurin V. Y., Gracheva Y. A., Dodochova M. A., Pustovalova L. M., Chernyshev V. N.. Protective Effect of Meso-Tetrakis-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)porphyrin on the In Vivo Impact of Trimethyltin Chloride on the Antioxidative Defense System. *Bioinorg Chem Appl.* 2006;2006:64927. doi:10.1155/BCA/2006/64927
27. Турсунова Н. В., Клиникова М. Г., Бабенко О. А., Лушникова Е. Л. Молекулярные механизмы коррекции кардиотоксических эффектов антрациклинов кардиопротекторами. *Современные проблемы науки и образования.* 2020;(4):160.
28. OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity -Fixed Dose Procedure No. 420. OECD Publishing, Paris, 2001.
29. OECD, Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2008. doi:10.1787/9789264071049-en.
30. Коптяева К. Е., Мужикян А. А., Гушин Я. А., Беляева Е. В., Макарова М. Н., Макаров В.Г. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). *Лабораторные животные для научных исследований.* 2018;(2):71–92. doi:10.29296/2618723X-2018-02-08
31. Volkova M., Russell R. 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev.* 2011;7(4):214-20. doi:10.2174/157340311799960645

## REFERENCES

1. Obrezan A., Kulikov N. Cardiovascular risk in patients on oncological diseases. *Meditsinskii al'yans.* 2019;7(3):100-104. (In Russ). doi:10.36422/2307-6348-2019-7-3-100–104.
2. Kaprin A. D., Matskeplishvili S. T., Potievskaya V. I., Popovkina O. E., Bolotina L.V., Shklyayeva A. V., Poluektova M. V. Cardiovascular diseases in cancer patients. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena.* 2019;8(2):139–147. (In Russ). doi:10.17116/onkolog20198021139
3. Chang H.M., Okwuosa T.M., Scarabelli T., Moudgil R., Yeh E. T.H. Cardiovascular complications of cancer therapy: best practices in diagnosis, prevention, and management: Part 2. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(20):2552–2565. doi: 10.1016/j.jacc.2017.09.1095
4. ElGhandour A. H., Sorady M., Azab S., El Rahman M. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic marker of doxorubicin cardiac toxicity. *Hematology Reviews.* 2009;1(1):6. doi: 10.4081 / hr. 2009. e6
5. Iqbal A., Iqbal M. K., Sharma S., Ansari M. A., Najmi A. K., Ali S. M., Ali J., Haque S. E. Molecular mechanism involved in



cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci.* 2019;218:112-131. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.018

6. Bedritsky S. A., Larionova V. B., Snegovoy A. V. Clinical guidelines for cardiovascular toxicity induced by imiotherapy and targe ted drugs. Moscow, 2014. 9 p. (In Russ). Available at: <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/14.pdf>. Accessed June 1, 2020.

7. Chazova I. Ye., Tyulyandin S. A., Vitsenia M. V., Ovchinnikov A. G., Poltavskaya M. G., Gilyarov M. Yu., Martynyuk T. V., Panchenko E. P., Fedotkina Yu. A., Stenina M. B., Trophimova O. P., Ageev F. T. Clinical Manual for Diagnosis, Prevention and Treatment of Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. Part I. Systemic Hypertension. 2017;14(3):6–20. (In Russ). doi: 10.26442/2075-082X\_14.3.6-20

8. Ayza M. A., Zewdie K. A., Tesfaye B. A., Wondafrash D. Z., Berhe A. H. The Role of Antioxidants in Ameliorating Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;(2020):4965171. doi:10.1155 / 2020 / 4965171

9. Potievskaya V. I., Akhobekov A. A., Kononova E. V. Relationship between cardiac arrhythmias and anticancer therapy. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2020;19(5):2417. (In Russ). doi:10.15829/1728-8800-2020-2417.

10. Semenova A. I. Cardiotoxicity and neurotoxicity of antineoplastic agents (pathogenesis, clinics, prophylaxis, treatment). *Prakticheskaya onkologiya.* 2009;10(3):68-76. (In Russ.).

11. Albin A., Pennesi G., Donatelli F., Cammarota R., De Flora S., Noonan D. M. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardiooncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(1):14-25. doi:10.1093/jnci/djp440

12. Bonnetterre J., Roche H., Kerbrat P., Fumoleau P., Goudier M.J., Fargeot P., Montcuquet P., Clavere P., Barats J. C., Monnier A., Veyret C., Datchary J., Van Praagh I., Chapelle-Marcillac I. Long-term cardiac follow-up in relapse-free patients after six courses of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, with either 50 or 100 mg of epirubicin, as adjuvant therapy for node-positive breast cancer: French Adjuvant Study Group. *J Clin Oncol.* 2004;22(15):3070-3079. doi:10.1200/jco.2004.03.098

13. Pivnyuk V. M., Ponomarova O. V., Yurchenko O. V., Nosko M. M., Dekhtyar T. V., Chekhun V. F. Treatment of patients with malignant lymphomas using the liposomal form of doxorubicin: the results of 15-year follow-up. *Onkologiya.* 2013;15(2);136–140. (In Russ).

14. Samura B. Cardiovascular complications of chemotherapy of oncohematological diseases: modern approaches to prevention and treatment. *Zaporozhskiy meditsynskiy zhurnal.* 2013;3(78):84–89. (In Russ).

15. Kalyuta T. Yu., Kiselev A. R., Bazarbaeva A. Kh. Medication cardiotoxicity: potential of prevention and correction (REVIEW). *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2020;16(3):736-743. (In Russ).

16. Attanzio A., Ippolito M., Girasolo M. A., Saiano F., Rotondo A., Rubino S., Mondello L., Capobianco M. L., Sabatino P., Tesoriere L., Casella G. Anti-cancer activity of di- and tri-organotin(IV) compounds with D-(+)-Galacturonic acid on human tumor cells. *J Inorg Biochem.* 2018;188:102-112. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.04.006

17. Ullah H., Previtali V., Mihigo H.B., Twamley B., Rauf M.K., Javed F., Waseem A., Baker R.J., Rozas I. Structure-activity relationships of new Organotin(IV) anticancer agents and their cytotoxicity profile on HL-60, MCF-7 and HeLa human cancer cell lines. *Eur J Med Chem.* 2019;181:111544. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.07.047

18. Attanzio A., D'Agostino S., Busà R., Frazzitta A., Rubino S., Girasolo M.A., Sabatino P., Tesoriere L. Cytotoxic Activity of Organotin(IV) Derivatives with Triazolopyrimidine Containing Exocyclic Oxygen Atoms. *Molecules.* 2020;25(4):E859. doi: 10.3390/molecules25040859

19. Höti N, Zhu D. E., Song Z., Wu Z., Tabassum S., Wu M. p53-dependent apoptotic mechanism of a new designer bimetallic compound tri-phenyl tin benzimidazolethiol copper chloride (TPT-CuCl<sub>2</sub>): in vivo studies in Wistar rats as well as in vitro studies in human cervical cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(1):22-33. doi: 10.1124/jpet.104.069104

20. Li Y. L., Wang Z. W., Guo P., Tang L., Ge R., Ban S. R., Chai Q. Y., Niu L, Li Q. S. Diorganotin(IV) derivatives of substituted N-hydroxybenzamides with selective cytotoxicity in vitro and potent antitumor activity in vivo. *J Inorg Biochem.* 2014;133:1-7. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.12.002

21. Alama A., Tasso B., Novelli F., Sparatore F. Organometallic compounds in oncology: Implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discov. Today.* 2009;14:500–508. doi:10.1016/j.drudis.2009.02.002

22. Zhang Y. Y., Zhang R. F., Zhang S. L., Cheng S., Li Q. L., Ma C. L. Syntheses, structures and anti-tumor activity of four new organotin(IV) carboxylates based on 2-thienylselenoacetic acid. *Dalton Trans.* 2016;45:8412–8421. doi:10.1039/cdt00532b

23. Mukhatova E. M., Osipova V. P., Kolyada M. N., Movchan N. O., Shpakovsky D. B., Gracheva Yu. A., Orlova S. I., Milaeva E. R. Synthesis and antioxidant activity of new organotin compounds excites the 2,6-di-tert-butylphenol fragment. *Doklady Akademii nauk*. 2013;451(1):46-49 (In Russ). doi:10.7868/S0869565213190134
24. Jenkins R. O., Craig P. J., Francesconi K. A., Harrington C. F. Environmental and biological aspects of organometallic compounds. O' Hare ed. *Comprehensive Organometallic Chemistry III*. Oxford: Elsevier: 2006;11:603-661. doi: 10.1016/B0-08-045047-4/00178-3
25. Shpakovsky D.B., Banti C.N., Mukhatova E.M., Gracheva Yu.A., Osipova V.P., Berberova N. T., Albov D. V., Antonenko T. A., Aslanov L. A., Milaeva E. R., Hadjikakou S. K. Synthesis, antiradical activity and in vitro cytotoxicity of novel organotin complexes based on 2,6-di-tert-butyl-4-mercaptophenol. *Dalton Trans*. 2014;43(18):6880-6890. doi: 10.1039/C3DT53469C
26. Milaeva E. R., Tyurin V. Y., Gracheva Y. A., Dodochova M. A., Pustovalova L. M., Chernyshev V. N. Protective Effect of Meso-Tetrakis-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)porphyrin on the In Vivo Impact of Trimethyltin Chloride on the Antioxidative Defense System. *Bioinorg Chem Appl*. 2006;2006:64927. doi:10.1155/BCA/2006/64927
27. Tursunova N. V., Klinnikova M. G., Lushnikova E. V. Molecular mechanisms of correction of cardiotoxic effects of anthracyclins by cardioprotectors. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2020;(4):160. (In Russ).
28. OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity -Fixed Dose Procedure No. 420. OECD Publishing, Paris, 2001.
29. OECD, Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2008. <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>
30. Koptyaeva K., Muzhikyan A., Guschin Ya., Belyaeva E., Makarova M., Makarov V. Technique of dissection and extracting organs of laboratory animals. Message 1 (rats). *Laboratory Animals for Science*. 2018;2:71-92. (In Russ). doi:10.29926/2618723X-2018-02-08
31. Volkova M., Russell R. 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev*. 2011;7(4):214-20. doi: 10.2174/157340311799960645

УДК: 612.017.1-053.2/.6+616.899.3(470-924.71)

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-2-19-27

## ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ЗАДЕРЖКОЙ ПСИХИЧЕСКОГО И ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

Евстафьева Е. В., Залата О. А., Слюсаренко А. Е.

Кафедра физиологии нормальной, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Слюсаренко Александра Евгеньевна, доцент кафедры физиологии нормальной, Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: alexandra\_sls@mail.ru

For correspondence: Slusarenko A.E., PhD, Department of Normal Physiology, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: alexandra\_sls@mail.ru

### Information about authors:

Evstafeva E. V., <https://orcid.org/0000-0002-8331-4149>

Zalata O. A., <http://orcid.org/0000-0003-0440-2405>

Slusarenko A. E., <https://orcid.org/0000-0002-2045-7548>

### РЕЗЮМЕ

Целью настоящего исследования явилось определение особенностей элементного статуса детей 1-3 лет с задержкой психического и физического развития, для чего у 36-ти детей от 1 года до 3-х лет, воспитанников Крымского республиканского учреждения «Дом ребенка «Ёлочка» с задержкой психического и физического развития методом рентгено-флуоресцентной спектроскопии определено содержание химических элементов (Ca, Cu, Fe, K, Zn, Mn, S, Br, Se, Co, Cr, Cl, Ni, Mo, Sr, As, Hg, Pb) в волосах. Установлено, что у обследованных детей имело место превышение калия, хлора, никеля, хрома, марганца, кальция на фоне тотального дефицита цинка и меди, частично железа при нормальном содержании токсичных элементов. Гиперэлементоз калия, хлора, никеля, хрома, марганца, кальция в соответствии с результатами настоящего исследования и данными литературы может являться характерной особенностью элементного статуса при нервных расстройствах.

**Ключевые слова:** дети, задержка умственного и физического развития, химические элементы, волосы.

## FEATURES OF THE ELEMENT STATUS OF EARLY AGE CHILDREN WITH MENTAL AND PHYSICAL RETARDATION

Evstafeva E. V., Zalata O. A., Slusarenko A. E.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

The aim of the research was a determination of the element's status features in children 1-3th age with mental and physical retardation. In 36th children from 1-3th age with mental and physical retardation the content of (Ca, Cu, Fe, K, Zn, Mn, S, Br, Se, Co, Cr, Cl, Ni, Mo, Sr, As, Hg, Pb) in hair was determined by a method of X-ray fluorescent spectroscopy. Hair chemical elements content was determined in 1-3-year-old children with mental and physical developmental delay suggesting some specific changes of elemental status. It is established that the examined children had the excess of potassium, chlorine, nickel, chromium, manganese, calcium, on the background of total deficit of zinc, copper, partially of iron and normal content of toxic elements. Excess of potassium, chlorine, nickel, chromium, manganese, calcium in accordance with this research and literature data may be a specific feature of element status at nervous disorders. However, individual assessment of the «element portrait» at diseases of the nervous system in children of early age is important to improve a treatment and rehabilitation. Comparison of the revealed features with previously collected data of healthy children and literature indicates that zinc and copper deficiency is not specific for the children with mental and physical developmental delay but is rather more significant.

**Key words:** children, mental and physical retardation, chemical elements, hair.

Нейротоксическое действие многих распространенных загрязнителей окружающей среды [1], особенно в период внутриутробного развития [2], существенным образом сказывается как на общем состоянии детского здоровья, так и на состоянии нервной системы развивающегося организма, особенно высших психических функций. Широкое распространение в послед-

ние годы ряда заболеваний психической сферы у детей (задержка развития, аутизм, синдром дефицита внимания и гиперактивности) приобретает эпидемический характер, что связывают, в том числе, с действием токсичных тяжелых металлов [3; 4], круговорот которых в окружающей среде увеличился по сравнению с природным в несколько раз. При этом считают, что изменения

психической сферы могут быть обусловлены не только увеличением концентраций отдельных химических элементов в окружающей среде, но и в целом нарушением элементного баланса в организме, поддержание которого необходимо для нормальной деятельности мозга [5; 6]. Это связано с тем, что в разные периоды роста и развития ребенка имеют место физиологически обусловленные изменения в содержании макро- и микроэлементов как клеточных регуляторов, модуляторов, мессенджеров, необходимых для нормального функционирования тканей, органов и систем организма [7]. Известно, что изменение металло-лигандного гомеостаза и его комплексов в структурах нервной системы начинает формироваться уже в перинатальном периоде. Это, безусловно, влияет на перинатальное состояние нервной системы, а затем на функциональный статус отдельных структур головного мозга [8].

С другой стороны, элементный дисбаланс может являться как фактором риска в развитии заболеваний, так и их следствием [9; 10]. В этом случае его оценка и коррекция будут способствовать уменьшению выраженности негативных проявлений расстройств психической сферы.

В связи с вышеизложенным, оценка содержания химических элементов, известных своим нейротропным действием, как возможного фактора, влияющего на формирование психической сферы у наиболее уязвимой при экологическом неблагополучии категории населения – детей на ранних стадиях онтогенетического развития, является актуальной задачей. Особенно важно в этом отношении исследование особенностей элементного статуса у детей с задержкой психического и физического развития, что и послужило целью настоящей работы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С соблюдением биоэтических норм была обследована группа детей с задержкой психического и физического развития, воспитанников Крымского республиканского учреждения «Дом ребенка «Ёлочка». В когорту вошли 36 человек (27 мальчиков и 9 девочек) от 1 года до 3-х лет (средний возраст  $2,9 \pm 0,8$ ). Диагностическая квалификация нарушений психического развития детей осуществлялась детскими психиатрами на основе клинико-психопатологического анализа и включила следующие нозологические формы: органические эмоционально-лабильные расстройства (F06.65); расстройства психического развития (F88); гиперкинетические расстройства (F90); специфические расстройства речи (F80); задержка роста и развития. Наруше-

ния в развитии большинства обследованных детей были связаны с неблагоприятным семейным анамнезом, часть детей имела статус сироты. У 5-ти из 36-ти обследованных детей имели место перинатальные поражения ЦНС (спастический тетрапарез, вторичная эпилепсия, синдром ликворо-сосудистой дистензии).

Содержание химических элементов в волосах детей определяли методом рентген-флуоресцентной спектроскопии на приборе ElvaX (измерение по методике №12-4502). Методика отбора проб выполнялась в соответствии с рекомендациями МАГАТЭ (1980) [11]. Образцы волос с соблюдением всех биоэтических положений получали путем состригания с 3-5 мест на затылочной части головы, ближе к шее, в количестве не менее 3 г, помещали в специальные пакеты с идентификационными записями. Отклонения индивидуального и группового элементного профиля волос обследуемых детей от нормы отмечали, ориентируясь на принятые референтные значения содержания химических элементов в волосах [12]. На обследование каждого воспитанника детского дома получили письменное согласие администрации (Договор о сотрудничестве от 05.11.2012).

Проверка характера распределения химических элементов в волосах детей по критерию Колмогорова-Смирнова и Лиллифорс показала, что содержание в волосах части из них (Ca, Cu, Fe, S, Br, Cl, Ni, Mo, Sr, As, Hg) не подчинялось закону нормального распределения. Распределение K, Zn, Mn, Se, Co, Cr, Pb приближалось к нормальному. При проведении статистического анализа использовали непараметрические методы описательной статистики; все численные показатели представлены в виде медиан и значений интерквартильного размаха (Me [p25; p75]). Взаимосвязь между содержанием химических элементов устанавливали посредством непараметрического корреляционного анализа по Спирмену (rs). При оценке результатов статистически достоверным принимали уровень значимости  $p \leq 0,05$ . Статистический анализ данных проводили при помощи программы Statistica 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая возможные различия в элементном статусе детей в зависимости от возможных причин нарушений развития, первоначально его анализ выполнили дифференцированно для детей с перинатальным поражением ЦНС и для детей с неблагополучным семейным анамнезом (табл. 1, табл. 2).

У детей с перинатальным поражением ЦНС выявлен значительный элементный дисбаланс, который выражался в увеличении содержания

Таблица 1  
Содержание химических элементов (мкг/г) в волосах детей с перинатальным поражением ЦНС (n=5)

Биоэлемент	M±SD	Me	p25	p75	Условная норма
Эссенциальные элементы					
Ca	967,11 ± 702,83	661,83	48,43	1373,57	300,0-700,0
K		378,63	0	795,76	70,0-170,0
Zn		82,76	46,74	82,91	120,0-200,0
Cu	10,12 ± 4,21	10,13	9,46	11,55	9,0-30,0
Fe	48,55 ± 19,42	54,56	33,45	64,72	15,0-35,0
Se		0,55	0,52	1,32	0,3-1,2
Mn		1,15	1,14	4,46	0,5-2,0
Cr		17,86	14,0	18,1	0,5-5,0
Условно-эссенциальные элементы					
S		32266,7	244,68	46679,2	21000,0-49000,0
Br	10,23 ± 19,64	5,09	4,22	13,20	2,0-12,0
Cl		2429,4	1445,0	8802,12	60,0-560,0
Co		1,60	0,75	3,06	0,0-2,0
Ni	14,07 ± 6,56	15,46	11,1	18,03	0,0-3,5
Mo	0,40 ± 0,55	0,0	0,0	0,88	0,0-3,0
Sr	1,16 ± 1,13	0,99	0,18	2,1	0,0-3,0
Токсичные элементы					
Pb		6,54	1,9	7,4	0,0-5,0
As	2,48 ± 3,55	1,26	0,32	2,19	0,0-2,0
Hg	0,56 ± 0,69	0,33	0,13	0,62	0,0-2,0
Cd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0-1,0

Примечание: здесь и далее среднее и среднеквадратичное отклонение для K, Zn, Mn, Se, Co, Cr, Pb не представлены в связи с распределением, отличающимся от нормального.

Ca, K, Fe, Mn, Br, Cl, Co, Ni, As, Pb и у значительной части обследованных – Cr, Se. В то же время наблюдали выраженный дефицит Zn и недостаток у большинства обследованных содержания Cu.

Элементный статус детей с приобретенной вследствие семейного неблагополучия задержкой психического и физического развития имел некоторые отличительные особенности, но в большей степени был сходен с детьми с перинатальным поражением нервной системы. Так, у них также было увеличено содержание K, Mn, Cr, Cl и Ni, наблюдался дефицит Zn и Cu, в то время как содержание Ca, Fe, Pb, As и Se находилось в нормальных пределах (табл. 2).

Таким образом, у детей с перинатальным поражением ЦНС содержание 9-ти элементов из 19-ти имели отклонения от нормы, в то время как дети с задержками развития по причине не-

благополучного семейного анамнеза характеризовались менее выраженным дисбалансом, так как у них 6 элементов из 19 имели отклонения от нормы. Наиболее существенной отличительной особенностью являлся гиперэлементоз токсичных Pb, As, а также значительно более выраженное отклонение от нормы Ni, Cl и Cr у детей с перинатальным поражением ЦНС.

Половые различия в элементном статусе в связи с достаточным количеством обследованных оценивали только в группе с неблагоприятным семейным анамнезом. Так, и у девочек, и у мальчиков было увеличено содержание K, Mn, Cr, Cl и Ni, а в отношении Zn и Cu наблюдался дефицит. Иными словами, качественных и существенных количественных различий в элементном статусе не отмечалось, за исключением содержания K у мальчиков, которое было достоверно выше, чем у девочек (p=0,02).

Таблица 2

Содержание химических элементов (мкг/г) в волосах детей с неблагополучным семейным анамнезом (n=31)

Биоэлемент	M±SD	Me	p25	p75	Условная норма
Эссенциальные элементы					
Ca	594,96 ± 182,55	574,67	441,46	684,44	300,0-700,0
K		509,93	329,27	730,28	70,0-170,0
Zn		33,15	20,04	43,45	120,0-200,0
Cu	4,77 ± 1,56	4,91	3,46	5,56	9,0-30,0
Fe	21,96 ± 16,47	19,39	15,59	24,45	15,0-35,0
Se		0,39	0,25	0,59	0,3-1,2
Mn		2,19	0,83	3,59	0,5-2,0
Cr		6,37	2,75	10,18	0,5-5,0
Условно-эссенциальные элементы					
S		24308,6	19874,9	34598,8	21000,0-49000,0
Br	7,56 ± 3,73	7,16	4,99	9,27	2,0-12,0
Cl		1178,11	924,40	1722,34	60,0-560,0
Co		1,77	1,23	2,53	0,0-2,0
Ni	5,66 ± 2,43	5,38	3,84	6,43	0,0-3,5
Mo	0,47 ± 0,75	0,0	0,0	0,90	0,0-3,0
Sr	0,58 ± 0,36	0,54	0,40	0,88	0,0-3,0
Токсичные элементы					
Pb		3,34	2,31	4,14	0,0-5,0
As	0,50 ± 0,93	0,09	0,0	0,44	0,0-2,0
Hg	0,81 ± 0,71	0,63	0,33	1,05	0,0-2,0
Cd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0-1,0

Примечание: Me – медиана, p25, p75 – перцентили.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что биомониторинговое исследование содержания исследуемых элементов в волосах детей раннего возраста с задержкой психического и физического развития, проживающих в условиях дома ребенка, выявило определенный элементный дисбаланс, который имел как общие, так и отличительные особенности у детей с перинатальными и постнатальными формами задержки психического и физического развития. Общим для всех обследованных детей было превышение референтных уровней для калия, хлора, никеля, хрома, марганца и дефицит цинка и меди (рис. 1). Качественные особенности первых заключались в гиперэлементозе таких токсичных элементов как свинец и мышьяк, а также железа и незначительном увеличении селена; количественные – в более выраженном отклонении от верхней границы нормы Ni, Cl и Cr. В то же время дефицит эссенциальных цинка и меди

у детей с перинатальным поражением нервной системы были менее выражены. В пробах волос не были обнаружены йод, серебро, рубидий, барий, кадмий, сурьма, цирконий, олово, бериллий. Наличие ванадия в волосах было найдено у 1 ребенка, титана – у 4-х, молибдена у 13 детей из группы.

Для ответа на вопрос, какие из выявленных особенностей элементного статуса детей с задержкой психического и физического развития могут быть связаны с данными нарушениями, необходимо сравнение с элементным статусом здоровых детей. В архивных материалах кафедры имелись данные по биомониторинговому исследованию содержания 5 химических элементов в волосах здоровых детей до 6 лет, также проживающих в г. Симферополь [13]. Они свидетельствовали о тотальном дефиците цинка и меди (табл. 3). Таким образом, содержание данных элементов характеризовалось сходным

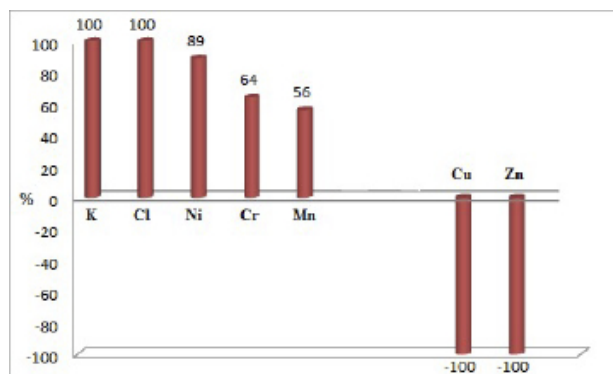


Рис. 1. Амплитуда отклонений (в %) содержания химических элементов от верхних и нижних границ условной нормы в волосах детей

В то же время другие авторы наблюдали отсутствие различий или незначительные отличия в содержании этих элементов у детей и молодых людей, страдающих различными нервными расстройствами, такими как повышенная возбудимость, потеря сознания, эпилептоформные

образом в обеих группах детей и вряд ли можно полагать, что дефицит цинка и меди – это специфическая особенность элементного статуса детей с задержкой развития, тем более, что дефицит этих элементов – весьма распространенное явление в настоящее время на европейской части Российской Федерации [14].

В то же время содержание ртути, свинца и кадмия в волосах здоровых детей данного возраста находилось в пределах условной нормы, как и в других возрастных группах. Однако статистический анализ групповых различий показал достоверную разницу в степени этого дефицита: у детей с задержкой психического и физического развития (1-3 года) содержание цинка и меди было значимо ниже ( $p=0,000$ , U-критерий), чем у практически здоровых детей, жителей Симферополя. Имеются данные, которые свидетельствуют о том, что между уровнем цинка и патогенезом аутизма существует обратная связь и его восполнение может быть использовано в терапии больных аутизмом [15].

Таблица 3

Содержание химических элементов (мкг/г) в волосах здоровых детей 1-6 лет

Биоэлемент	M±SD	Me	p25	p75	Условная норма
Эссенциальные элементы					
Zn	88,39±39,93	95,6	52,35	110,29	120,0-200,0
Cu	11,18±7,49	8,49	6,95	12,23	9,0-30,0
Токсичные элементы					
Pb	3,65±2,5	3,2	1,65	5,08	0,0-5,0
Hg	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0-2,0
Cd	0,65±0,54	0,49	0,25	1,16	0,0-3,5

Примечание: Me – медиана, p25, p75 – перцентили.

конвульсии неизвестного происхождения [16]. Однако в этих исследованиях, проводимых на территории Польши, не отмечался столь выраженный дефицит цинка, а содержание меди также было пониженным.

Что касается содержания свинца в волосах детей 0-5 лет здоровых и с нервными расстройствами, по данным этих же авторов установлено, что среднее значение содержания свинца было несколько ниже у здоровых детей ( $3,8±3,5$  мкг/г), чем у страдающих нервными расстройствами ( $4,4±3,6$  мкг/г) [16].

В то же время, выявленное в настоящем и ранее выполненных исследованиях превышение содержания ряда элементов в волосах детей с задержкой психического и физического развития, дает основание предполагать, что гиперэлементоз может быть характерным признаком при нервных расстройствах различного рода. Так, у

детей 12-13 лет с нарушениями психического развития также была установлена тенденция к гиперэлементозу кальция и никеля [17]. Однако приблизительно такое же увеличение содержания никеля в волосах здоровых детей 1-3 лет г. Новотроицка на фоне пониженного содержания цинка в 1,74 раза, олова - в 3 раза и железа - в 1,4 раза наблюдали у клинически здоровых детей Оренбургской области [18].

К подобным неоднозначным заключениям можно прийти и в отношении некоторых других элементов на основании анализа данных литературы. Так, обзор научных исследований за период с 2000 по 2012 гг. дал основание утверждать, что среди таких элементов, как мышьяк, кадмий и марганец только в отношении марганца существует явное доказательство существования связи с таким расстройством, как дефицит внимания и гиперактивность [6, 19],

в то время как увеличение уровня мышьяка и кадмия, в отношении которых предполагались такие же эффекты, сопровождается некоторым снижением IQ [6].

Выявленный избыток содержания эссенциального макроэлемента калия у всех детей группы представляется важным для обсуждения, поскольку это основной внутриклеточный катион, играющий важную роль в формировании электрической активности мозга. В клинике отклонения в содержании калия в основном оценивают по его концентрациям в сыворотке крови. Наиболее часто это связано с эндокринной патологией коры надпочечников и нарушением в секреции альдостерона. В то же время известно, что повышенное содержание калия в волосах может означать его избыточное накопление в организме [12]. При этом в литературе крайне мало обсуждаются часто выявляемые отклонения в содержании калия у детей. Так, при изучении особенностей элементного статуса детей 1-6 лет из различных регионов России, был установлен избыток калия [20], а при оценке элементного статуса здоровых детей 8-9 лет, проживающих в условиях городской среды (Оренбург) и сельской местности (Оренбургская область), было обнаружено, что избыток калия в волосах чаще встречается у сельских детей [21]. В другой работе [22] у детей 7-14 лет г. Магадана, авторы, наряду с дефицитом ряда элементов (Ca, Mg, Co, Se, Mn, I, Cr, Cu, Zn), обнаружили и дефицит калия. Можно полагать, что такие различия, прежде всего, могут быть связаны с биогеохимическими особенностями регионов, однако отсутствие данных по содержанию калия в волосах здоровых детей данного возраста в Крыму не позволяет сделать окончательного заключения. Повышенное содержание калия наблюдали у крымских детей-спортсменов других возрастных групп [23], однако гиперэлементоз в этом случае мог быть обусловлен интенсификацией обменных процессов и выведения калия в результате систематических физических нагрузок.

Касательно хлора, превышение которого в волосах установлено в настоящем исследовании, представляют интерес данные об его угнетающем рост эффекте [12], в то время как относительно его влияния на нервную систему известно только токсическое действие в высоких дозах [24]. Повышенное содержание хлора в волосах мальчиков, но не девочек, в Алтайском крае наблюдали Зорина Д.Ю. и соавторы [25]. В то же время вполне ожидаема некоторая специфика элементного статуса в отношении и этого элемента при разных нервных расстройствах, тем более, врожденного характера.

Еще более существенный суммарный эффект способен оказывать дисбаланс элементов [19; 26], что обусловлено существующими отношениями между некоторыми из них, их синергизмом или антагонизмом. Известно, например, что никель способствует всасыванию железа в пищеварительном тракте, будучи кофактором неидентифицированного биолиганда, связывающего железо, или, участвуя в ферментном механизме, превращающем  $Fe^{2+}$  в легкоусвояемое  $Fe^{3+}$ . При дефиците никеля повышается выделение из организма железа и кальция [27].

Качественный и количественный анализ соотношения элементов показал, что у 30,5% обследованных нами детей с задержкой психического и физического развития обнаруживалась следующая комбинация отклонений от нормы: дефицит цинка и меди с одной стороны и избыток калия, хлора, марганца, хрома, никеля – с другой. Выполненный корреляционный анализ концентраций элементов в волосах обследованных нами детей подтвердил наличие между некоторыми из них существенной корреляционной связи (табл. 4). Единственным элементом, не обнаружившим подобных взаимосвязей, был марганец.

Таким образом, выполненное исследование по определению ряда токсичных и эссенциальных элементов у детей с задержкой психического и физического развития дает основание говорить о некоторых особенностях элементного статуса организма, однако рассматривать их как специфические характеристики элементного статуса у детей раннего возраста при данных нарушениях развития вряд ли есть достаточно оснований. В то же время обнаруживаются некоторые характерные особенности в виде увеличенного содержания токсичных свинца и мышьяка у детей с перинатальным поражением ЦНС, а также более выраженные отклонения от нормы по сравнению с детьми с приобретенными формами задержки развития и, тем более, здоровыми, детьми. Более того, не столько отклонения от нормы отдельных элементов, сколько их определенное соотношение – дисбаланс, может быть специфической характеристикой тех или иных расстройств, учитывать который может быть полезным при их коррекции.

## ВЫВОДЫ

1. Определение содержания химических элементов в волосах у детей с задержкой психического и физического развития 1-3 лет выявило общие и специфические особенности элементного статуса.

2. У детей с перинатальным поражением центральной нервной системы и приобретен-



Таблица 4

Коэффициенты корреляции Спирмена (rs) между содержанием элементов в волосах детей раннего возраста с задержкой психического и физического развития

	Zn	Ca	Cr	Ni	Cu	K	Cl	Pb	Fe	Br	Sr	As
Zn	1	.50	.66	.46	.68	.42			.39	.37	.35	.43
Ca	.50	1	.54	.61	.44	.37			.43	.35	.35	
Cr	.66	.54	1	.52	.77				.65	.43	.39	.42
Ni	.46	.61	.52	1	.48		.44	.52	.73			
Cu	.68	.44	.77	.48	1				.57	.33		.61
K	.42	.37				1				.37	.44	
Cl				.44			1	.37	.41			
Pb				.52			.37	1				-.35
Fe	.39	.43	.65	.73	.57		.41		1			
Br	.37	.35	.43		.33	.37				1		
Sr	.35	.35	.39			.44					1	
As	.43		.42		.61			-.35				1

Примечание: для всех установленных взаимосвязей  $p \leq 0,05$ .

ными в постнатальном периоде формами нарушений общей особенностью элементного статуса явился гиперэлементоз калия, никеля, хлора, хрома, марганца, отличительной особенностью – гиперэлементоз свинца, мышьяка и кальция, а также более выраженные отклонения от нормы других элементов.

3. Сравнительный анализ выявленных особенностей элементного статуса с данными литературы и ранее полученными данными обследования здоровых детей позволяет утверждать, что дефицит цинка и меди не является специфической характеристикой элементного статуса детей с задержкой психического и физического развития, но имеет более выраженный характер.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ferguson A., Solo-Gabriele H. Children's Exposure to Environmental Contaminants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016;13 (11):1117. doi:10.3390/ijerph13111117.
2. Bellinger D.C., Matthews-Bellinger J.A., Bellinger K.K. et al. A developmental perspective on early-life exposure to neurotoxicants. *Environment International* 94. 2016;103–112.
3. Fujiwara T., Morisaki N., Honda Y. Chemicals? Nutrition? And Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Neuroscience*. 2016;10:174. doi:10.3389/fnins.2016.00174.

4. Viktorinova A., Ursinyova M., Trebaticka J. Changed Plasma Levels of Zinc and Copper to Zinc Ratio and Their Possible Associations with Parent- and Teacher-Rated Symptoms in Children with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Received. *Biological Trace Element Research*. 2016;169(1):1-7.

5. Lakshmi Priya M. D., Geetha A. Level of trace elements (copper, zinc, magnesium and selenium) and toxic elements (lead and mercury) in the hair and nail of children with autism. *Biol Trace Elem. Res*. 2011;142(2):148-58. doi:10.1007/s12011-010-8766-2.

6. Rodriguez-Barranco M., Lacasana M., Aguilar-Garduno C. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioral disorders in children: a systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ*. 2013;454-455:562-77. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.047.

7. Громова О. А. Научный обзор. *Международный неврологический журнал*. 2007;12:94-107.

8. Кудрин А. В., Громова О. А. Микроэлементы в неврологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.

9. Бедненко Л. П., Левченко И. Л. Особенности элементного статуса у детей с неврологической патологией, перенесших внутриутробные инфекции. Доступно по: [www.infmed.kharkov.ua/PubBed1htm](http://www.infmed.kharkov.ua/PubBed1htm).

10. Man C. K., Zheng Y. H. Analysis of trace elements in scalp hair of mentally retarded children. *Journal of Radioanalytical and Nuclear chemistry*. 2002;253(3):375-377.

11. Element analysis of biological materials. Current problems and with special reference to trace elements. Appendix II. Technical reports series. 1980;197:351-367.
12. Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементы в медицине М.: ОНИКС 21 век. Мир; 2004.
13. Слюсаренко А. Е. Иммуотропная роль тяжелых металлов в организме человека. Saarbrücken: LAP Lambert, 2016.
14. Агаджанян Н. А., Скальный А. В., Детков В. Ю. Элементный портрет человека: заболеваемость, демография и проблема управления здоровьем нации. Экология человека. 2013;11:3-12.
15. Babaknejad N., Sayehmiri F., Sayehmiri K. The Relationship between Zinc Levels and Autism: Systematic Review and Meta-analysis. Iran J Child Neurol. Autumn 2016;10(4):1-9.
16. Lech T. Lead, copper, zinc, and magnesium content in hair of children and young people with some neurological diseases. Biol. Trace Elem. Res. 2002;85(2):111-26. doi:10.1385/bter:85:2:111.
17. Залата О. А., Евстафьева Е. В. Особенности когнитивных функций городских детей с нарушениями психического развития в связи с содержанием химических элементов в волосах. Саратовский научно-медицинский журнал. 2012;8(2):428-432.
18. Сетко А. Г., Сетко Н. П. Дисбаланс микроэлементов, как критерий донозологической диагностики состояния здоровья детей. Вестник ОГУ. 2006;12:222-224.
19. Sanders A. P., Henn B. C., Robert O. Wright Perinatal and Childhood Exposure to Cadmium, Manganese, and Metal Mixtures and Effects on Cognition and Behavior: A Review of Recent Literature Curr. Envir. Health Rep. 2015; 2(3):284-294.
20. Лобанова Ю. Н. Особенности элементного статуса детей из различных регионов России. Автореф... дис. канд. биол. наук. Москва; 2007.
21. Бурцева Т. И., Нотова С. В., Фролова О. О., Бурлуцкая О. И., Скальная М. Г. Элементный статус детей как отражение эколого-геохимических особенностей территории Оренбургского региона. Микроэлементы в медицине. 2010;(3-4):49-54.
22. Луговая Е. А., Атласова Е. М., Максимов А. Л. Элементный «портрет» детей 7–14 лет г. Магадана. Фундаментальные исследования. 2012;11-4: 846-850.
23. Евстафьева И. А., Перекотий Е. В., Решетняк О. А. Особенности макро- микроэлементного баланса у спортсменов в условиях антропогенного загрязнения окружающей среды. Сборник материалов VIII биогеохимической школы «Биогеохимия и биохимия микроэлементов в условиях техногенеза биосферы». Гродно, Беларусь. 2013;232-236.
24. Kilburn K. N. Chlorine-induced damage documented by neurophysiological, neuropsychological, and pulmonary testing. Arch Environ Health. 2000; Jan-Feb;55(1):31-7. doi:10.1080/00039890009603382
25. Зорина Д. Ю., Козырева М. С., Горяйнова З. И., Дмитриев А. Ю. Нейтронный активационный анализ волос детей Онгудайского района республики Алтай. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012.
26. Forte G., Alimonti A., Violante N. Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. J Trace Elem Med Biol. 2005;19(2-3):195-201. doi:10.1016/j.jtemb.2005.08.003
27. Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л. С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина; 1991.

## REFERENCES

1. Ferguson A., Solo-Gabriele H. Children's Exposure to Environmental Contaminants. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2016;13(11):1117. doi:10.3390/ijerph13111117.
2. Bellinger D. C., Matthews-Bellinger J. A., Bellinger K. K. A developmental perspective on early-life exposure to neurotoxicants. Environment International 94. 2016;103–112.
3. Fujiwara T., Morisaki N., Honda Y. Chemicals? Nutrition? And Autism Spectrum Disorder. Frontiers in Neuroscience. 2016;10:174. doi: 10.3389/fnins.2016.00174.
4. Viktorinova A., Ursinyova M., Trebaticka J. Changed Plasma Levels of Zinc and Copper to Zinc Ratio and Their Possible Associations with Parent- and Teacher-Rated Symptoms in Children with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Received. Biological Trace Element Research. 2016;169(1):1-7.
5. Lakshmi Priya M. D., Geetha A. Level of trace elements (copper, zinc, magnesium and selenium) and toxic elements (lead and mercury) in the hair and nail of children with autism. Biol Trace Elem. Res. 2011;142(2):148-58. doi:10.1007/s12011-010-8766-2.
6. Rodriguez-Barranco M., Lacasana M., Aguilar-Garduno C. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioral disorders in children: a systematic review and meta-analysis. Sci Total Environ. 2013;454-455:562-77. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.047.

7. Gromova O. A. The scientific review. *International neurological journal*. 2007;12:94-107. (In Russ.).
8. Kudrin A. V., Gromova O. A. *Microelements in neurology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. (In Russ.).
9. Bednenko L. P., Levchenko I. L. Features of the element status in children with neurological disorders undergoing intrauterine infection. Available at: [www.infmed.kharkov.ua/PubBed1.htm](http://www.infmed.kharkov.ua/PubBed1.htm). (In Russ.).
10. Man C. K., Zheng Y.H. Analysis of trace elements in scalp hair of mentally retarded children. *Journal of Radioanalytical and Nuclear chemistry*. 2002;253(3):375-377.
11. Element analysis of biological materials. Current problems and with special reference to trace elements. Appendix II. Technical reports series. 1980;197:351-367.
12. Skal'nyj A.V., Rudakov I. A. *The bioelements in medicine*, Moscow: ONIKS 21 Vek. World. 2004. (In Russ.).
13. Slijusarenko A. E. *Immunotropic role of heavy metals in the human body*. Saarbrücken: LAP Lambert, 2016. (In Russ.).
14. Agadzhanjan N. A., Skal'nyj A. V., Detkov V. Ju. Elemental portrait: incidence, demography and the problem of managing the health of the nation. *Human ecology*. 2013; 11: 3-12. (In Russ.).
15. Babaknejad N., Sayehmiri F., Sayehmiri K. The Relationship between Zinc Levels and Autism: Systematic Review and Meta-analysis. *Iran J Child Neurol*. Autumn 2016; 10(4):1-9.
16. Lech T. Lead, copper, zinc, and magnesium content in hair of children and young people with some neurological diseases. *Biol. Trace Elem. Res*. 2002; 85(2): 111-26. doi:10.1385/bter:85:2:111.
17. Zalata O. A., Evstaf'eva E. V. Peculiarities of cognitive functions in urban children with disorders of mental development in connection with the content of chemical elements in hair. *Saratov scientific medical journal*. 2012;8(2):428-432. (In Russ.).
18. Setko A. G., Setko N. P. Imbalance of microelements, as a criterion for donor diagnosis of children's health. *Bulletin of OGU*. 2006;12:222-224. (In Russ.).
19. Sanders A. P., Henn B. C., Robert O. Wright Perinatal and Childhood Exposure to Cadmium, Manganese, and Metal Mixtures and Effects on Cognition and Behavior: A Review of Recent Literature *Curr. Envir. Health Rep*. 2015;2(3):284-294.
20. Lobanova Ju. N. Elemental status of children from different regions of Russia. Autoref ... dis. Cand. Biol. Sciences. Moscow; 2007. (In Russ.).
21. Burceva T. I., Notova S. V., Frolova O. O., Burluckaja O. I., Skal'naja M. G. Elemental status of children as a reflection of ecological and geochemical features of the territory of the Orenburg region. *Microelements in medicine*. 2010;(3-4):49-54. (In Russ.).
22. Lugovaja E. A., Atlasova E. M., Maksimov A. L. Elemental «portrait» of children aged 7-14 in the city of Magadan. *Fundamental research*. 2012;11-4:846-850. (In Russ.).
23. Evstaf'eva I. A., Perekotij E. V., Reshetnjak O. A. Features of macro-microelement balance in athletes in anthropogenic pollution of the environment. Collection of materials of the VIII biogeochemical school «Biogeochemistry and biochemistry of microelements in conditions of technogenesis of the biosphere». Grodno, Belarus. 2013;232-236. (In Russ.).
24. Kilburn K. N. Chlorine-induced damage documented by neurophysiological, neuropsychological, and pulmonary testing. *Arch Environ Health*. 2000; Jan-Feb; 55(1):31-7. doi:10.1080/00039890009603382
25. Zorina D. Ju., Kozyreva M. S., Gorjajnova Z. I., Dmitriev A. Ju. Neutron activation analysis of hair of children Ongudaysky district of the Altai Republic. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2012; 16. (In Russ.).
26. Forte G., Alimonti A., Violante N. Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;19(2-3):195-201. doi:10.1016/j.jtomb.2005.08.003
27. Avcyn A. P., Zhavoronkov A. A., Rish M. A., Strochkova L. S. The microelementoses of human. 1991; M.: Medicine, 496. (In Russ.).

## КОНЦЕНТРАЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ

Игнатенко Т. С.<sup>1</sup>, Майлян Э. А.<sup>1</sup>, Капанадзе Г. Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» МЗ ДНР, 283003, пр. Ильича, 16, Донецк

<sup>2</sup>Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, 283045, Ленинский проспект, 47, Донецк

**Для корреспонденции:** Майлян Эдуард Апетнакович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и аллергологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, e-mail: mea095@yandex.ru

**For correspondence:** Maylyan Edward Apetnakovich, MD, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Allergology of Donetsk National Medical University named after M. Gorky, e-mail: mea095@yandex.ru

### Information about authors:

**Ignatenko T. S.**, <https://orcid.org/0000-0003-3611-1186>

**Maylyan E. A.**, <http://orcid.org/0000-0003-2845-7750>

**Kapanadze G. D.**, <https://orcid.org/0000-0002-1727-2809>

### РЕЗЮМЕ

Обследовано 147 женщин в возрасте 31–47 лет с аутоиммунным тиреоидитом. В контрольную группу вошли 63 условно здоровые женщины аналогичного возраста без заболеваний щитовидной железы. В сыворотке периферической крови с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрации фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкинов (IL) -1 $\beta$ , -6, -8, -17A, лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа- $\beta$  (RANKL) и остеопротегерина (OPG). Рассчитывали медиану, интерквартильный размах и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для сравнения двух независимых выборок применяли тест Манна-Уитни.

Аутоиммунное поражение ЩЖ характеризовалось достоверным ( $p < 0,001$ ) повышением уровней IL-1 $\beta$  и IL-6 на фоне тенденции к увеличению сывороточных концентраций IL-17A ( $p = 0,067$ ). В то же время значения TNF- $\alpha$  и IL-8 существенно не отличались от показателей контрольной группы ( $p = 0,166$  и  $p = 0,102$  соответственно). Также аутоиммунный тиреоидит у женщин сопровождался достоверным повышением концентраций RANKL ( $p = 0,029$ ), тогда как содержание OPG не изменялось ( $p = 0,988$ ). Кроме того, зарегистрировано закономерное снижение соотношения OPG/RANKL ( $p = 0,017$ ). Установлено наличие достоверных ( $p < 0,05$ ) положительных связей концентраций IL-6 с показателями TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-17A и RANKL, а также между значениями RANKL и IL-8. Помимо этого концентрации RANKL характеризовались прямой корреляцией с содержанием противовоспалительного медиатора OPG. Обращает внимание выявленная отрицательная корреляция между индексом OPG/RANKL и значениями IL-6.

Таким образом, аутоиммунный тиреоидит у женщин характеризуется достоверным повышением сывороточных уровней IL-1 $\beta$ , IL-6, RANKL и снижением индекса OPG/RANKL, тогда как показатели продукции IL-8, TNF- $\alpha$  и OPG существенно не изменяются. Для концентраций IL-6 установлена положительная корреляция со значениями TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-17 и отрицательная – с показателями соотношения OPG/RANKL. Значения RANKL имеют прямую связь с уровнями IL-6, IL-8 и OPG.

**Ключевые слова:** аутоиммунный тиреоидит; фактор некроза опухоли  $\alpha$ ; интерлейкины; RANKL; OPG.

### CONCENTRATIONS OF SEVERAL CYTOKINES IN BLOOD SERUM IN WOMEN WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS

Ignatenko T. S.<sup>1</sup>, Maylyan E. A.<sup>1</sup>, Kapanadze G. D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SEI HPE «M. Gorky Donetsk National Medical University» MH DPR, 283003, Ilyicha Ave., 16, Donetsk, Donetsk People's Republic

<sup>2</sup>Institute of Urgent and Reconstructive Surgery named after Gusak V.K., 283045, Leninsky Ave., 47, Donetsk, Donetsk People's Republic

### SUMMARY

147 women aged 31–47 years with autoimmune thyroiditis were examined. The control group included 63 apparently healthy women of the same age without thyroid disease. Using enzyme-linked immunosorbent assay, serum levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins (IL) -1 $\beta$ , -6, -8, -17A, receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were determined. The median, interquartile range and Spearman's rank correlation coefficient were calculated. The Mann-Whitney test was used to compare two independent samples.

Autoimmune damage of the thyroid gland was characterized by a significant ( $p < 0,001$ ) increase in the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 against the background of a trend towards an increase of serum IL-17A concentration ( $p = 0,067$ ). At the

same time, the values of TNF- $\alpha$  and IL-8 did not differ significantly from those of women in the control group ( $p=0,166$  and  $p=0,102$ , respectively). Also, autoimmune thyroiditis in women was accompanied by a significant increase of RANKL concentration ( $p=0,029$ ), while the OPG content remained at control levels ( $p=0,988$ ). A regular decrease in the OPG/RANKL ratio was also recorded ( $p=0,017$ ). The presence of a significant ( $p<0,05$ ) positive relationship of IL-6 concentrations with TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-17A and RANKL values, as well as between RANKL and IL-8 values was established. In addition, the concentration of RANKL was characterized by a direct correlation with the content of the anti-inflammatory mediator OPG. Attention is drawn to the revealed negative correlation between the OPG/RANKL index and IL-6 values.

Autoimmune thyroiditis in women is characterized by a significant increase of serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, RANKL and a decrease in the OPG/RANKL index, while the indices of IL-8, TNF- $\alpha$  and OPG production do not change significantly. For IL-6 concentrations, a positive correlation was established with the values of TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-17 and negative - with the OPG/RANKL ratio. RANKL values have a direct relationship with IL-6, IL-8 and OPG levels.

**Key words:** autoimmune thyroiditis; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; interleukins; RANKL; OPG.

В основе хронического аутоиммунного тиреоидита (АИТ) лежат клеточно- и антителоопосредованные реакции иммунной системы на тиреоидные антигены, которые сопровождаются лимфоидной и плазмоцитарной инфильтрацией ткани щитовидной железы (ЩЖ). Аутоиммунный ответ приводит к прогрессирующей гибели клеток эндокринного органа и развитию гипотиреоза [1-3]. При этом клеточным реакциям в патогенезе АИТ отводится ведущая роль [4]. Инициация и поддержка аутоиммунного процесса в ткани ЩЖ обеспечивается Т-хелперами 1 типа (Th1), а нарушения в регуляции гуморального иммунного ответа связаны с функцией Th2 [5].

Важную роль в развитии заболевания играют изменения функции Th17 [6], а также регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) [7]. Именно нарушения количественного и функционального соотношения Th17/Treg являются ключевыми в патогенезе широкого спектра аутоиммунных заболеваний, в том числе и АИТ [8]. Th17 – это подгруппа CD4+Т-лимфоцитов, которые продуцируют такие интерлейкины (IL) как IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22. Установлено, что снижение количества Th17 и уровня IL-17 у нокаутных по транскрипционному фактору ретиноид-связанного гамма-рецептора (ROR $\gamma$ t) животных сопровождается существенным уменьшением частоты аутоиммунных заболеваний [9]. Роль клеток Th17 в патогенезе АИТ была подтверждена в ряде работ. Так, было установлено, что при АИТ увеличивается число циркулирующих Th17 [4]. Wang et al. [8] также обнаружили повышение количества Th17 у пациентов с АИТ. Наряду с этим было выявлено и нарастание экспрессии мРНК IL-17 и ROR- $\gamma$ t на фоне снижения количества Tregs-клеток.

Дифференцировку Th17 обеспечивает ряд гуморальных факторов, в первую очередь IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-23. Как системно, так и местно продуцируемый вышеуказанными клетками цитокин IL-17 стимулирует клетки эпителия, фибробласты и макрофаги к образованию и секреции медиаторов воспаления, в частности, хемокинов,

фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), хемотаксического белка моноцитов -1 (MCP1) [7].

Следует отметить, что IL-1 $\beta$  вовлечен в провоспалительный каскад в ткани ЩЖ и участвует в развитии и прогрессировании АИТ. Повышенная экспрессия нескольких компонентов воспаления (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, ASC и каспаза-1) и связанных с ними цитокинов (IL-18 и IL-1 $\beta$ ) провоцируют гибель клеток ЩЖ через пироптоз [10].

Известно, что патология ЩЖ может инициировать изменения в метаболизме костной ткани и развитие остеопороза [11]. При этом ассоциация между заболеваниями ЩЖ и патологией костной системы в определенной степени может быть опосредована нарушениями в цитокиновой системе RANK/RANKL/OPG.

Цель работы – определить особенности системной продукции TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа- $\beta$  (RANKL) и остеопротегерина (OPG) у женщин с АИТ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в ГОУ ВПО «Донецкий Национальный медицинский университет им.М.Горького». Всего обследовали 147 женщин в возрасте 31-47 лет с подтвержденным АИТ. Критериями исключения служили постменопауза; наличие иной, помимо АИТ, аутоиммунной, эндокринной патологии или метаболических расстройств; онкологические, гематологические и психические заболевания; хронические заболевания печени или почек; хронические воспалительные заболевания; прием иммуносупрессивных препаратов. В контрольную группу вошли 63 условно здоровые женщины аналогичного возраста без заболеваний щитовидной железы.

В сыворотке периферической крови, отобранной утром натощак, с помощью иммуно-

ферментного анализа определяли концентрации TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, RANKL, OPG. Для этого использовали тест системы производства «Вектор-Бест» (РФ), «eBiosciences» (США), «Biomedica Medizinprodukte» (Австрия).

На начальном этапе статистической обработки полученных данных установили, что характер распределения большинства исследуемых показателей отличается от нормального. В связи с этим описательную статистику проводили с использованием непараметрических методов. Расчет медианы (Me), интерквартильного размаха (Q1;Q3) и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (rs) осуществляли с применением пакета стандартных статистических программ «MedStat». Для сравнения двух независимых

выборок применяли тест Манна-Уитни. Статистически значимыми отличия принимали при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты обследования женщин с АИТ на содержание в сыворотке крови цитокинов представлены в таблице 1. Аутоиммунное поражение ЩЖ характеризовалось достоверным ( $p < 0,001$ ) увеличенными уровнями IL-1 $\beta$  и IL-6 на фоне близкой к статистической значимости тенденции к повышению сывороточных концентраций IL-17A ( $p = 0,067$ ). В то же время значения таких провоспалительных цитокинов, как TNF- $\alpha$  и IL-8, существенно не отличались от показателей женщин контрольной группы ( $p = 0,166$  и  $p = 0,102$  соответственно).

Таблица 1

Показатели медианы и интерквартильного размаха (Q1; Q3) сывороточных уровней цитокинов у женщин с АИТ

Показатели	Здоровые женщины (n=63)	Женщины с АИТ (n=147)	P
TNF- $\alpha$ , пг/мл	0,0 (0,0; 1,1)	0,6 (0,0; 0,8)	0,166
IL-1 $\beta$ , пг/мл	1,8 (1,2; 2,5)	3,5 (2,2; 4,9)	<0,001
IL-6, пг/мл	0,5 (0,1; 0,9)	2,5 (0,0; 6,0)	<0,001
IL-8, пг/мл	5,4 (3,6; 9,2)	6,6 (3,8; 10,0)	0,102
IL-17A, пг/мл	1,5 (0,8; 2,7)	2,7 (0,6; 3,2)	0,067
RANKL, пг/мл	2,8 (2,2; 3,9)	3,4 (2,4; 4,9)	0,029
OPG, пг/мл	78,5 (66,1; 87,2)	76,7 (49,4; 107,6)	0,988
OPG/RANKL	25,1 (17,7; 38,5)	21,8 (12,4; 34,0)	0,017

Ряд изменений было установлено и в цитокиновой системе RANK/RANKL/OPG. Аутоиммунное заболевание ЩЖ у женщин сопровождалось достоверно ( $p = 0,029$ ) повышением концентраций RANKL, тогда как содержание OPG оставалось на контрольных уровнях ( $p = 0,988$ ). Вследствие вышеуказанных особенностей системной секреции OPG и RANKL у женщин с АИТ было зарегистрировано закономерное снижение показателей соотношения вышеуказанных цитокинов ( $p = 0,017$ ).

Результаты корреляционного анализа между сывороточными уровнями изученных цитокинов в группе женщин с АИТ представлены в таблице 2. Было установлено наличие положительной связи концентраций IL-6 с показателями TNF- $\alpha$  ( $rs = 0,229$ ;  $p < 0,05$ ), IL-8 ( $rs = 0,249$ ;  $p < 0,05$ ), IL-17A ( $rs = 0,248$ ;  $p < 0,05$ ) и RANKL ( $rs = 0,390$ ;  $p < 0,05$ ). Также достоверная положительная связь была обнаружена между значениями RANKL и IL-8 ( $rs = 0,365$ ;  $p < 0,05$ ). Помимо этого концентрации провоспалительного цитокина RANKL характеризовались прямой корреляцией с содержанием противовоспалительно-

го медиатора OPG ( $rs = 0,248$ ;  $p < 0,05$ ). Обращает внимание выявленная отрицательная корреляция между индексом OPG/RANKL и значениями IL-6 ( $rs = -0,176$ ;  $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, установлено, что у женщин с АИТ по сравнению с группой условно здоровых лиц, аналогичных по полу и возрасту, повышены сывороточные уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, RANKL и снижены значения индекса OPG/RANKL ( $p < 0,05$ ). При этом концентрации цитокинов IL-8, TNF- $\alpha$  и OPG существенно не отличаются от контрольных данных ( $p > 0,05$ ). Кроме того, между уровнями цитокинов выявлен ряд корреляций. В частности, обнаружена положительная связь концентраций IL-6 со значениями TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-17A, а также отрицательная – с показателями соотношения OPG/RANKL.

Установленное нами повышение секреции IL-1 $\beta$  согласуется с результатами отдельных исследований, в которых зарегистрирована избыточная продукция вышеуказанного провос-

Таблица 2

Показатели коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между значениями отдельных цитокинов у женщин с АИТ (n=147)

Показатель	TNF- $\alpha$	IL-8	IL-17A	RANKL	OPG	OPG/RANKL
IL-6	0,229	0,249	0,248	0,390	-	-0,176
IL-8	-	-	-	0,365	-	-
RANKL	-	-	-	-	0,248	-0,480
OPG	-	-	-	-	-	0,672

Примечание: в таблице представлены только статистически значимые ( $p < 0,05$ ) значения коэффициентов корреляции.

палительного цитокина при АИТ. В частности, Здор В.В. [12] при обследовании 102 пациентов с АИТ и различной степенью тяжести гипотиреоза обнаружил более чем двукратное нарастание продукции IL-1 $\beta$ .

Повышение содержания IL-6, установленное нами, находит отражение в работах Здор В.В. [12], Tayde P.S. et al. [13] и ряде более ранних исследований. В то же время, отдельные исследователи, напротив, указывают на снижение концентраций этого цитокина при АИТ с гипотиреозом в сравнении со здоровыми лицами, или больными АИТ на фоне эутиреоза [14]. Наконец, в единичных работах приводятся данные об отсутствии изменений уровня IL-6 у пациентов с аутоиммунным поражением ЩЖ [15].

Сведения о продукции IL-17 при АИТ достаточно противоречивы. Так, одни авторы делают вывод о повышении его при заболевании ЩЖ [12]. В других же работах указывается на отсутствие разницы в содержании IL-17 при сравнении со здоровыми лицами [16; 17].

Нами не было обнаружено достоверного изменения уровней провоспалительных IL-8 при АИТ. Это не согласуется с данными Здор В.В. [12] и Kobawala et al. [18], указывающими на достоверное повышение, или тенденцию к повышению значений вышеуказанного цитокина. Стоит подчеркнуть и противоречивость данных о содержании TNF- $\alpha$  при аутоиммунном поражении ЩЖ. В частности, на отсутствие изменений уровня данного фактора указывают Botelho I.M.V. et al. [16]. С другой стороны, Здор В.В. [12], так же как и Tayde P.S. et al. [13], в своих исследованиях зарегистрировали достоверное повышение содержания данного цитокина у пациентов с АИТ.

Выявленные нами изменения уровней RANKL и соотношения OPG/RANKL согласуются с выводами немногочисленных работ, указывающими на то, что АИТ сопровождается нарушениями в системе RANK/RANKL/OPG,

особенно на фоне гипотиреоза. Причем, изменения в вышеуказанной цитокиновой системе при развившемся гипотиреозе могут способствовать потере костной массы и развитию остеопороза [14; 19]. Это подтверждается и исследованиями, доказавшими, что наличие антител к тиреоидной пероксидазе может быть маркером повышенного риска остеопоротических переломов [20; 21].

## ВЫВОДЫ

Аутоиммунный тиреоидит у женщин характеризуется достоверным повышением сывороточных уровней IL-1 $\beta$ , IL-6, RANKL и снижением индекса OPG/RANKL ( $p < 0,05$ ), тогда как показатели продукции IL-8, TNF- $\alpha$  и OPG существенно не изменяются ( $p > 0,05$ ). Для концентраций IL-6 установлена положительная корреляция со значениями TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-17 ( $p < 0,05$ ) и отрицательная – с показателями соотношения OPG/RANKL ( $p < 0,05$ ). Значения RANKL имеют прямую связь с уровнями IL-6, IL-8 и OPG ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты целесообразно использовать для оценки у женщин, страдающих АИТ, степени воспалительного процесса, в том числе в динамике лечебно-профилактических мероприятий.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырева Ю.В., Лебедев И.А., Кручинин Е.В., Алекберов Р.И., Тарасов Д.О., Тяпкин А.В., Козлов М.В., Ахметьянов М.А., Лукашенко А.В., Мокин Е.А., Фидоматова З.Ш. Единый подход к ведению пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (литературный обзор). Уральский медицинский журнал. 2019;07(175):110-3. doi: 10.25694/URMJ.2019.07.25
2. Трошина Е.А., Панфилова Е.А., Михина М.С., Свиридонова М.А. Тиреоидиты. Методи-

- ческие рекомендации (в помощь практическому врачу). *Consilium Medicum*. 2019;21(12):10–22. doi: 10.26442/20751753.2019.12.190683
3. Дедов И.И. Мельниченко Г.А., Фадеев В.Ф. Клиническая эндокринология. М.: Медицина; 2007: 53-68.
4. Santaguida M.G., Gatto I., Mangino G., Virili C., Stramazzo I., Fallahi P., Antonelli A., Segni M., Romeo G., Centanni M. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2017;184:42-47. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.012
5. Ramos-Leví A.M., Marazuela M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms. *Endocrinol Nutr*. 2016;63(8):421-429. doi: 10.1016/j.endonu.2016.04.003
6. Pyzik A., Grywalska E., Matyjaszek-Matuszek B., Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res*. 2015;2015:979167. doi: 10.1155/2015/979167
7. Shao S., Yu X., Shen L. Autoimmune thyroid diseases and Th17 / Treg lymphocytes. *Life Sci*. 2018;192:160-165. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.026
8. Wang C., Mu Z., Chen Y., Liu J., Ma J., Liu C., Hou Z. Study on Th17/Treg Cells and Cytokines in Hashimoto's Thyroiditis with Different Iodine Nutrition Status. *Science Journal of Public Health*. 2021;9(1):12-22. doi: 10.11648/j.sjph.20210901.12
9. Tan Y., Chen W., Liu C., Zheng X., Guo A., Long J. Effect of IL-21 on the Balance of Th17 Cells/Treg Cells in the Pathogenesis of Graves' Disease. *Endocr Res*. 2019;44(4):138-147. doi: 10.1080/07435800.2019.1600535
10. Guo Q., Wu Y., Hou Y., Liu Y., Liu T., Zhang H., Fan C., Guan H., Li Y., Shan Z., Teng W. Cytokine secretion and pyroptosis of thyroid follicular cells mediated by enhanced NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2 inflammasomes are associated with autoimmune thyroiditis. *Front Immunol*. 2018;9:1197. doi: 10.3389/fimmu.2018.01197
11. Apostu D., Lucaciu O., Oltean-Dan D., Mureşan A.D., Moisescu-Pop C., Maxim A., Benea H. The Influence of Thyroid Pathology on Osteoporosis and Fracture Risk: A Review. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(3):149. doi: 10.3390/diagnostics10030149
12. Здор В.В. Взаимосвязь гормональной и цитокиновой регуляции при аутоиммунном тиреоидите. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2017;13(2):45-56. doi: 10.14341/ket2017245-56
13. Tayde P.S., Bhagwat N.M., Sharma P., Sharma B., Dalwadi P.P., Sonawane A., Subramanyam A., Chadha M., Varthakavi P.K. Hypothyroidism and Depression: Are Cytokines the Link? *Indian J Endocrinol Metab*. 2017;21(6):886-892. doi: 10.4103/ijem.IJEM\_265\_17
14. Konca Degertekin C., Turhan Iyidir O., Aktas Yilmaz B., Elbeg S., Pasaoglu O.T., Pasaoglu H., Cakır N., Arslan M. RANKL/Osteoprotegerin System and Bone Turnover in Hashimoto Thyroiditis. *Calcif Tissue Int*. 2016;99(4):365-372. doi: 10.1007/s00223-016-0163-1
15. He J., Li Y., Li H., Zhang C., Zhang J., Sun X., Zheng S. Correlation between serum 25-(OH)D3 level and immune imbalance of Th1/Th2 cytokines in patients with Hashimoto's thyroiditis and its effect on autophagy of human Hashimoto thyroid cells. *Exp Ther Med*. 2021;21(5):458. doi: 10.3892/etm.2021.9889
16. Botelho I.M.B., Moura Neto A., Silva C.A., Tambascia M.A., Alegre S.M., Zantut-Wittmann D.E. Vitamin D in Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid function and inflammatory status. *Endocrine J*. 2018;65:1029-1037. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0166
17. Konca Degertekin C., Aktas Yilmaz B., Balos Toruner F., Kalkanci A., Turhan Iyidir O., Fidan I., Yesilyurt E., Cakır N., Kustimur S., Arslan M. Circulating Th17 cytokine levels are altered in Hashimoto's thyroiditis. *Cytokine*. 2016;80:13-17. doi: 10.1016/j.cyto.2016.02.011
18. Kobawala T.P., Patel G.H., Gajjar D.R., Patel K.N., Thakor P.B., Parekh U.B., Patel K.M., Shukla S.N., Shah P.M. Clinical utility of serum interleukin-8 and interferon-alpha in thyroid diseases. *J Thyroid Res*. 2011;2011:270149. doi: 10.4061/2011/270149
19. Rapacki E., Lauritzen J.B., Madsen C.M., Jørgensen H.L., Norring-Agerskov D. Thyroid-stimulating hormone (TSH) is associated with 30-day mortality in hip fracture patients. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;1-7. doi: 10.1007/s00068-019-01260-9
20. Polovina S.P., Miljic D., Zivojinovic S., Milic N., Micic D., Brkic V.P. The impact of thyroid autoimmunity (TPOAb) on bone density and fracture risk in postmenopausal women. *Hormones (Athens)*. 2017;16(1):54-61. doi: 10.14310/horm.2002.1719
21. Lambrinouadaki I., Armeni E., Pliatsika P., Rizos D., Kaparos G., Augoulea A., Alexandrou A., Flokatoula M., Creatsa M., Panoulis C., Triantafyllou N., Papacharalambous X. Thyroid function and autoimmunity are associated with the risk of vertebral fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2017;35(2):227-233. doi: 10.1007/s00774-016-0752-0

## REFERENCES

1. Boldyreva Y.V., Lebedev I.A., Kruchinin E.V., Alekberov R.I., Tarasov D.O., Tyapkin A.V.,



- Kozlov M.V., Akhmetianov M.A., Lukashenok A.V., Mokin E.A., Fidomatova Z.Sh. A unified approach to patient management with autoimmune thyroiditis (literature review). *Ural Medical Journal*. 2019;07(175):110-3. (In Russ). doi: 10.25694/URMJ.2019.07.25
2. Troshina E.A., Panfilova E.A., Mikhina M.S., Sviridonova M.A. Thyroiditis. Guidelines (to help a practitioner). *Consilium Medicum*. 2019;21(12):10–22. (In Russ). doi: 10.26442/20751753.2019.12.190683
3. Dedov I.I., Mel'nichenko G.A., Fadeev V.F. *Klinicheskaja jendokrinologija*. M.: Medicina; 2007: 53-68. (In Russ).
4. Santaguida M.G., Gatto I., Mangino G., Virili C., Stramazzo I., Fallahi P., Antonelli A., Segni M., Romeo G., Centanni M. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2017;184:42-47. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.012
5. Ramos-Leví A.M., Marazuela M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms. *Endocrinol Nutr*. 2016;63(8):421-429. doi: 10.1016/j.endonu.2016.04.003
6. Pyzik A., Grywalska E., Matyjaszek-Matuszek B., Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J. Immunol. Res*. 2015;2015:979167. doi: 10.1155/2015/979167
7. Shao S., Yu X., Shen L. Autoimmune thyroid diseases and Th17 / Treg lymphocytes. *Life Sci*. 2018;192:160-165. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.026
8. Wang C., Mu Z., Chen Y., Liu J., Ma J., Liu C., Hou Z. Study on Th17/Treg Cells and Cytokines in Hashimoto's Thyroiditis with Different Iodine Nutrition Status. *Science Journal of Public Health*. 2021;9(1):12-22. doi: 10.11648/j.sjph.20210901.12
9. Tan Y., Chen W., Liu C., Zheng X., Guo A., Long J. Effect of IL-21 on the Balance of Th17 Cells/Treg Cells in the Pathogenesis of Graves' Disease. *Endocr Res*. 2019;44(4):138-147. doi: 10.1080/07435800.2019.1600535
10. Guo Q., Wu Y., Hou Y., Liu Y., Liu T., Zhang H., Fan C., Guan H., Li Y., Shan Z., Teng W. Cytokine secretion and pyroptosis of thyroid follicular cells mediated by enhanced NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2 inflammasomes are associated with autoimmune thyroiditis. *Front Immunol*. 2018;9:1197. doi: 10.3389/fimmu.2018.01197
11. Apostu D., Lucaciu O., Oltean-Dan D., Mureşan A.D., Moisescu-Pop C., Maxim A., Benea H. The Influence of Thyroid Pathology on Osteoporosis and Fracture Risk: A Review. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(3):149. doi: 10.3390/diagnostics10030149
12. Zdor V.V. Correlation of hormonal and cytokines regulation in case of autoimmune thyroiditis. *Clinical and experimental thyroidology*. 2017;13(2):45-56. doi: 10.14341/ket2017245-56
13. Tayde P.S., Bhagwat N.M., Sharma P., Sharma B., Dalwadi P.P., Sonawane A., Subramanyam A., Chadha M., Varthakavi P.K. Hypothyroidism and Depression: Are Cytokines the Link? *Indian J Endocrinol Metab*. 2017;21(6):886-892. doi: 10.4103/ijem.IJEM\_265\_17
14. Konca Degertekin C., Turhan Iyidir O., Aktas Yilmaz B., Elbeg S., Pasaoglu O.T., Pasaoglu H., Cakır N., Arslan M. RANKL/Osteoprotegerin System and Bone Turnover in Hashimoto Thyroiditis. *Calcif Tissue Int*. 2016;99(4):365-372. doi: 10.1007/s00223-016-0163-1
15. He J., Li Y., Li H., Zhang C., Zhang J., Sun X., Zheng S. Correlation between serum 25-(OH)D3 level and immune imbalance of Th1/Th2 cytokines in patients with Hashimoto's thyroiditis and its effect on autophagy of human Hashimoto thyroid cells. *Exp Ther Med*. 2021;21(5):458. doi: 10.3892/etm.2021.9889
16. Botelho I.M.B., Moura Neto A., Silva C.A., Tambascia M.A., Alegre S.M., Zantut-Wittmann D.E. Vitamin D in Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid function and inflammatory status. *Endocrine J*. 2018;65:1029-1037. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0166
17. Konca Degertekin C., Aktas Yilmaz B., Balos Toruner F., Kalkanci A., Turhan Iyidir O., Fidan I., Yesilyurt E., Cakır N., Kustimur S., Arslan M. Circulating Th17 cytokine levels are altered in Hashimoto's thyroiditis. *Cytokine*. 2016;80:13-17. doi: 10.1016/j.cyto.2016.02.011
18. Kobawala T.P., Patel G.H., Gajjar D.R., Patel K.N., Thakor P.B., Parekh U.B., Patel K.M., Shukla S.N., Shah P.M. Clinical utility of serum interleukin-8 and interferon-alpha in thyroid diseases. *J Thyroid Res*. 2011;2011:270149. doi: 10.4061/2011/270149
19. Rapacki E., Lauritzen J.B., Madsen C.M., Jørgensen H.L., Norring-Agerskov D. Thyroid-stimulating hormone (TSH) is associated with 30-day mortality in hip fracture patients. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;1-7. doi: 10.1007/s00068-019-01260-9
20. Polovina S.P., Miljic D., Zivojinovic S., Milic N., Micic D., Brkic V.P. The impact of thyroid autoimmunity (TPOAb) on bone density and fracture risk in postmenopausal women. *Hormones (Athens)*. 2017;16(1):54-61. doi: 10.14310/horm.2002.1719
21. Lambrinouadaki I., Armeni E., Pliatsika P., Rizos D., Kaparos G., Augoulea A., Alexandrou A., Flokatoula M., Creatsa M., Panoulis C., Triantafyllou N., Papacharalambous X. Thyroid function and autoimmunity are associated with the risk of vertebral fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2017;35(2):227-233. doi: 10.1007/s00774-016-0752-0

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕВАТЕЛЬНОЙ МУСКУЛАТУРЫ У ДЕТЕЙ С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ОККЛЮЗИЕЙ

Косолапова И. В.<sup>1</sup>, Дорохов Е. В.<sup>1</sup>, Коваленко М. Э.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра нормальной физиологии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», 394036, ул. Студенческая, д. 10, Воронеж, Россия

<sup>2</sup>Кафедра детской стоматологии с ортодонтией, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», 394036, пр-т Революции, д. 14, Воронеж, Россия

**Для корреспонденции:** Косолапова Ирина Владимировна, ассистент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», e-mail: irenecherry@yandex.ru

**For correspondence:** Kosolapova I.V., assistant of the Department of normal physiology, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, e-mail: irenecherry@yandex.ru

### Information about authors:

**Kosolapova I. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-9779-7882>

**Dorokhov E. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-2096-411X>

**Kovalenko M. E.**, <https://orcid.org/0000-0001-8841-5574>

### РЕЗЮМЕ

Влияние полового диморфизма на развитие жевательной мускулатуры у детей может стать предпосылкой к различию в сроках и методах обследования функционального состояния жевательных мышц, к различным вариантам выбора техники и профилактики зубочелюстных аномалий. Материалы и методы. В ходе работы было обследовано 37 детей в возрасте от 6 до 12 лет с физиологической окклюзией. Оценка биоэлектрической активности височных и подъязычной группы мышц была проведена при помощи поверхностной электромиографии, проба «Жевание общее», оценка тонуса собственно жевательных мышц проводилась при помощи прибора «Миотон-3С». Результаты. При сопоставлении тонуса жевательных мышц у мальчиков и девочек, не удалось установить статистически значимых различий. При оценке всех показателей биоэлектрической проводимости височных и подъязычных мышц мальчиков и девочек, не удалось установить статистически значимых различий. Выводы. Не выявлено статистически значимых различий между половым диморфизмом и функциональными особенностями жевательной мускулатуры у детей с физиологической окклюзией на данном объеме выборки. Это может свидетельствовать о возможности использования одинаковых вариантов выбора техники и профилактики зубочелюстных аномалий у мальчиков и девочек данной возрастной группы.

**Ключевые слова:** поверхностная электромиография, миотонметрия, физиологическая окклюзия

### FUNCTIONAL FEATURES OF CHEWING MUSCLE IN CHILDREN WITH PHYSIOLOGICAL OCCLUSION

**Kosolapova I. V., Dorokhov E. V., Kovalenko M. E.**

Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

### SUMMARY

The influence of sexual dimorphism on the functional features of chewing muscles in children may become a prerequisite for differences in the timing and methods of examining the functional state of chewing muscles, to various options for choosing techniques and preventing dentate abnormalities. Materials and methods. During the work study, 38 children aged 6 to 12 years with a physiological occlusion were examined. Evaluation of the bioelectric activity of temporal and sublingual muscles was carried out using superficial electromyography, the Chewing General sample, and the evaluation of the tone of the chewing muscles proper was carried out using the Mioton-3C device. Results. When comparing the tone of the chewing muscles and gender, it was not possible to establish statistically significant differences. When assessing all indicators of bioelectric conductivity of temporal and sublingual muscles of boys and girls, it was not possible to establish statistically significant differences. Conclusions. No relationship was identified between sexual dimorphism and functional features of chewing muscle in children with physiological occlusion at a given sample size. This may indicate the possibility of using the same choice of technique and prevention of tooth anomalies in boys and girls of this age group.

**Key words:** surface electromyography, myotonometry, physiological occlusion

Правильное развитие жевательного аппарата в детском возрасте является основой физиологической окклюзии, отсутствия в дальнейшем заболеваний височно-нижнечелюстного сустава

ва, челюстно-лицевых деформаций, мышечных дисфункций и других нарушений (1). Наблюдение за изменением функциональных характеристик жевательного аппарата в период сменного

прикуса позволяет предупредить развитие этих нарушений. Для оценки функциональных характеристик жевательного аппарата часто исследуются биоэлектрическая активность и тонус жевательной мускулатуры.

По данным ряда авторов, функциональные характеристики жевательной мускулатуры у детей мышц тесно связаны с полом (2; 3). Другие исследования утверждают обратное и доказывают отсутствие половых различий в характеристиках жевательной мускулатуры (4; 5; 6).

Актуальность изучения половых различий в функциональных характеристиках жевательной мускулатуры у детей не вызывает сомнений, ведь наличие данной связи может стать предпосылкой к различию в сроках и методах обследования функционального состояния мышц, к разным вариантам выбора техники и профилактики зубочелюстных аномалий у мальчиков и девочек.

Цель данной работы – оценить наличие статистически значимых различий между половым диморфизмом и показателями биоэлектрической активности, тонусом жевательной мускулатуры у детей с физиологической окклюзией.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 37 детей (54% мальчиков, 46% девочек) в возрасте от 6 до 12 лет с физиологической окклюзией, не получавшие ранее ортодонтическое лечение. Критериями исключения были следующие: 1 – патологическая окклюзия, 2 – ортодонтическое лечение в анамнезе. У родителей всех пациентов было получено информированное согласие на участие их детей в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных. Программа исследований была одобрена этическим комитетом ВГМУ им. Н. Н. Бурденко (протокол №2 от 30 октября 2018 г, заседание состоялось по адресу г. Воронеж, ул. Студенческая 10).

На подготовительном этапе пациенты и их родители были ознакомлены с целью и детальным описанием процедуры исследования. Оценка биоэлектрической активности височных и подъязычной группы мышц была выполнена при помощи поверхностной электромиографии на аппарате «Электромиограф стоматологический» (г. Таганрог, Россия). Испытуемый находился в стоматологическом кресле в спокойном состоянии, на предварительно обезжиренные участки кожи, соответствующие проекциям наибольшего напряжения височных и под-

язычных мышц, накладывались одноразовые электроды, заземляющие датчики располагались на лбу и запястье испытуемого (7). Далее пациенту предлагалось на протяжении 30 секунд пережевывать 2 ядра фундука, массой 0,8 г с одновременной записью биоэлектрической активности мышц (проба «Жевание общее») (7). Результаты исследования выводились на экран компьютера и автоматически обрабатывались для получения числовых параметров биоэлектрической активности правой височной мышцы (m. temporalis D), левой височной мышцы (m. temporalis S), правой подъязычной мышцы (m. mylohyoideus D) и левой подъязычной мышцы (m. mylohyoideus S).

Оценка тонуса собственно жевательных мышц проводилась при помощи прибора «Миотон-3С» в состоянии физиологического покоя нижней челюсти (8). Учитывался тонус правой собственно жевательной мышцы (m. masseter D) и левой собственно жевательной мышцы (m. masseter S)(9).

Статистическая обработка проводилась с применением Microsoft Excel, версия 7.0 и статистических программ SPSS Statistics 21 и STATISTICA 7. Используемые методы: t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча, критерий  $\chi^2$  Пирсона, U-критерий Манна - Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен анализ тонуса жевательных мышц мальчиков и девочек (табл. 1).

При сопоставлении тонуса правой и левой жевательных мышц у мальчиков и девочек, не удалось установить статистически значимых различий ( $p = 0,563$ ,  $p = 0,909$  соответственно), хотя тонус правой жевательной мышцы у девочек имеет тенденцию к снижению по сравнению с мальчиками.

Таким образом, статистически значимых различий между полом и тонусом собственно жевательных мышц у детей с физиологической окклюзией выявлено не было.

Далее нами был проведен анализ показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц мальчиков и девочек (табл. 2).

При оценке всех показателей биоэлектрической проводимости височных и подъязычных мышц в зависимости от пола, нам не удалось установить статистически значимых различий в группах мальчиков и девочек по показателям: максимальная и средняя амплитуда биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц, время жевания, время покоя, частота жеваний и отношения времени жевания к времени покоя височных и подъязычных мышц.

Таблица 1

## Анализ тонаса жевательных мышц мальчиков и девочек

Показатель	Единицы измерения	Пол		P
		Мальчики (n=20)	Девочки (n=17)	
Тонус m. masseter (D) M ± SD (95% ДИ)	миотон	130,7 ± 21,6 (109,2 – 152,3)	124,6 ± 16,8 (107,8 – 141,3)	0,563
Тонус m. masseter (S), M ± SD (95% ДИ)	миотон	144,7 ± 21,3 (123,5 – 166)	145,9 ± 15 (130,9 – 160,8)	0,909

Таблица 2

## Анализ показателей биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц мальчиков и девочек

Показатель	Единицы измерения	Пол		P
		Мальчики (n=20)	Девочки (n=17)	
M. temporalis (D), максимальная амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	1632,3 ± 433,9 (1198,9 – 2065,7)	1789,1 ± 537,6 (1252,1 – 2326,1)	0,559
M. temporalis (D), средняя амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	265,7 ± 63,7 (202,1 – 329,3)	271,4 ± 65,4 (206,1 – 336,7)	0,871
M. temporalis (D), площадь, M ± SD (95% ДИ)	мкВ*мс	1137,56 ± 334,7 (803,21 – 1471,91)	1142,35 ± 311,19 (831,48 – 1453,21)	0,978
M. temporalis (D), время жевания, M ± SD (95% ДИ)	с	17,01 ± 1,58 (15,43 – 18,59)	16,93 ± 2,28 (14,65 – 19,21)	0,939
M. temporalis (D), время покоя, M ± SD (95% ДИ)	с	13 ± 2 (11 – 14)	13 ± 2 (11 – 15)	0,926
M. temporalis (D), время жевания/покоя, M ± SD (95% ДИ)	–	1,39 ± 0,29 (1,1 – 1,68)	1,4 ± 0,4 (1 – 1,8)	0,964
M. temporalis (D), частота жеваний, Me [Q1-Q3]	–	1,4 [1,4 - 1,65]	1,5 [1,5 - 1,65]	0,746
M. mylohyoideus (D), максимальная амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	1016,9 ± 222,1 (795 – 1238,7)	962,7 ± 299 (664 – 1261,4)	0,707
M. mylohyoideus (D), средняя амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	248,3 ± 42,8 (205,6 – 291)	215,9 ± 32,2 (183,7 – 248)	0,135
M. mylohyoideus (D), площадь, M ± SD (95% ДИ)	мкВ*мс	732,7 ± 353,36 (379,72 – 1085,69)	705,55 ± 342,71 (363,21 – 1047,9)	0,886
M. mylohyoideus (D), время жевания, M ± SD (95% ДИ)	с	10,15 ± 4,39 (5,77 – 14,54)	10,71 ± 3,7 (7,01 – 14,4)	0,804
M. mylohyoideus (D), время покоя, M ± SD (95% ДИ)	с	19,21 ± 4,3 (14,91 – 23,51)	18,95 ± 3,7 (15,25 – 22,64)	0,904
M. mylohyoideus (D), время жевания/покоя, M ± SD (95% ДИ)	–	0,6 ± 0,41 (0,2 – 1,01)	0,62 ± 0,33 (0,28 – 0,95)	0,944

Продолжение таблицы 2

M. mylohyoideus (D), частота жеваний, Me [Q1-Q3]	–	1,4 [1 - 1,5]	1,5 [1,1 - 1,65]	0,332
M. temporalis (S), максимальная амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	1024,7 ± 231,8 (793,2 – 1256,3)	927,9 ± 326,7 (601,5 – 1254,2)	0,534
M. temporalis (S), средняя амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	238,4 ± 43,3 (195,1 – 281,7)	202,1 ± 33,4 (168,8 – 235,5)	0,105
M. temporalis (S), площадь, M ± SD (95% ДИ)	мкВ*мс	773,24 ± 286,76 (486,78 – 1059,7)	631,21 ± 174,79 (456,6 – 805,82)	0,285
M. temporalis (S), время жевания, M ± SD (95% ДИ)	с	11,08 ± 3,36 (7,73 – 14,44)	10,84 ± 2,19 (8,66 – 13,03)	0,875
M. temporalis (S), время покоя, M ± SD (95% ДИ)	с	18 ± 3,18 (14,82 – 21,18)	18,76 ± 2,1 (16,67 – 20,86)	0,607
M. temporalis (S) Время жевания/покоя, M ± SD (95% ДИ)	–	0,6 ± 0,42 (0,2 – 1,04)	0,61 ± 0,23 (0,27 – 0,95)	0,744
M. temporalis (S), частота жеваний, M ± SD (95% ДИ)	–	1,27 ± 0,29 (0,98 – 1,56)	1,4 ± 0,28 (1,12 – 1,68)	0,42
M. mylohyoideus (S), максимальная амплитуда, Me [Q1-Q3]	мкВ	1557 [1348,5 - 2243,5]	1542 [1452,5 - 2600,5]	1
M. mylohyoideus (S), средняя амплитуда, M ± SD (95% ДИ)	мкВ	274,3 ± 79 (195,3 – 353,2)	307,1 ± 77,3 (230 – 384,3)	0,447
M. mylohyoideus (S), площадь, M ± SD (95% ДИ)	мкВ*мс	1292,56 ± 495,79 (797,29 – 1787,82)	1341,46 ± 315,84 (1025,96 – 1656,96)	0,829
M. mylohyoideus (S), время жевания, M ± SD (95% ДИ)	с	17,23 ± 1,51 (15,72 – 18,74)	16,55 ± 1,9 (14,65 – 18,45)	0,475
M. mylohyoideus (S), время покоя, M ± SD (95% ДИ)	с	12,33 ± 1,59 (10,74 – 13,91)	13,03 ± 1,76 (11,27 – 14,79)	0,45
M. mylohyoideus (S), время жевания/покоя, M ± SD (95% ДИ)	–	1,43 ± 0,27 (1,16 – 1,7)	1,31 ± 0,34 (0,97 – 1,65)	0,494
M. mylohyoideus (S), частота жеваний, Me [Q1-Q3]	–	1,5 [1,4 - 1,6]	1,5 [1,45 - 1,6]	0,948

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование не выявило различий в тонических характеристиках собственно жевательных мышц и биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц у мальчиков и девочек.

Полученные нами данные согласуются с исследованием, авторы которого не обнаружили значимого влияния пола и психоэмоционального статуса на биоэлектрическую активность жевательных мышц у взрослых пациентов с различным количеством кариозных зубов (4).

Woźniak с соавторами рассмотрели влияние функциональных адаптаций на мышечную активность у 51 ребенка со средним возрастом 10,7 года. Результаты исследования показали, что электрическая активность мышц в каждой из клинических ситуаций была одинаковой в группе девочек и мальчиков, что также согласуется в нашими результатами(6).

Zhang с соавторами при изучении детей с дисфагией методом поверхностной электромиографии так же не обнаружили зависимости показателей биоэлектрической активности жевательных мышц от пола (5).

Однако, наши результаты противоречат данным некоторых других исследований. Так, Lenguas с соавторами обнаружили, у детей в возрасте от 6 до 10 лет с односторонним перекрестным прикусом и латеральным смещением зубов в ранней смене прикуса в состоянии покоя не было обнаружено различий между полами по любым мышечным областям, асимметрии и индексам активности. Но во время максимального произвольного сжатия зубов мальчики показали более высокую активность, чем девочки, в областях мышц как со стороны перекрестного прикуса, так и с противоположной стороны. Авторы рекомендуют учитывать половой диморфизм при диагностике и лечении одностороннего перекрестного прикуса и латерального смещения зубов в ранней смене прикуса(10).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование не выявило различий в тонических характеристиках собственно жевательных мышц у мальчиков и девочек. Кроме того, не обнаружено различий в биоэлектрической активности височных и подъязычных мышц у мальчиков и девочек. Таким образом, не выявлено статистически значимых различий между половым диморфизмом и функциональными особенностями жевательной мускулатуры у детей с физиологической окклюзией. Это может свидетельствовать о возможности использования одинаковых вариантов выбора техники и профилактики зубочелюстных аномалий у мальчиков и девочек данной возрастной группы. Однако, мы не можем исключить возможности обнаружения данной зависимости при увеличении объема выборки исследуемых, потому данный вопрос требует дальнейшего изучения.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ипполитов Ю. А., Гавриш А. В., Ростовцев В. В., Махмуди А. А., Грушенкова О. А. Дифференциальная диагностика первичной потери минерального компонента эмали зуба с использованием конусно-лучевой компьютерной томографии. *J Chem Inf Model.* 2013;53(9):1689–99. doi:10.1128/AAC.03728-14
2. Tennant L. M., Nelson-Wong E., Kuest J., Lawrence G., Levesque K., Owens D. A Comparison of Clinical Spinal Mobility Measures to Experimentally Derived Lumbar Spine Passive Stiffness. *J Appl Biomech.* 2020 Oct;1–11. doi:10.1123/jab.2020-0030

3. Pradhan A., Malagon G., Lagacy R., Chester V., Kuruganti U. Effect of age and sex on strength and spatial electromyography during knee extension. *J Physiol Anthropol.* 2020;39(1):1–11. doi: 10.1186/s40101-020-00219-9

4. Makeeva I. M., Samokhlib Y. V., Dikopova N. Z. The influence of teeth morphology on bioelectrical activity of masticatory muscles. *Stomatologiya (Mosk).* 2017;96(3):18–22. doi:10.17116/stomat201796318-22

5. He J. H., Zhang J., Yuan L. P., Qin R., Liu H., Duan Y. Q. Application of surface electromyography in children with dysphagia. *Chinese J Contemp Pediatr.* 2019;21(11):1089–93. doi:10.7499/j.issn.1008-8830.2019.11.007

6. Woźniak K., Piątkowska D., Szyszka-Sommerfeld L., Buczkowska-Radlińska J. Impact of functional appliances on muscle activity: A surface electromyography study in children. *Med Sci Monit.* 2015;21:246–53. doi: 10.12659/MSM.893111

7. Kosolapova I. V., Dorokhov E. V., Kovalenko M. E. Features of correlation of electromyographic and myotonometric studies in children with anomalies dentoalveolar system. *J Volgogr State Med Univ.* 2020 Mar 27;73(1):160–3. doi: 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-160-163

8. Ципин Л. Л. Методологические аспекты применения электромиографии при изучении спортивных движений разной интенсивности. *Ученые записки университета имени П. Ф. Лесгафта.* 2015;8(126):188–93. doi:930/issn.1994-4683.2015.08.126.p188-193

9. Косолапова И. В., Дорохов Е. В., Коваленко М. Э., Кривцова И. О. Биоэлектрическая проводимость жевательных мышц у пациентов с дисфункцией височно-нижнечелюстного сустава. *Научно-практический журнал.* 2020;80:62–7.

10. Lenguas L., Alarcón J. A., Venancio F., Kassem M., Martín C. Surface electromyographic evaluation of jaw muscles in children with unilateral crossbite and lateral shift in the early mixed dentition. *Sexual dimorphism. Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012;17(6):1096–102. doi: 10.4317/medoral.17942

### REFERENCES

1. Ippolitov Y. U, Gavriash A, Rostovcev V, Mahmudi A, Grushenkova O. Differential diagnosis of primary loss of mineral component by tooth enamel using cone-beam computed tomography. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2013;53(9):1689–99. (In Russ). doi: 10.1128/AAC.03728-14
2. Tennant L. M., Nelson-Wong E., Kuest J., Lawrence G., Levesque K., Owens D. A Comparison of Clinical Spinal Mobility Measures

to Experimentally Derived Lumbar Spine Passive Stiffness. *J Appl Biomech*. 2020 Oct;1–11. doi: 10.1123/jab.2020-0030

3. Pradhan A., Malagon G., Lagacy R., Chester V., Kuruganti U. Effect of age and sex on strength and spatial electromyography during knee extension. *J Physiol Anthropol*. 2020;39(1):1–11. doi: 10.1186/s40101-020-00219-9

4. Makeeva I. M., Samokhlib Y. V., Dikopova N. Z. The influence of teeth morphology on bioelectrical activity of masticatory muscles. *Stomatologiya (Mosk)*. 2017;96(3):18–22. doi:10.17116/stomat201796318-22

5. He J. H., Zhang J., Yuan L. P., Qin R., Liu H., Duan Y. Q. Application of surface electromyography in children with dysphagia. *Chinese J Contemp Pediatr*. 2019;21(11):1089–93. doi:10.7499/j.issn.1008-8830.2019.11.007

6. Woźniak K., Piątkowska D., Szyszka-Sommerfeld L., Buczkowska-Radlińska J. Impact of functional appliances on muscle activity: A surface electromyography study in children. *Med Sci Monit*. 2015;21:246–53. doi: 10.12659/MSM.893111

7. Kosolapova I. V., Dorokhov E. V., Kovalenko M. E. Features of correlation of electromyographic and myotonometric studies in children with anomalies dentoalveolar system. *J Volgogr State Med Univ*. 2020 Mar 27;73(1):160–3. doi: 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-160-163

8. Cipin L. Methodological aspects of the use of electromyography in the study of sports movements of different intensities. *Scientific notes by P.F. Lesgaft University*. 2015;8(126):188–93. (In Russ). doi: 930/issn.1994-4683.2015.08.126.p188-193

9. Kosolapova I., Dorohov E., Kovalkenko M., Krivcova I. Bioelectric conduction of chewing muscles in patients with temporomandibular dysfunction. *Scientific and practical journal*. 2020;80:62–7. (In Russ).

10. Lenguas L., Alarcón J. A., Venancio F., Kassem M., Martín C. Surface electromyographic evaluation of jaw muscles in children with unilateral crossbite and lateral shift in the early mixed dentition. *Sexual dimorphism. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(6):1096–102. doi: 10.4317/medoral.17942

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА В ПРОЦЕССЕ РЕПЕРFUЗИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВАСКУЛЯРНОЙ ЭКСКЛЮЗИИ

Попов К. А., Денисова Я. Е., Столярова А. Н., Азимов Э. А., Есауленко Е. Е., Быков М. И.,  
Балачевская О. В., Басов А. А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России), 350063, ул. Митрофана Седина, 4, Краснодар, Россия

Для корреспонденции: Попов Константин Андреевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, e-mail: naftalin444@mail.ru

For correspondence: Konstantin A. Popov, PhD, Associate professor of the department of fundamental and clinical biochemistry, Kuban state medical university, e-mail: naftalin444@mail.ru

### Information about authors:

Popov K. A., <http://orcid.org/0000-0002-3649-1361>  
Denisova Y. E., <http://orcid.org/0000-0003-1242-6909>  
Stolyarova A. N., <http://orcid.org/0000-0002-5817-130X>  
Azimov E. A., <http://orcid.org/0000-0002-3884-2436>  
Esaulenko E. E., <https://orcid.org/0000-0002-9386-8049>  
Bykov M. I., <http://orcid.org/0000-0001-6806-1414>  
Balachevskaya O. V., <http://orcid.org/0000-0002-5292-8383>  
Basov A. A., <http://orcid.org/0000-0002-2262-4549>

### РЕЗЮМЕ

Изменения состояния системы антиоксидантной защиты и интенсификация свободнорадикальных процессов – ведущий патобиохимический механизм развития реперфузионных повреждений клеток. Цель работы – определить особенности изменений маркеров окислительного стресса в разные сроки развития острого реперфузионного периода после общей васкулярной эксклюзии печени крыс. Исследование выполнено на 100 белых нелинейных половозрелых самцах крыс массой 200-250 грамм. Животным опытных групп выполняли моделирование 20-ти минутной сосудистой изоляции печени. Кровь в объеме 2-3 мл забирали из нижней полой вены через 5, 15, 30, 60, 120, 180 минут, 8 часов и сутки после восстановления кровотока.

Результаты исследования показали, что на ранних сроках реперфузионного периода (5-60 минут) наблюдаются изменения обусловленные цитолизом гепатоцитов в период ишемии органа и вымыванием клеточного содержимого в кровь. Уровень радикальной сорбции ABTS плазмой крови кратковременно увеличивался на 20% к 5-й минуте периода реперфузии, в это же период отмечалось увеличение активности глутатионпероксидазы в 2,5 раза. Общая антиоксидантная активность, определенная железом-восстанавливающим методом, была увеличенной в 2 раза в период 15-30-ти минут периода после восстановления кровотока. Основные проявления реперфузионных повреждений печени развились спустя 60 минут после восстановления кровотока и характеризовались резким снижением общей АОА в 1,5-2 раза и концентрации восстановленного глутатиона на 20%. Система антиоксидантной защиты плазмы крови первой реагировала на распространение патологического процесса на системном уровне и ее изменения сохранялись спустя сутки после ишемии печени. 20-ти минутная васкулярная эксклюзия печени сопровождалась и изменениями антиоксидантного баланса в эритроцитарной взвеси, но данные изменения нормализовались спустя сутки после восстановления кровотока. Полученные данные позволяют разграничить вклад ишемических и реперфузионных повреждений в развитие окислительных нарушений, что важно с позиции оценки возможностей антиоксидантной терапии.

**Ключевые слова:** ишемия печени, реперфузия, антиоксидантная система, окислительный стресс.

### DYNAMICS OF CHANGES IN OXIDATIVE HOMEOSTASIS PARAMETERS DURING RAT LIVER REPERFUSION AFTER VASCULAR EXCLUSION

Popov K. A., Denisova Ya. E., Stolyarova A. N., Azimov E. A., Esaulenko E. E., Bykov M. I., Balachevskaya O. V., Basov A. A.

<sup>1</sup>Kuban state medical university, Krasnodar, Russia

### SUMMARY

Changes in the state of the antioxidant protection system and the intensification of free radical processes are the leading pathobiochemical mechanism for the development of reperfusion damage to cells. The aim of this paper is to determine the features of changes in markers of oxidative stress at different periods of development of the acute reperfusion after total vascular exclusion of rat liver. The study was carried out on 100 white nonlinear sexually mature male rats weighing of 200-250 grams. The animals of the experimental groups were simulated with a 20-minute vas-



cular isolation of the liver. Blood in a volume of 2-3 ml was taken from the inferior vena cava for 5, 15, 30, 60, 120, 180 minutes, 8 hours and a day after the restoration of blood flow. The results of the study showed that in the early stages of the reperfusion period (5-60 minutes), changes are observed due to cytolysis of hepatocytes during the period of organ ischemia and leaching of cell contents into the blood. The level of radical sorption of ABTS by blood plasma briefly increased by 20% by the 5th minute of the reperfusion period; at the same period, an increase in glutathione peroxidase activity by 2.5 times was noted. The total antioxidant activity, determined by the iron-reducing method, was increased by 2 times within the period of 15-30 minutes after the restoration of blood flow. The main manifestations of reperfusion damage to the liver developed in 60 minutes after the restoration of blood flow and were characterized by a sharp decrease in total AOA by 1.5-2 times and the concentration of reduced glutathione by 20%. The system of antioxidant protection of blood plasma was the first to react to the spread of the pathological process at the systemic level and its changes persisted one day after liver ischemia. A 20-minute vascular exclusion of the liver was accompanied by changes in the antioxidant balance in the erythrocyte suspension, but these changes returned to normal a day after the restoration of blood flow.

The data obtained make it possible to distinguish between the contribution of ischemic and reperfusion injuries to the development of oxidative disorders, which is important from the standpoint of assessing the possibilities of antioxidant therapy.

**Key words:** liver ischemia, reperfusion, antioxidant system, oxidative stress.

Изменения состояния системы антиоксидантной защиты и интенсификация свободно-радикальных процессов – ведущий патобиохимический механизм развития реперфузионных повреждений клеток. Если ткань успешно переживает ишемический период, она встречается со второй волной повреждающих факторов, развивающихся на фоне относительной гипероксии в период реоксигенации [1; 2]. Развитие окислительного стресса начинается еще в период сосудистой изоляции, так как в ткани всегда остается небольшое количество кислорода, однако основные проявления этого типового патологического процесса следуют за восстановление кровотока, именно этот период считается наиболее опасным [3; 4]. За изменениями на местном уровне следует распространение метаболических нарушений, в том числе окислительных нарушений и эндогенной интоксикации, на местном уровне. На данном этапе поражение одного органа, например, печени, может перейти в форму полиорганной недостаточности [5; 6]. Печень играет исключительную роль во всех видах обмена веществ, в том числе в интеграции разных путей метаболизма в целостном организме. Ишемически-реперфузионные поражения печени встречаются при сердечно-сосудистых заболеваниях, шоке, превентивном выключении кровотока при хирургических вмешательствах, трансплантациях органа [7; 8]. Нами ранее была показана потенциальная возможность раздельной оценки вклада ишемического и реперфузионного составляющего патологического процесса в поражение печени путем определения динамики изменений маркеров цитолитического синдрома [9]. Опираясь на эти результаты в данной статье аналогичным образом было проведено исследование изменений маркеров окислительного стресса в процессе ревазуляризации.

Цель работы – определить особенности изменений маркеров окислительного стресса в

разные сроки развития острого реперфузионного периода после общей васкулярной эксклюзии печени крыс.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено с участием 100 белых нелинейных половозрелых самцов крыс массой 200-250 грамм на момент эксперимента. В качестве контрольной группы использовали лабораторных животных (n=20), содержавшихся в аналогичных условиях, но без моделирования какого-либо патологического процесса. Остальным животным опытных групп выполняли моделирование сосудистой изоляции печени путем пережатия аналога гепатодуоденальной связки сосудистым зажимом типа Бульдог на 20 минут. После выжидания 20-ти минут ишемического периода сосудистый зажим снимали. С этого момента засекали время реперфузионного периода в процессе которого осуществляли забор крови для лабораторных исследований изменений состояния окислительного гомеостаза на системном уровне. Кровь в объеме 2-3 мл забирали из нижней полой вены через 5, 15, 30, 60, 120, 180 минут, 8 часов и сутки после восстановления кровотока. Таким образом было сформированы 8 опытных групп по 10 особей лабораторных животных. Все болезненные манипуляции выполняли под общей анестезией использованием Золетил 100 («Virbac», France), заранее вводимого внутримышечно в область бедра в дозировке 10 мг/кг. Целесообразность и соответствие этическим принципам были рассмотрены на заседании независимого этического комитета ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, на котором было одобрено проведение запланированного исследования (протокол № 51 от 23.05.2017 г.).

В крови лабораторных животных определяли ряд показателей прооксидантно-антиоксидантной системы. В эритроцитах были определены содержание ТБК-реактивных продуктов (про-

дукты перекисного окисления липидов, основной среди которых малоновый диальдегид), активность ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы (ГПО), а также концентрация восстановленной формы трипептида глутатиона [10]. В плазме крови были определены изменения содержания тиоловых групп, а также общей антиоксидантной активности (АОА). Общая АОА была определена методом оценки радикальной сорбции ABTS и методом оценки железо-восстанавливающей способности (FRAP) [11]. Содержание тиоловых групп и глутатиона определяли с помощью реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)). Каталазную активность определяли по скорости разложения перекиси водорода гемолизатом эритроцитов, которую регистрировали фотометрически при 260 нм. Активность ГПО определяли по скорости расходования глутатиона на окисление гидроперекиси трет-бутила [12].

Статистический анализ результатов исследования выполнен с помощью программы Stat Plus for Windows (AnalystSoft Inc.). Данные в статье были представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1 и Q3), сравнение отличий между показателями групп проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса, так как группы были независимыми и в сравнении участвовало более 2-х групп. При обнаружении статистически значимых отличий выполняли дальнейшие попарные сравнения с помощью критерия Манна-Уитни. Различия между показателями групп считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований был определен нелинейный характер изменений маркеров окислительного стресса и состояния системы антиоксидантной защиты на фоне реперфузии после ишемии печени крыс в течение 20 минут. Некоторые показатели были резко увеличены в крови сразу после ишемии, некоторые увеличивались чуть позже, но затем снижались, другие параметры характеризовались сниженными значениями относительно контрольной группы. Низкие значения были характерны для концентрации восстановленной формы глутатиона в эритроцитарной взвеси (таблица 1). Однако заметное снижение данного параметра на 13-20% отмечалось только спустя 120 минут после начала периода реоксигенации органа и сохранялось как минимум до 8 часов. Через сутки после начала реперфузии уровень глутатиона в крови животных возвращался к нормальным значениям. Аналогичная тенденция к снижению наблюдалась для содержания общих тиоловых групп в плазме крови (таблица 1). Данный параметр был снижен на 19% уже через 5 минут после снятия зажима с аналога гепатодуоденальной связки крыс, а через 15 минут достигал минимальных значений – на 42% ниже контрольного уровня. Кроме того, уровень тиоловых групп плазмы крови оставался ниже контрольных значений на протяжении всего дальнейшего исследования, в том числе через сутки после начала реперфузии.

Таблица 1

**Изменение показателей тиолового звена системы антиоксидантной защиты эритроцитов и плазмы крови в разные сроки реперфузии после 20-ти минутной ишемии печени крыс (Me(p0,25/p0,75))**

Исследуемые группы / время реперфузии	Исследуемые показатели		
	Глутатион, мкмоль/мл	ГПО, ммоль/л×мин	Общие SH-группы, е.о.п.×100/г белка
Контроль	3,0 (2,8/3,2)	1,7 (1,5/1,8)	0,36 (0,35/0,40)
5 мин	3,2 (2,8/3,2)	4,2 (3,6/4,4)*	0,29 (0,27/0,33)*
15 мин	2,3 (2,0/2,4)*^	1,2 (1,1/1,4)*^	0,21 (0,20/0,24)*^
30 мин	3,0 (2,7/3,0)^	1,8 (1,6/2,0)^	0,30 (0,28/0,33)*^
60 мин	3,2 (2,8/3,3)	1,8 (1,4/1,9)	0,31 (0,29/0,34)*
120 мин	2,6 (2,3/2,7)*^	1,7 (1,5/1,8)	0,25 (0,23/0,29)*^
180 мин	2,6 (2,3/2,7)*	2,1 (1,9/2,3)*^	0,28 (0,26/0,31)*
8 ч	2,4 (2,2/2,4)*	1,7 (1,5/1,9)^	0,26 (0,24/0,29)*
сутки	3,2 (2,9/3,3)^	1,6 (1,5/1,8)	0,30 (0,28/0,34)*

Примечание: \* - статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующего показателя контрольной группы; ^ - статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от показателя предыдущей группы.

Активность ГПО была резко увеличена сразу после начала периода реперфузии – в 2,5 раза относительно контрольных значений соответствующего показателя (таблица 1). Однако уже к 15-й минуте периода реоксигенации уровень активности рассматриваемого фермента снижался, достигая значений даже ниже контрольного уровня на 29%. В дальнейшем активность ГПО поддерживалась в пределах нормальных значений, только в период 180-ти минут после снятия сосудистого зажима с аналога гепатодуоденальной связки фер-

ментативная активность вновь была увеличена на 24%. Каталазная активность эритроцитарной взвеси имела устойчивую тенденцию к увеличению на 43-60% на протяжении реперфузионного периода (таблица 2). Только в период 15-ти и 120-ти минутной реваскуляризации печени отмечалось кратковременное снижение активности данного фермента, а также через сутки после выполнения эксперимента активность каталазы возвращалась к уровню, соответствующему значению показателя группы интактных животных.

Таблица 2

**Изменение показателей системы антиоксидантной защиты эритроцитов в разные сроки реперфузии после 20-ти минутной ишемии печени крыс (Me(p0,25/p0,75))**

Исследуемые группы / время реперфузии	Исследуемые показатели		
	ОАОА (ABTS), % инг	ОАОА (FRAP), мМ вит С	КАТ, моль/л×мин
Контроль	24,5 (22,7/25,6)	0,76 (0,70/0,82)	16,2 (15,4/18,9)
5 мин	29,4 (27,8/30,8)*	0,85 (0,79/0,90)	23,1 (22,0/24,8)*
15 мин	20,8 (19,6/22,0)*^	1,50 (1,32/1,60)*^	19,2 (18,0/21,5)^
30 мин	20,0 (19,2/21,4)*	1,50 (1,33/1,60)*	24,9 (22,5/26,0)*^
60 мин	20,4 (19,3/21,5)*	0,63 (0,58/0,73)^	25,0 (23,9/26,0)*
120 мин	22,3 (20,4/23,0)*	0,50 (0,45/0,60)*	19,6 (17,3/22,1)^
180 мин	11,6 (10,5/12,7)*^	0,49 (0,45/0,56)*	23,0 (21,3/24,7)*
8 ч	11,7 (10,4/13,0)*	0,45 (0,40/0,52)*	25,9 (23,9/27,5)*
сутки	11,3 (10,3/13,0)*	0,65 (0,60/0,72)*	18,2 (16,0/19,2)^

Примечание: \* - статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующего показателя контрольной группы; ^ - статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) от показателя предыдущей группы.

Характер изменений общей АОА, определенной разными методами, имел значительные отличия (таблица 2). Степень радикальной сорбции ABTS плазмы крови кратковременно увеличивалась на 20% к 5-й минуте периода реперфузии, а затем прогрессирующе снижалась. Наиболее значительные изменения данного показателя были определены на 15-й и 180-й минутах после восстановления кровотока в печени крыс. На 180-й минуте реперфузии уровень радикальной сорбции плазмы крови был снижен в 2,1 раза относительно контрольных цифр и не увеличивался даже спустя сутки после начала эксперимента. Общая АОА, определенная железо-восстанавливающим методом, была увеличенной в 2,0 раза в период 15-30-ти минут периода после восстановления кровотока в ткани печени после 20-ти минутной ишемии. К 60-й минуте данный параметр снижался до уровня контрольных значений, а затем и еще ниже. Минимальные значения общей АОА (FRAP) были получены спустя 8 часов реперфузии, но и в данном случае показатель был ниже контроля всего на 41%, а спустя сутки после моделирования ишемического по-

ражения печени отмечалось частичное восстановление анализируемого показателя, который достигал значений ниже контроля всего на 14%.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В изменении изученных показателей окислительного метаболизма прослеживается влияние цитолиза гепатоцитов в период ишемии, что отражается в кратковременном увеличении общей антиоксидантной активности и активности ГПО на начальном этапе реперфузии. При этом активность ГПО, достигая пиковых значений на 5-й минуте после восстановления кровотока, быстро возвращается к нормальным значениям, что характерно и для другого фермента системы глутатиона – глутатион-S-трансферазы плазмы крови. Отсутствие существенных изменений концентрации восстановленной формы глутатиона в первые 60 минут также подтверждает небольшую вовлеченность данного звена эритроцитарной взвеси в регуляцию окислительного метаболизма в период ишемии печени. Как было показано ранее с 60-й минуты начинается активное увеличение активности аминотрансфе-

раз и ЛДГ в плазме крови, что вероятнее всего связано с усилением реперфузионных повреждений органа [9]. С этого же времени определяется сниженный уровень содержания глутатиона в эритроцитах, что указывает на активную вовлеченность данной системы клеток крови в поддержание редокс гомеостаза в периоде восстановления кровотока. Сниженный уровень тиоловых групп плазмы крови на протяжении всего эксперимента обусловлен высокой их чувствительностью к окислению и первоочередной вовлеченностью метаболических систем плазмы крови в распространение патологического процесса на системном уровне. Различный характер реагирования общей АОА, обусловленной радикальной сорбцией или железо-восстанавливающей способностью, указывает более длительную циркуляцию в крови веществ, предположительно вымываемых из поврежденной ткани печени крыс, потенциально обладающих восстанавливающей активностью, однако не способных обеспечить адекватную защиту от распространения свободнорадикальных процессов. Резкое снижение данных параметров на 60-й и 120-й минуте также в некоторой степени обозначает границу дополнительного усиления реперфузионного повреждения печени. Наличие изменений антиоксидантного статуса через сутки после моделирования ишемического поражения органа (сниженные общая АОА и содержание тиоловых групп плазмы крови) указывают на значительную выраженность патологического процесса, не способного за сутки полностью компенсироваться, а также на то, что повышенные значения маркеров цитолиза гепатоцитов [9] не являются просто остаточным явлением, а свидетельствуют о продолжении реперфузионных нарушений и сохранении опасности развития осложнений, в частности печеночной или полиорганной недостаточности. Сравнительно невысокий риск таких осложнений в условиях 20-ти минутной сосудистой изоляции печени крыс подтверждается быстрым (через сутки) восстановлением всех изученных параметров системы антиоксидантной защиты эритроцитов.

### ВЫВОДЫ

Результаты исследования показали, что на ранних сроках реперфузионного периода (5-60 минут) наблюдаются изменения обусловленные цитолизом гепатоцитов в период ишемии органа и вымыванием клеточного содержимого в кровь. Основные проявления реперфузионных повреждений печени развиваются спустя 60 минут после восстановления кровотока и характеризуются резким снижением общей АОА и концентрации восстановленного глутатиона.

Система антиоксидантной защиты плазмы крови первой реагирует на распространение патологического процесса на системном уровне и ее изменения сохраняются спустя сутки после ишемии печени. 20-ти минутная васкулярная эксклюзия печени сопровождается и изменениями антиоксидантного баланса в эритроцитарной взвеси, но данные изменения компенсируются спустя сутки после восстановления кровотока.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121022600268-0.

**Funding.** The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation № 121022600268-0.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Basov A. A., Elkina A. A., Dzhimak S. S., Bikov I. M., Popov K. A., Kozin S. V., Moiseev A. V. Changes in prooxidant-antioxidant system indices in the blood and brain of rats with modelled acute hypoxia which consumed a deuterium-depleted drinking diet. *Biology Bulletin*. 2019;46(6):531-535. doi:10.1134/S1062359019060049.
2. Dzhimak S. S., Basov A. A., Volchenko N. N., Samkov A. A., Baryshev M. G., Fedulova L. V. Changes in the functional activity of mitochondria isolated from the liver of rat that passed the preadaptation to ultra-low deuterium concentration. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;476(1):323-325. doi:10.1134/S1607672917050088.
3. Звягина В. И., Бельских Э. С., Урясьев О. М., Медведев Д. В., Киселева В. А., Твердова Л. В. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2018;13(1-1):78-81. doi:10.14300/mnnc.2018.13022.
4. Saidi R. F., Kenari S. K. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview. *J. Invest. Surg.* 2014;27(6):366-379. doi:10.3109/08941939.2014.932473.
5. Мелконян К. И., Бирюкова А. О., Улитина Н. Н., Русинова Т. В., Юцкевич Я. А., Литвинова М. Г., Быков И. М., Карташевская М. И. Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2019;9(4):55-62.

6. Li Y., Li R., Wang J. Protective effects of fisetin on hepatic ischemia-reperfusion injury through alleviation of apoptosis and oxidative stress. *Arch Med Res.* 2021;52(2):163-173. doi:10.1016/j.arcmed.2020.10.009.

7. Boteon Y. L., Boteon A. P. C. S. Impact of graded donor liver steatosis on ischemia-reperfusion injury after liver transplantation: where are we now? *J Clin Exp Hepatol.* 2021;11(1):157-158. doi:10.1016/j.jceh.2020.06.007.

8. Wang P. P., Huang X., Yang M. W., Fang S. Y., Hong F. F., Yang S. L. Effects of non-drug treatment on liver cells apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2021:119321. doi:10.1016/j.lfs.2021.119321.

9. Попов К. А., Цымбалюк И. Ю., Сепиашвили Р. И., Быков И. М., Устинова Е. С., Быков М. И. Выбор оптимального маркера острого повреждения печени крыс в эксперименте. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.* 2020;24(4):293-303. doi:10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303.

10. Richelmi P., Ferrigno A., Berardo C. Changes in glutathione content in liver diseases: an update. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(3):364. doi:10.3390/antiox10030364.

11. Вяткин А. В., Пастушкова Е. В., Феofilактова О. В. Обзор методов определения общей антиоксидантной активности. *Современная наука и инновации.* 2018;21(1):58-66.

12. Карпищенко А. И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб: Интермедика, 2002.

## REFERENCES

1. Basov A.A., Elkina A.A., Dzhimak S.S., Bikov I.M., Popov K.A., Kozin S.V., Moiseev A.V. Changes in prooxidant-antioxidant system indices in the blood and brain of rats with modelled acute hypoxia which consumed a deuterium-depleted drinking diet. *Biology Bulletin.* 2019;46(6):531-535. doi: 10.1134/S1062359019060049.

2. Dzhimak S. S., Basov A. A., Volchenko N. N., Samkov A. A., Baryshev M. G., Fedulova L. V. Changes in the functional activity of mitochondria isolated from the liver of rat that passed the preadaptation to ultra-low deuterium concentration. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017;476(1):323-325. doi:10.1134/S1607672917050088.

3. Zvyagina V. I., Belskikh E. S., Uryasev O. M., Medvedev D. V., Kiseleva V. A., Tverdova L. V. Influence of carnitine chloride on mitochondria of the heart of rats during the modeling of hyperhomocyste. *Medical News of North Caucasus.* 2018;13(1-1):78-81. doi:10.14300/mnnc.2018.13022. (In Russ.)

4. Saidi R. F., Kenari S. K. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview. *J. Invest. Surg.* 2014;27(6):366-379. doi:10.3109/08941939.2014.932473.

5. Melkonyan K. I., Biryukova A. O., Ulitina N. N., Rusinova T. V., Yutskevich Y. A., Litvinova M. G., Bykov I. M., Kartashevskaya M. I. Extracellular matrix components in repair of damaged tissues: biochemical interactions and protective effect. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2019;9(4):55-62. (In Russ.)

6. Li Y., Li R., Wang J. Protective effects of fisetin on hepatic ischemia-reperfusion injury through alleviation of apoptosis and oxidative stress. *Arch Med Res.* 2021;52(2):163-173. doi:10.1016/j.arcmed.2020.10.009.

7. Boteon Y. L., Boteon A. P. C. S. Impact of Graded Donor Liver Steatosis on Ischemia-Reperfusion Injury After Liver Transplantation: Where are We now? *J Clin Exp Hepatol.* 2021;11(1):157-158. doi:10.1016/j.jceh.2020.06.007.

8. Wang P. P., Huang X., Yang M. W., Fang S. Y., Hong F. F., Yang S. L. Effects of non-drug treatment on liver cells apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2021:119321. doi:10.1016/j.lfs.2021.119321.

9. Popov K. A., Tsymbalyuk I. Y., Sepiashvili R. I., Bykov I. M., Ustinova E. S., Bykov M. I. Optimum marker selection of acute liver damage in rats in the experiment. *RUDN Journal of MEDICINE.* 2020;24(4):293-303. doi:10.22363/2313-0245-2020-24-4-293-303.

10. Richelmi P., Ferrigno A., Berardo C. Changes in glutathione content in liver diseases: an update. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(3):364. doi:10.3390/antiox10030364.

11. Vyatkin A. V., Pastushkova E. V., Feofilaktova O. V. The review of methods for antioxidant activity determination. *Modern Science and Innovation.* 2018;21(1):58-66. (In Russ.)

12. Karpishchenko A.I. Handbook. Medical Laboratory Technology. Sankt-Petersburg: Intermedika, 2002. (In Russ.)

- Feces, and Saliva. *Exp Suppl.* 2015;106:245-252. doi:10.1007/978-3-0348-0955-9\_11.
47. Patel R. S., Jakymiw A., Yao B., Pauley B. A., Carcamo W. C., Katz J., Cheng J. Q., Chan E. K. High resolution of microRNA signatures in human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2011 Dec;56(12):1506-13. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.05.015.
48. Zhang L., Xiao H., Karlan S., Zhou H., Gross J, Elashoff D., Akin D., Yan X., Chia D., Karlan B., Wong D. T. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One.* 2010 Dec 31;5(12):e15573. doi:10.1371/journal.pone.0015573.
49. Sugimoto M., Wong D. T., Hirayama A., Soga T., Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics.* 2010 Mar;6(1):78-95. doi:10.1007/s11306-009-0178-y.
50. Takayama T, Tsutsui H, Shimizu I, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, Inoue K, Todoroki K, Min JZ, Mizuno H, Toyo'oka T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2016 Jan 15;452:18-26. doi:10.1016/j.cca.2015.10.032.
51. Brooks M. N., Wang J., Li Y., Zhang R., Elashoff D., Wong D. T. Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients. *Mol Med Rep.* 2008 May-Jun;1(3):375-8.
52. Streckfus C. F., Bigler L. A Catalogue of Altered Salivary Proteins Secondary to Invasive Ductal Carcinoma: A Novel In Vivo Paradigm to Assess Breast Cancer Progression. *Sci Rep.* 2016 Aug 1;6:30800. doi: 10.1038/srep30800.
53. Bernstein C., Nfonsam V., Prasad A. R., Bernstein H. Epigenetic field defects in progression to cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2013 Mar 15;5(3):43-9. doi: 10.4251/wjgo.v5.i3.43.
54. Li F., Adam L., Vadlamudi R. K., Zhou H., Sen S., Chernoff J., Mandal M., Kumar R. p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Rep.* 2002 Aug;3(8):767-73. doi:10.1093/embo-reports/kvf157.
55. Farahani H., Amri J., Alae M., Mohaghegh F., Rafiee M. Serum and Saliva Levels of Cancer Antigen 15-3, Carcinoembryonic Antigen, Estradiol, Vaspin, and Obestatin as Biomarkers for the Diagnosis of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Lab Med.* 2020 Nov 2;51(6):620-627. doi:10.1093/labmed/lmaa013.
56. Streckfus C. F. Salivary Biomarkers to Assess Breast Cancer Diagnosis and Progression: Are We There Yet? Saliva and Salivary Diagnostics, Sridharan Gokul, IntechOpen, 2019. doi:10.5772/intechopen.85762. Available from: <https://www.intechopen.com/books/saliva-and-salivary-diagnostics/salivary-biomarkers-to-assess-breast-cancer-diagnosis-and-progression-are-we-there-yet->.

УДК 616.33 [002.44-006]-036.22(571.513)

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-2-47-54

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕНДЕНЦИИ КАРДИОЭЗОФАГЕАЛЬНОГО РАКА ЖЕЛУДКА И РАКА ПИЩЕВОДА В РЕСПУБЛИКЕ ХАКАСИЯ

Штыгашева О. В.<sup>1</sup>, Агеева Е. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», 655000, Республика Хакасия, г. Абакан, Россия

<sup>2</sup>Кафедра биологии медицинской Академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Агеева Елизавета Сергеевна, заведующий кафедрой биологии медицинской Академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

**For correspondence:** Ageeva E. S., MD, the head of the department of Medical Biology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

### Information about authors:

**Shtygasheva O. V.**, <http://orcid.org/0000-0002-5522-1148>

**Ageeva E. S.**, <http://orcid.org/0000-0003-3770-2965>

### РЕЗЮМЕ

Цель. Анализ эпидемиологических особенностей рака желудка проксимальной локализации и рака пищевода в популяции Республики Хакасия. Материалы и методы. Исследовано 142 случая рака пищевода и 684 случая рака желудка, включая 74 инцидента проксимальной локализации, сплошным методом за 2015-2019 годы (100%). Во всех случаях диагноз установлен согласно МКБ-Х, TNM (2009) и верифицирован морфологически. Сравнивали две генеральные совокупности пациентов с раком пищевода и раком желудка, с периодизацией возраста по десятилетиям. Результаты. Фиксируется рост заболеваемости раком пищевода в 1,4 раза, раком желудка в 1,1 раза, доли кардиоэзофагального рака желудка до 17,6%, сохраняются высокие позиции III-IV стадий заболеваний при диагностике (80%). Морфологический профиль: в пищеводе доминирует плоскоклеточный рак (86,6%), в желудке – аденокарцинома (96,2%). Мужчины болеют чаще женщин: раком желудка без уточнения локализации в 1,26 раза, кардиоэзофагальным раком желудка – в 1,64 раза, раком пищевода – в 4,9 раза. Исключение составляют опухоли дна желудка, где не выявлено статистически значимых гендерных различий. Манифестация ЗНО после 50 лет фиксируется в 94,4 % инцидентов рака пищевода, 96 % - кардиоэзофагального рака желудка. Типичный возраст дебюта рака пищевода 60-69 лет (42,9%). Каждый второй пациент (50%) с кардиоэзофагальным раком желудка старше 70 лет. Заключение. Заболеваемость кардиоэзофагальным раком желудка и раком пищевода увеличивается, в большинстве случаев дебют заболевания происходит в возрасте старше 50 лет, доля мужчин выше.

**Ключевые слова:** рак пищевода, кардиоэзофагальный рак желудка, заболеваемость, возраст манифестации, гендерные отличия.

### EPIDEMIOLOGICAL TRENDS OF CARDIOESOPHAGEAL GASTRIC CANCER AND ESOPHAGOS CANCER IN THE REPUBLIC OF KHAKASIA

Shtygasheva O. V.<sup>1</sup>, Ageeva E. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katanov Khakass State University, Abakan, Russia

<sup>2</sup>Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

Aim to analysis of the epidemiological characteristics of gastric cancer of proximal localization and esophagus cancer in the population of the Republic of Khakassia. Materials and methods. We studied 142 cases of esophagus cancer and 684 cases of gastric cancer, including 74 incidents of proximal localization by the continuous method for 2015-2019 (100%). In all cases, the diagnosis was established according to ICD 10 revision, TNM (2009) and verified morphologically. The study of the clinical debut of malignant tumors was carried out by comparing the general populations of patients with esophagus cancer and gastric cancer of proximal localization over a 5-year period, dividing for 10-year-period groups. Results. There is an increase in the incidence rate of cancer of the esophagus by 1.4 times, gastric cancer by 1.1 times, and the share of cardioesophageal cancer of the stomach to 17.6%. Squamous cell carcinoma dominates in the morphological structure in case of cancer of the esophagus (86, 6%), and adenocarcinoma (96.2%) in case of gastric cancer. Men have 1.26 times more often with gastric cancer of all localizations than women, 1.64 times more with cardioesophageal cancer of the stomach, 4.9 times more in patients with cancer of the esophagus, consistently. An exception are tumors of the bottom of the stomach (men are 0.75 times less than women). In cancer of the esophagus, the most frequent manifestation age is 60-69 years (42.9%). With cardioesophageal cancer of the stomach, every second patient is over 70 years old. Conclusion. The incidence of cardioesophageal cancer of the stomach and cancer of the esophagus is increasing.

**Key words:** incidence, cancer of the esophagus, cardioesophageal cancer of the stomach, age of manifestation.

Первичная локализация злокачественного образования в желудке детерминирует клинические признаки и прогноз заболевания. Между РЖ проксимальной и дистальной локализациями имеются эпидемиологические, этиологические и патогенетические различия. Кардиальная форма РЖ проявляет сходство с раком пищевода. Не смотря на противоречия относительно дефиниции РЖ проксимального отдела и объяснения причин роста ЗНО данной локализации, авторы солидарны по вопросу ключевых особенностей КЭРЖ. Эпителиальные опухоли кардиального отдела желудка характеризуются высоким уровнем инфильтрации пищевода, метастазы распространяются не только в абдоминальные, но и в медиастинальные лимфоузлы, что позволяет характеризовать опухоли данной локализации и как РЖ, и как РП. КЭРЖ имеет еще более неблагоприятный прогноз, чем изолированные опухоли пищевода или желудка. РЖ наиболее частая форма ЗНО, занимает высокие позиции в структуре смертности [1]. Несколько десятилетий регистрируются амбивалентные процессы, связанные с распространенностью РЖ: снижение заболеваемости и увеличение доли проксимальной локализации [2; 3]. Частота аденокарциномы проксимального отдела желудка и зоны пищеводно-желудочного перехода в США увеличивается интенсивнее, чем другие ЗНО, такие случаи составляли 16% в 1960 году, 44% - к началу 80-х, более 60% от всех заболевших раком желудка к концу 90-х годов [4; 5].

Проксимальная локализация (дно желудка) чаще других встречается при EBV-ассоциированном раке желудка, с высокой частотой мутации PIK3CA (80-90%), ARID1A, амплификацией гена JAK2 и HER2, гиперэкспрессией PD-L1/2, у мужчин в 81% случаев. Другой подтип опухоли с основной локализацией в пищеводно-желудочном переходе обусловлен хромосомной нестабильностью, его характеризуют грубые нарушения в геноме опухолевой ДНК, превалирует мутация гена p53 (73% случаев), амплификация генов семейства ERBB (EGFR, HER-2, ERBB-3) [6; 7]. Заболеваемость РП варьирует в зависимости от пола, этнической принадлежности, социального статуса. РП редкое заболевание в Армении, Мали, Израиле, Вьетнаме (1,7-2,2 на 100 тыс. населения), а в популяциях Каспийского побережья, Монголии, северо-западного Китая, Средней и Центральной Азии 100 случаев на 100 тыс. населения. В России заболеваемость РП у мужчин и женщин 7,6 и 2,4 случая на 100 тыс. населения, соответственно. Среди 7750 новых инцидентов преобладали III (33,6%) и IV (30,9%) стадии, летальность в течение первого года – 59,0%. Плоскоклеточный

рак - самая частая морфологическая форма РП в нашей стране (80-90%). В США ежегодно диагностируется до 13 тыс. новых случаев РП (5 на 100 тыс. населения), среди них преобладает аденокарцинома [1]. Молекулярные механизмы пищевода канцерогенеза характеризуются нарушением ДНК-репарации (полиморфизм гена XRCC1, TP53, SPRP3) [8; 9; 10].

Цель исследования: анализ эпидемиологических особенностей РЖ проксимальной локализации и РП в популяции Республики Хакасия.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовано 142 случая рака пищевода (С15.0-9) и 684 случая РЖ (С16.0-9), включая 74 инцидента проксимальной локализации (С16.0 и С16.1) сплошным методом за 2015, 2016, 2017, 2018, 2019 годы (100%). Во всех случаях диагноз установлен согласно МКБ-Х, TNM (2009) и верифицирован морфологически в ГБУЗ Республики Хакасия «Республиканский клинический онкологический диспансер». Данные получены на основании Канцер-регистра и медицинской документации: регистрационная карта больного злокачественным новообразованием (ф. 030/ГРР), извещение о больном с впервые в жизни установленным диагнозом рака или другого злокачественного новообразования (ф. 090/у), статистический талон для регистрации заключительных (уточненных) диагнозов (форма N 025-2/у).

Показатели заболеваемости рассчитывали как отношение числа впервые зарегистрированных инцидентов к средней численности населения данной группы, умноженное на 100000 населения (100 тыс.). Возраст манифестации исследован методом сравнения генеральных совокупностей пациентов с РП и РЖ за пятилетний период, разделив каждую из них на семь возрастных групп.

Статистическая обработка с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 с применением непараметрических методов. Для оценки статистической значимости различий между группами пациентов использовался критерий Пирсона ( $\chi^2$ ), критический уровень значимости был принят при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В структуре онкологической заболеваемости Республики Хакасия (2019 г.) РП занимает 7 место (3% всех ЗНО) в мужской популяции и 15-е место (0,3%) в женской популяции. При сравнении конечных точек пятилетнего периода (2015 г. и 2019 г.) заболеваемость РП увеличилась в 1,4 раза, составляя 3,9 и 5,4 на 100 тыс. населения, соответственно (табл. 1). Доминирует плоско-



клеточный рак ( $86,6 \pm 1,7\%$ ,  $p < 0,05$ ), аденокарцинома ( $10,6 \pm 2,3\%$ ) и недифференцированный рак ( $5,0 \pm 2,1\%$ ,  $p < 0,05$ ) встречаются значительно реже. Среди пациентов с впервые установленным диагнозом РП 80,0% имели III-IV стадию заболевания, одногодичная выживаемость со-

ставляет 28,6%, а пятилетняя – 18,7%. В генеральной совокупности пациентов с РП ( $n=142$ ) мужчин в 5 раз больше, чем женщин ( $82,8 \pm 4,6$  и  $17,2 \pm 4,6\%$ ,  $p < 0,05$ ) (таблица 2), заболеваемость мужчин и женщин РП на 100 тыс. населения, соответственно, 6,9 и 1,1 ( $p < 0,05$ ) (табл. 1, табл. 2)

Таблица 1

**Заболеваемость раком пищевода и раком желудка проксимальной локализации на 100000 населения, Республика Хакасия (2015-2019 гг.)**

Год	Рак пищевода, на 100 тысяч населения			Рак желудка проксимальной локализации, на 100 тысяч населения				
	М+Ж	М	Ж	М+Ж	Кардиальный отдел		Область дна	
					М	Ж	М	Ж
2015	3,9	6,7	1,7	2,0	3,2	0,8	0,4	0
2016	3,9	6,3	2,0	2,4	1,8	2,0	0,4	3,4
2017	3,7	8,0	0,3	2,8	4,5	1,1	0,3	0
2018	5,2	9,1	2,0	2,3	2,8	1,7	0	0,3
2019	5,4	11,1	0,8	2,0	2,8	1,1	0	0,3
Всего	3,7	6,9	1,1	1,9	2,5	1,1	0,2	0,2

Примечание. М – мужчины, Ж – женщины. 1 - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении показателей между мужчинами и женщинами (критерий  $\chi^2$ ).

Таблица 2

**Структура пациентов с раком пищевода и раком желудка проксимальной локализации по полу, Республика Хакасия (2015-2019 гг.)**

Год	Рак пищевода			Рак желудка проксимальной локализации				
	Всего, n	М, n (%)	Ж, n (%)	Всего, n	Кардиальный отдел		Область дна	
					М, n (%)	Ж, n (%)	М, n (%)	Ж, n (%)
2015	25	19 (76)	6 (24)	13	9 (69,2)	3 (23,1)	1 (7,1)	0
2016	25	18 (72)	7 (28)	15	5 (33,3)	7 (46,7)	1 (6,7)	12 (13,3)
2017	24	23 (96)	1 (4)	18	13 (72,3)	4 (22,2)	1 (5,5)	0
2018	33	26 (79)	7 (21)	15	8 (53,3)	6 (40,0)	0	1 (6,7)
2019	35	32 (91)	3 (9)	13	8 (61,5)	4 (30,8)	0	1 (7,7)
Всего	142	118 (82,8 $\pm$ 4,6)	24 (17,2 $\pm$ 4,6 1)	74	43 (57,9 $\pm$ 6,9)	24 (32,5 $\pm$ 4,8 1)	3 (3,8 $\pm$ 1,6)	4 (5,5 $\pm$ 2,5)

Примечание. n – количество человек, М – мужчины, Ж – женщины. 1 - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении показателей между мужчинами и женщинами (критерий  $\chi^2$ ).

Симультанное сравнение конечных точек 2015 г. и 2019 г. фиксирует рост заболеваемости РЖ в Хакасии в 1,1 раза (23,9 и 26,2 на 100 тыс. населения, соответственно). В течение десятилетия фиксируется лабильность этих показателей. В 2008г. и 2012г. рост заболеваемости (26,0 и 30,4 на 100 тыс. населения, соответственно), в 2013г. и 2017 г. снижение (25,5 и 21,4 на 100 тыс. населения, соответственно).

Генеральная совокупность пациентов с РЖ ( $n=684$ ) в 4,8 раза больше, чем генеральная сово-

купность пациентов с РП ( $n=142$ ). Морфологический профиль РЖ зеркально отражает аналогичную структуру РП: аденокарцинома – 96,2%, плоскоклеточный рак – 1,4%, недифференцированный рак – 2,6%. Доля проксимальной локализации РЖ фиксировалась со средней частотой 17,6% (min 14,0%, max 22,0%), в 2013 г. – 2017 г. данная локализация составляла 10,2% случаев. Одновременно с трендом на увеличение инцидентов КЭРЖ, у значительной части пациентов повышается доля РЖ с признаками запущенно-

сти онкологического заболевания (неуточненная локализация опухоли – 21,0%; опухоль, выходящая за пределы одной локализации – 39,0%).

В структуре пациентов с КЭРЖ (n=74) преобладала локализация в кардиальном отделе – 90,5% (n=67), опухоли в дне желудка составили 9,5% (n=7); из них у мужчин – 62% (n=46), женщин – 38% (n=28). Подобной гендерной тенденцией характеризуется РЖ кардиального отдела: мужчины доминируют по сравнению с женщинами (57,9±6,9 и 32,5±4,8 %) в 1,79 раза (заболеваемость 2,5 и 1,1 на 100 тыс. населения, соответственно). При локализации РЖ в области

дна статистически значимых различий между мужчинами и женщинами не выявлено (табл. 1, табл. 2).

В генеральной совокупности пациентов с РП интенсификация роста больных фиксируется в возрасте 50-59 лет (21,8% случаев), заболеваемость 0,81 случаев на 100 тыс. населения, достигая максимума в следующем десятилетии 60-69 лет (42,9%), заболеваемость 1,59 случаев на 100 тыс. населения. Число инцидентов РП снижается в 70-79 лет (16,9% / 0,69 случаев на 100 тыс. населения) и после 80 лет (12,7% / 0,47 случаев на 100 тыс. населения) (табл. 3, табл. 4).

Таблица 3

**Структура пациентов раком пищевода и раком желудка по полу и возрастным группам, Республика Хакасия (2015-2019 гг.)**

Возраст, лет	Рак пищевода			Рак желудка всех локализаций			Проксимальный рак желудка		
	Всего, n (%)	М, n (%)	Ж, n (%)	Всего, n	М, n (%)	Ж, n (%)	Всего, n	М, n (%)	Ж, n (%)
20-29	0	0	0	3 (0,4)	1 (33,3)	2 (66,7)	0	0	0
30-39	2 (1,5)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (1,6)	7 (58,3)	5 (41,7)	0	0	0
40-49	6 (4,2)	5 (83,3)	1 (16,7)	41 (5,8)	25 (60,9)	16 (39,1)	3 (4,1)	1 (33,3)	2 (66,7)
50-59	31 (21,8)	30 (96,8)	1 (3,2)	109 (15,8)	70 (64,2)	39 (35,8)	11 (14,0)	8 (73,7)	3 (26,3)
60-69	61 (42,9)	50 (81,9)	11 (18,1)	243 (35,4)	142 (58,4)	102 (41,6)	23 (31,1)	17 (73,9)	6 (26,1)
70-79	24 (16,9)	22 (91,7)	2 (8,3)	168 (25,5)	194 (54,2)	77 (45,8)	24 (33,2)	15 (62,5)	9 (37,5)
80	18 (12,7)	10 (55,6)	8 (44,4)	108 (15,7)	46 (42,6)	62 (57,4)	13 (17,6)	5 (38,6)	8 (61,4)
Всего	142	118 (76,6±7,8)	24 (23,5±7,4 1)	684	382 (53,1±4,2)	302 (46,8±4,2)	74	46 (40,3±11,9)	28 (31,1±10,0 1)

Примечание. n – количество человек, М – мужчины, Ж – женщины. 1 - статистическая значимость (p<0,05) различий при сравнении показателей между мужчинами и женщинами (критерий  $\chi^2$ ).

Возраст 60-69 лет критичен для манифестации РП вне зависимости от пола. Однако в этот период у женщин заболеваемость 0,52 случаев на 100 тыс. населения, а у мужчин – 2,91 случаев на 100 тыс. населения (выше в 5,6 раза), поскольку первый существенный рост инцидентов РП в мужской популяции произошел раньше (50-59 лет). Для пациентов с РП возраст клинического дебюта чаще всего в 50-69 лет (64,8%), треть пациентов (29,5%) старше 70 лет. Молодых пациентов (до 50 лет) – 5,6% (инцидентов РП в 20-29 лет нет). Доля мужчин превалирует, кратность соотношения изменяется с возрастом. В группе пациентов РП до 50 лет мужчин боль-

ше, чем женщин в 3 раза, в возрасте 50-69 лет в 6,66 раза, после 70 лет – в 3,2 раза (табл. 3).

В течение длительного периода наблюдения заболеваемость РЖ у мужчин Хакасии выше, чем у женщин [27]. Данная закономерность в 2015 г. – 2019 г. не изменилась: среди мужчин (n=382) заболеваемость на 100 тыс. населения – 9,9 случаев и среди женщин (n=302) – 7,9 случаев (в 1,26 раза). В генеральной совокупности пациентов РЖ больных старше 50 лет – 91,8 % (среди них: 50-69 лет – 51,5%; старше 70 лет – 40,4%). Традиционный возраст манифестации заболевания 50–69 лет (45,9%), в этом возрасте заболеваемость РЖ на 100 тыс. населения сре-

Таблица 4

Заболееваемость раком пищевода и раком желудка на 100000 населения по полу и возрастным группам, Республика Хакасия(2015-2019 гг.)

Возраст, лет	Рак пищевода на 100 тысяч населения			Рак желудка всех локализаций на 100 тысяч населения			Проксимальный рак желудка на 100 тысяч населения		
	Всего	М	Ж	Всего	М	Ж	Всего	М	Ж
20-29	0	0	0	0,87	0,03	0,05	0	0	0
30-39	0,05	0,06	0,05	0,03	0,18	0,13	0	0	0
40-49	0,16	0,29	0,05	1,07	0,65	0,42	0,08	0,03	0,05
50-59	0,81	1,75	0,05	2,84	1,82	1,01	0,29	0,21	0,08
60-69	1,59	2,91	0,52	6,32	3,69	2,63	0,61	0,44	0,16
70-79	0,62	1,28	0,11	4,37	2,37	2,0	0,62	0,39	0,23
80	0,47	0,58	0,38	2,81	1,21	1,61	0,34	0,13	0,21
Всего	3,7	6,9	1,11	17,8	9,9	7,9	1,92	1,21	0,731

Примечание. М – мужчины, Ж – женщины. 1 - статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) различий при сравнении показателей между мужчинами и женщинами (критерий  $\chi^2$ ).

ди женщин составляет 3,64 случая, среди мужчин – 5,61 случая. Доля молодых пациентов (до 50 лет) – 8,1% случаев (заболеваемость 1,97 на 100 тыс.), она превышает долю пациентов аналогичного возраста с РП и КЭРЖ (табл. 3, 4).

Среди пациентов с КЭРЖ удельный вес молодых (до 50 лет) самый низкий (4% / 0,08 случаев на 100 тыс. населения). РЖ проксимальной локализации дебютирует в период 40-49 лет. После 50 лет число больных увеличивается в 3,6 раза, а в следующее десятилетие (60-69 лет) удваивается. Каждый второй пациент (50%) старше 70 лет. Доминирование мужчин по отношению к женщинам при данной локализации рака усиливается в направлении уменьшения возраста: среди пациентов старше 70 лет мужчин больше в 1,2 раза; в возрасте 50 – 69 лет – в 2,8 раза каждое десятилетие (табл. 3, 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Рак пищевода, занимая VIII место в мире в структуре заболеваемости ЗНО, имеет один из самых высоких индексов агрессивности опухоли – 0,87 по соотношению количества умерших к количеству заболевших [11; 12]. В США и странах Западной Европы установилась тенденция роста аденокарциномы (более 50%) и снижения доли плоскоклеточного РП [13; 14], характерная для мужчин и женщин одновременно [15; 16]. В формировании аденокарциномы пищевода доказана причинно-следственная связь с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью [17]. В тоже время в странах «азиатского пояса рака пищевода», как Турция, Иран, Казахстан, северный и центральный Китай, юго-восточная

Африка сохраняется распространенность плоскоклеточного рака [18], достигающая 90% среди всех форм РП. Подобная картина характерна для РП в Хакасии (доли плоскоклеточного рака – 86,6%, аденокарциномы – 28,4%).

В ходе исследования GWAS выявлены генетические детерминанты плоскоклеточного РП, особенно у лиц употребляющих алкоголь и табак [20]. Роль факторов риска развития плоскоклеточного РП, которые невозможно модифицировать – мужской пол и увеличение возраста старше 50 лет подтверждена и в популяции Хакасии. С мужским полом имманентно могут быть связаны другие факторы риска, обусловленные стилем жизни, установленные в когорте пациентов с РЖ [20]. Вместе с тем, в странах с высоким риском развития РП не обнаружено различий у мужчин и женщин в показателях заболеваемости [21].

РЖ является ведущей причиной смерти от ЗНО в России (2-е место у мужчин, 3-е место у женщин). Большинство случаев связано с увеличением инцидентов, выявленных на IV стадии заболевания [22]. Распределение показателей заболеваемости РЖ по России и Западно-Сибирскому региону неравномерно. Некоторые авторы рассматривают среди факторов региональной специфики ландшафт, сейсмичность, плотность населения и др. Основные детерминанты – ранняя экспозиция и высокая контаминация *Helicobacter pylori* среди населения, употребление крепких алкогольных напитков, курение. Амбивалентные тенденции – постепенное снижение заболеваемости РЖ и увеличение доли рака проксимальной локализации – при-

сути распространенности РЖ в нашей стране. В ряде сибирских регионов доля КЭРЖ за последнее десятилетие возросла почти в 2 раза. Заболеваемость РЖ остается на высоком уровне, лидирует аденокарцинома [22]. Перечисленные аспекты в полной мере характерны для популяции Хакасии. Кроме того, данные о том, что уровень заболеваемости КЭРЖ у мужчин достоверно выше, чем у женщин, а увеличение возраста является фактором риска (КЭРЖ в 70% случаев манифестирует в 50-60 лет) согласуются с выводами других авторов.

В тоже время в Японии, где распространенность РЖ фиксируется как самая максимальная в мире, а заболевание в 60 % случаев выявляется на первой стадии, дистальная локализация опухоли сохраняет значительные позиции. Японские исследователи рассчитывают на снижение частоты инфицирования *Helicobacter pylori* в стране до 20% к 2030 году, с этим прогнозом связано ожидание уменьшения частоты РЖ антрального отдела и увеличение доли проксимального РЖ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследуемый 5-летний период в Хакасии зафиксированы следующие эпидемиологические тенденции: рост заболеваемости РП в 1,4 раза, РЖ в 1,1 раза; в структуре РЖ увеличилась доля КЭРЖ (17,6%); высокие позиции III–IV стадий этих ЗНО при диагностике. В морфологическом профиле РП доминирует плоскоклеточная форма (86,6%), а в желудке – аденокарцинома (96,2%). Инициация ЗНО данных локализаций выше у мужчин. При сравнении генеральных совокупностей, отмечается усиление половых различий при проксимальной локализации: мужчины чаще женщин болеют РЖ в 1,26 раз; дифферент усиливается при КЭРЖ в 1,64 раза, при РП в 4,9 раза. Исключение составляют опухоли дна желудка, где статистически значимых различий между мужчинами и женщинами не выявлено. Манифестация РП и КЭРЖ после 50 лет отмечается в подавляющем числе случаев (94,4 и 96%, соответственно). Возраст 60-69 лет самый частый для клинического дебюта РП (42,9%). Каждый второй пациент КЭРЖ старше 70 лет. В генеральной совокупности пациентов с РЖ пул больных в возрасте старше 50 лет увеличивается в геометрической прогрессии (в 11 раз) в сравнении с пулом больных до 50 лет, пик инцидентов фиксируется период 60–69 лет.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М.: МНИ-ОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.
2. Devesa S. S., Blot W. J., Fraumeni J. F. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer*. 1998;83(10):2049–2053.
3. Souza R. F., Spechler S. J. Concepts in the prevention of Adenocarcinoma of the distal Esophagus and Proximal Stomach. *CA Cancer J. Clin.* 2005;55:334–351.
4. Nomura A., Stemmermann G. N., Chyou P. H., Kato I., Perez-Perez G. I., Blaser M. J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese American in Hawaii. *N Engl. J. Med.* 1991; 325: 1132–1136. doi:10.1056/NEJM199110173251604.
5. Pera M., Cameron A. J., Trastek V. F., Carpenter H. A., Zinsmeister A. R. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology*. 1993; 104: 510–513. doi:10.1016/0016-5085(93)90420-h
6. Bass A. J., Thorsson V., Shmulevich I., Reynolds S. M., Miller M., Bernard B., Hinoue T. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517): 202–209. doi:10.1038/nature13480.
7. Ratti M., Lampis A., Hahne J. C., Passalacqua R., Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018; 75 (22): 4151–4162. doi: 10.1007/s00018-018-2906-9.
8. Kaur J., Sambyal V., Guleria K., Singh N. R., Uppal M. S., Manjari M., Sudan M. Association of XRCC1, XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism with esophageal cancer risk. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2020;13:73-86. doi https://doi.org/10.2147/CEG.S232961.
9. Янкин А. В. Рак пищевода: от статистики к диагностике. *Журнал практическая онкология*. 2003;4(2):62.
10. Zhang S. S., Huang Q. Y., Yang H., Xie X., Luo K. J., Wen J., Cai X. L., Yang F., Hu Y., Fu J. H. Correlation of p53 status with the response to chemotherapy-based treatment in esophageal cancer: a meta-analysis. *Ann. Surg. Oncol.* 2013;20:2419–2427. doi: 10.1245/s10434-012-2859-4.
11. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN; 2012.

12. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2013;19:5598–5606.

13. Napier K. J., Scheerer M., Misra S. Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World Journal of Gastrointestinal Oncology.* 2014;6:112–120.

14. Bosetti C., Levi F., Ferlay J., Garavello W., Lucchini F., Bertuccio P., Negri E., La Vecchia C. Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe. *Int. J. Cancer.* 2008;122:1118–1129.

15. Domper Arnal M. J., Arenas F., Arbeloa L. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(26): 7933–7943. doi:10.3748/wjg.v21.i26.7933.

16. Pennathur A., Gibson M. K., Jobe B. A., Luketich J. D. Oesophageal carcinoma. *Lancet.* 2013;381:400–412.

17. Lin J., Zeng R., Cao W., Luo R., Chen J., Lin Y. Hot beverage and food intake and esophageal cancer in southern China. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011;12:2189–2192.

18. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 5598–5606.

19. Zhang H.Z., Jin G.F., Shen H.B. Epidemiologic differences in esophageal cancer between Asian and Western populations. *Chin. J. Cancer.* 2012; 31: 281–286.

20. Штыгашева О.В., Агеева Е.С. Синергизм факторов, способствующих развитию язвенной болезни желудка и раку желудка. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2019; 172 (12): 65–70.

Shtygasheva O.V., Ageeva E.S. [Synergies of factors contributing to the development of gastric ulcer and gastric cancer.] *Experimental and clinical gastroenterology,* 2019; 172 (12): 65–70. (in Russian).

21. Кит О.И., Водолажский Д.И., Базаев А.Л., Златник Е.Ю., Колесников Е.Н., Трифанов В.С., Харин Л.В., Кутилин Д.С. Молекулярные маркеры плоскоклеточного рака пищевода. *Современные проблемы науки и образования.* 2017; 5: 2-14.

Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Bazaev A.L., Zlatnik E.Yu., Kolesnikov E.N., Trifanov V.S., Kharin L.V., Kutulin D.S. [Molekuljarnye markery ploskokletochnogo raka pishhevoda Molecular markers of esophageal squamous cell carcinoma] *Modern problems of science and education.* 2017; 5: 2-14. (in Russian).

22. Нечунаев В.П., Агеев А.Г., Панасьян А.У., В.П. Цивкина. Эпидемиологические аспекты

заболеваемости раком желудка и кардии в алтайском крае. *Бюллетень медицинской науки.* – 2017. - №2 (6). – С. 72-78.

## REFERENCES

1. The status of cancer care for the population of Russia in 2018. Aditor for A. D. Kaprina, V. V. Starinskogo, G. V. Petrovoj. M.: MNIOI im. P.A. Gercena – filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii; 2019. (In Russ.).

2. Devesa S. S., Blot W. J., Fraumeni J. F. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer.* 1998;83(10):2049–2053.

3. Souza R. F., Spechler S. J. Concepts in the prevention of Adenocarcinoma of the distal Esophagus and Proximal Stomach. *CA Cancer J. Clin.* 2005;55:334–351.

4. Nomura A., Stemmermann G. N., Chyou P. H., Kato I., Perez-Perez G. I., Blaser M. J. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese American in Hawaii. *N Engl. J. Med.* 1991; 325: 1132–1136. doi:10.1056/NEJM199110173251604.

5. Pera M., Cameron A. J., Trastek V. F., Carpenter H. A., Zinsmeister A. R. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology.* 1993; 104: 510–513. doi:10.1016/0016-5085(93)90420-h

6. Bass A. J., Thorsson V., Shmulevich I., Reynolds S. M., Miller M., Bernard B., Hinoue T. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517): 202-209. doi:10.1038/nature13480.

7. Ratti M., Lampis A., Hahne J. C., Passalacqua R., Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2018; 75 (22): 4151-4162. doi: 10.1007/s00018-018-2906-9.

8. Kaur J., Sambyal V., Guleria K., Singh N. R., Uppal M. S., Manjari M., Sudan M. Association of XRCC1, XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism with esophageal cancer risk. *Clinical and experimental gastroenterology.* 2020;13:73-86. doi https://doi.org/10.2147/CEG.S232961.

9. Jankin A. V. Esophageal cancer: from statistics to diagnosis. *Zhurnal prakticheskaja onkologija.* 2003;4(2):62. (In Russ.).

10. Zhang S. S., Huang Q. Y., Yang H., Xie X., Luo K. J., Wen J., Cai X. L., Yang F., Hu Y., Fu J. H. Correlation of p53 status with the response to chemotherapy-based treatment in esophageal cancer: a meta-analysis. *Ann. Surg. Oncol.* 2013;20:2419-2427. doi: 10.1245/s10434-012-2859-4.

11. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN; 2012.
12. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2013;19:5598–5606.
13. Napier K. J., Scheerer M., Misra S. Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World Journal of Gastrointestinal Oncology.* 2014;6:112–120.
14. Bosetti C., Levi F., Ferlay J., Garavello W., Lucchini F., Bertuccio P., Negri E., La Vecchia C. Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe. *Int. J. Cancer.* 2008;122:1118–1129.
15. Domper Arnal M. J., Arenas F., Arbeloa L. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(26): 7933–7943. doi:10.3748/wjg.v21.i26.7933.
16. Pennathur A., Gibson M. K., Jobe B. A., Luketich J. D. Oesophageal carcinoma. *Lancet.* 2013;381:400–412.
17. Lin J., Zeng R., Cao W., Luo R., Chen J., Lin Y. Hot beverage and food intake and esophageal cancer in southern China. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011;12:2189–2192.
18. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 5598–5606.
19. Zhang H.Z., Jin G.F., Shen H.B. Epidemiologic differences in esophageal cancer between Asian and Western populations. *Chin. J. Cancer.* 2012; 31: 281–286.
20. Shtygasheva O. V., Ageeva E. S. Synergies of factors contributing to the development of gastric ulcer and gastric cancer. *Experimental and clinical gastroenterology.* 2019;172(12):65–70. (In Russ.).
21. Kit O. I., Vodolazhsky D. I., Bazaev A. L., Zlatnik E. Yu., Kolesnikov E. N., Trifanov V. S., Kharin L. V., Kutilin D. S. Molekuljarnye markery ploskokletochnogo raka pishhevoda Molecular markers of esophageal squamous cell carcinoma. *Modern problems of science and education.* 2017;5:2-14. (In Russ.).
22. Nechunayev V. P., Ageyev A. G., Panasian A. U., Tsyvkina V. P. Epidemiology of cardioesophageal cancer and stomach cancer in Altay region. *Medical Science Bulletin.* 2017;2 (6):72-78. (In Russ.).

**ВИННИЦКИЙ ИЛЬЯ МАРКОВИЧ****Агеева Е. С., Демиденко Л. А.**

Кафедра биологии медицинской, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Агеева Елизавета Сергеевна, заведующий кафедрой биологии медицинской Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

**For correspondence:** Ageeva E.S., MD, the head of the department of Medical Biology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

**Information about authos:**

**Ageeva E. S.**, <https://orcid.org/0000-0003-3770-2965>

**Demidenko L. A.**, <https://orcid.org/0000-0002-8430-8648>

**РЕЗЮМЕ**

Статья посвящена описанию жизни и трудовой деятельности выдающегося человека – ученого, гельминтолога, генетика, доктора биологических наук, профессора И. М. Винницкого (1910-1951 г.г.). Илья Маркович был заведующим нескольких биологических кафедр медицинских институтов в Советском Союзе (г. Симферополь, г. Томск, г. Свердловск, г. Самарканд). Его жизнь была неординарной, яркой и одновременно трудной.

Несмотря на то, что период жизни и трудовой деятельности того времени пришелся на военное время и эпоху организации и становления многих медицинских институтов, его научная, педагогическая и организаторская деятельность оставила важные, необходимые следы для будущих поколений врачей нашей страны. Тем не менее в архивных данных и на кафедрах, как оказалось, не содержится богатой информации даже о великих и значимых людях того периода. Возможно, это связано с военным временем, когда только в г. Симферополе Крымский медицинский институт переживал 2 эвакуации и бесчисленные бомбежки.

Восстановить утраченные части биографии авторам помогли, а по существу и рассказали на основе сохранившейся части копий документов члены семьи Ильи Марковича – сын Владимир Ильич и внук Данил Владимирович, чтобы мы знали и помнили, и могли передать будущим поколениям о наших учителях и вдохновителях.

Статья является частью серии публикаций кафедры биологии медицинской, посвященных 90-летию Медицинской академии имени С.И. Георгиевского и 90-летию кафедры биологии медицинской, юбилей которых пришелся на 2021 год.

**Ключевые слова:** И. М. Винницкий, кафедра биологии медицинской, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, гельминтологи

**VINNITSKY ILYA MARKOVICH****Ageeva E. S., Demidenko L. A.**

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

**SUMMARY**

The article is devoted to the activities of an outstanding person - scientist, helminthologist, geneticist, Doctor of Biology Sciences, Professor I.M.Vinnitsky (1910-1951). Ilya Markovich was the head of several biological departments of medical institutes in the Soviet Union (Simferopol, Tomsk, Sverdlovsk, Samarkand). His life was extraordinary, bright and at the same time difficult.

Despite the fact that the period of his labor activity at that time fell on the era of the organization and formation of many medical institutes, his scientific, pedagogical and organizational activities left important, necessary traces for future generations of doctors in our country. Nevertheless, the archives and departments, as it turned out, do not contain rich information even about the great and significant people of that period. Perhaps this is due to wartime, when only in Simferopol the Crimean Medical Institute experienced 2 evacuations and countless bombings.

Ilya Markovich's family members, son Vladimir Ilyich and grandson Danil Vladimirovich, helped the authors to restore the lost parts of the biography, but in essence they were told on the basis of the surviving part of the copies of documents, so that we know and remember, and could pass on to future generations about our teachers and inspirers.

The article is part of a series of publications of the Department of Medical Biology, dedicated to the 90th anniversary of the Medical Academy named after S.I. Georgievsky and the 90th anniversary of the Department of Medical Biology, the anniversary of which fell on 2021.

**Key words:** I. M. Vinnitsky, Department of Medical Biology, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, helminthology

*Чем старее школа, тем она ценнее.  
Ибо школа есть совокупность  
накопленных веками творческих приемов, традиций,  
устных преданий об отошедших ученых или ныне живущих,  
их манере работать, их взглядах на предмет исследований.*

Лузин Н. Н.

Кафедра биологии медицинской была основана в 1931 году – в год открытия Крымского медицинского института [1]. Кафедра всегда занимала видное место в институте, ее история удивительна и интересна, как и судьба ее преподавателей. Со дня основания кафедра, тогда еще она называлась кафедрой **общей биологии**, располагалась на втором этаже Первого корпуса, а позже кафедра была переведена во Второй корпус (фото 1).

С 1935 по 1938 годы кафедрой заведовал Илья Маркович Винницкий. И. М. Винницкий сменил Николая Христофоровича Флёрова (1933-1934 г.г.), который в это время стал заведовать кафедрой гистологии КМИ.

**Рождение и первые годы.** Илья Маркович родился 10 января 1910 года в Астрахани. Отец – присяжный поверенный, выпускник Императорского казанского университета – Марк Фроимович Винницкий, из семьи Астраханского купца первой гильдии, рыбопромышленника, почетного гражданина. Мама – Вера Бернгардовна (Борисовна) Винницкая (урожденная Сегаль) из семьи директора еврейского казенного училища в г. Одессе, известного религиозного деятеля и писателя (фото 2). В первые годы Илья Маркович получил хорошее домашнее образование в г. Астрахани, обучался в т. ч. иностранным языкам (французскому, немецкому, английскому).

В 1919 г. в результате революции и последовавшей гражданской войны семья лишилась имущества, отец Ильи Марковича и некоторые другие родственники погибли. Вдова с сыном переехали к родственникам в Москву, где мальчик продолжил обучение в средней школе вплоть до 1925 г.<sup>1</sup>

**Юношество и начало научной работы.** В начале 1920-х г.г. Илья остался с мамой, проживали они в этот период в Москве. Но времена, в которые жил будущий профессор были далеко не легкими. Молодой человек связался с беспризорниками. В результате Вера Бернгардовна решила отправить сына к своему старшему брату в г. Берлин (который проживал там с начала XX в. после получения образования в одном из университетов Германии). Уже в Берлине Илья Маркович закончил среднюю школу и поступил

<sup>1</sup>Удостоверение от 10.10.1924 48-й Советской Единой Трудовой девятилетней школы Красно-Пресненского района (Большая Никитская, дом 48).



А



Б

**Фото 1. Первый корпус (А) и Второй корпус (Б) Крымского медицинского института имени И. В. Сталина, 30е годы.**

в Берлинский сельскохозяйственный институт. Затем Илья Маркович продолжил обучение на биологическом отделении философского факультета Лейпцигского университета, слушал лекции по зоологии профессоров Геймонса и Мейзенгеймера, по ботанике – Руланда и Миэ, по паразитологии – у Шпрена, по генетике – Нахтсгейма. Университет был окончен только на высшие оценки.

Под руководством профессора Нахтсгейма Илья Маркович выполнил выпускную работу «Биология размножения и возможности стимуляции плодовитости пушных зверей путем введения половых гормонов», а затем в 1932 г. в рекордные сроки подготовил и успешно защитил на немецком языке докторскую диссертацию по теме «Untersuchungen über den Einfluß gesteigerter Kalziumzufuhr auf den Befall mit Askariden bei Tieren im besonderen Hinblick auf die Pelztierzucht (sowie über die Möglichkeit der ausschließlichen Fleischfütterung der Karnivoren unter gleichzeitiger Zugabe eines Kalkvitaminpräperates) {von Ija Winnitzky}» («Исследование о влиянии усиленного введения в организм солей кальция на течение аскаридоза животных, в частности пушных зверей (а также о возможности кормления млекопитающих





**Фото 2. Родители И. М. Винницкого – В. Б. Винницкая (1881 – 1942), М. Ф. Винницкий (1880 – 1919), бабушка со стороны матери П.Ф.Сегаль (урожд. Гордон) (1849 – 1919?), дядя, продолживший его воспитание И.Б.С (Дегаль) (1875 – 1939?) с супругой**

исключительно мясом при одновременной даче кальцивитаминового препарата»)), получив степень доктора философии (PhD) Лейпцигского университета.

Во время учебы подрабатывал переводчиком в советских учреждениях, находившихся в Германии (выставки торгового представительства на Лейпцигской ярмарке и др.), преподавал язык в Лейпцигской рабочей школе, был членом Союза студентов СССР в Германии. После прихода к власти в Германии<sup>2</sup> нацистов вернулся в СССР к матери.

После возвращения в СССР работал ученым специалистом во Всесоюзном НИИ пушно-мехового и охотопромыслового хозяйства (1933–1934), где в частности готовил обзоры иностранной прессы (см., например, «Основы рационального кормления плотоядных пушных зверей с хозяйственной и биологической точки зрения», ВНИПО, Обзор инпрессы, декабрь 1933 г. №4).

**Зрелость и профессиональные достижения.** Уже в возрасте 24 лет (в период с 01.04.1934 по 01.02.1935 годы) Илья Маркович заведовал кафедрой зоологии и паразитологии Немецкого сельскохозяйственного института с исполнением обязанностей профессора (г. Энгельс). Молодой профессор читал лекции по паразитологии, обучение шло на немецком языке.<sup>3</sup>

В 1935 году был утвержден Наркомздравом РСФСР в ученое звание доцента и степени кандидата биологических наук без защиты диссертации в порядке ностратификации и признания научных работ, защищенных в Германии (Протокол заседания Высшей квалификационной комиссии НКЗдрава РСФСР №23/9 от 8.05.1935).

<sup>2</sup>Членская карточка №119 от 21.11.1928.

<sup>3</sup>Справка Немецкого Сельско-Хозяйственного института от 22.02.1935 №13.

**Симферополь.** Заведующим кафедрой медицинской биологии Крымского медицинского института (им. И.В. Сталина) Илья Маркович стал в 1935 году, где работал до 1938 года. Одновременно работал заведующим гельминтологическим отделением. Подготовил и опубликовал ряд научных работ по ранее начатым направлениям исследований (см., например, «К эпидемиологии глистных заболеваний татарского населения южного берега Крыма», Крымский мединститут, 1936; «Изучение действия различных антигельминтиков на аскарид *in vitro*», Крымский мединститут, 1937; «Экологическое изучение миграции личинок аскарид и проблема иммунитета к аскаридозу», в Сборнике: «Труды конференции по медицинской биологии, организованной Институтом экспериментальной биологии и патологии» / Под ред. академика Богомольца, Киев, 15-19.11.1936. Издано в 1937 г. С. 191 – 202 и др.).

9 мая 1936 г. приказом №84 по Крымскому мединституту премировался за лучшие показатели по учебной, научной и общественной работе.

В режиме научной дискуссии результаты исследований в этот период в области экспериментальной гельминтологии, экологии и филогении гельминтов были доложены и обсуждены на конференции по медицинской биологии в Киеве в 1936 г.

Кроме того, в своем отзыве от 26.01.1940 г. заведующий кафедрой общей биологии 2-го Московского медицинского института, профессор Бляхер высоко оценивает оборудованную в период с 1935 по 1938 гг. в Симферопольском медицинском институте научно-исследовательскую лабораторию, приспособленную для исследований в сфере паразитологии (в т.ч. для изучения проблем иммунитета к аскаридозу). В

1937 – 1938 г.г. И. М. приступил к работе и над докторской диссертацией по паразитологии.

**Арест.** И. М. Винницкий был арестован 22.01.1938 г. НКВД Крыма по статье 58-6, 10 УК РСФСР. Основанием для ареста «служила предположенная связь с фашистским агентом - профессором Шпреном» (имелся в виду профессор Лейпцигского университета, специалист в сфере паразитологии и ветеринарии Курт Эрих Вилли Шпрен. На работы К. Э. В. Шпрена, как на профильного специалиста, имелись многочисленные ссылки в немецкой докторской диссертации (PhD) Ильи Марковича.

Находясь в заключении, Илья Маркович несмотря на пытки, вину не признал, направлял многочисленные жалобы, затем объявил голодовку в знак протеста против незаконных методов следствия. Некоторое время находился при тюремной больнице и подвергался принудительному кормлению. В апреле 1939 года руководитель НКВД Ежов был арестован, некоторые начатые дела начали пересматриваться.

29 ноября 1939 года Илья Маркович был освобожден из-под стражи НКВД Крыма за недоказанностью обвинения [2]. На свободу ученый вышел больным человеком, но не сломленным. Через органы прокуратуры к концу 1939 г. добился полной реабилитации<sup>4</sup>, в череде судебных процессов добился возвращения квартиры<sup>5</sup>, взыскание заработной платы<sup>6</sup>, восстановления в должности<sup>7</sup>. Но поскольку заведующим кафедрой общей биологии в Крымском медицинском институте уже был избран другой специалист, Народным комиссаром здравоохранения РСФСР Третьяковым (разъяснение от 21.12.1939 №2124, приказ от 4.04.1940 №269) были предложены Илье Марковичу на выбор несколько аналогичных должностей в различных научных центрах страны. И.М. Винницкий выбрал кафедру общей биологии Томского медицинского института, где в дальнейшем прошли наиболее плодотворные годы его научной работы.

**Томск.** С 1940 года Илья Маркович (фото 3) заведовал кафедрой общей биологии Томского медицинского института (ТМИ) [3]. Активно занимался научной работой, готовил докторскую диссертацию. Имел в связи с этим научные командировки в 1940 г. в Институт экспериментальной биологии патологии (директор акаде-  
<sup>4</sup>Письмо Прокурора РСФСР (отдел общего надзора) от 17.01.1940 №4-В-127-38 (вз-в; 11.01.40, исполнитель Двуреченский).  
<sup>5</sup>Решение Зам. наркома здравоохранения Крымской АССР от 08.12.1939 №1/8; Определение Верховного Суда Крыма по гражданской судебной коллегии от 20.06.1940 г.д.№9-3572.  
<sup>6</sup>Решение народного суда 1-го участка Железнодорожного района г. Симферополя Крымской АССР (Председательствующий судья Макаров, заседатели Бакулина и Полищук) от 17.03.1940.  
<sup>7</sup>Определение Верховного Суда Крымской АССР по гражданской судебной коллегии от 27.03.1940, г.д.№9-1774.

мик А. А. Богомолец) и в 1941 г. на кафедру патологической анатомии 1-й Московского медицинского института (директор академик А. И. Абрикосов). В этот же период, командировался с научной целью в Украинский институт экспериментальной биологии и патологии (г. Киев), 2-й Московский медицинский институт, Институт экспериментальной биологии и патологии (г. Ленинград).



**Фото 3. Илья Маркович Винницкий**

С 1941 года был членом совета ТМИ. С началом войны подал заявление добровольцем на фронт, однако был направлен для чтения лекций в формирующиеся в г. Томске госпитали для эвакуируемых раненых (без отрыва от основной исследовательской работы). Во время Великой Отечественной войны состоял в лекторской группе Томского городского лекционного бюро и читал популярные лекции по биологии в частях Красной армии и военных госпиталях. Подготовил ряд принципиальных научных публикаций, в т. ч.:

- (1) Сравнительное изучение защитных реакций организма различных видов на паразитально-внедренных и живущих нематод, Доклады Академии Наук СССР, Т. XIV, №4, 1944;
- (2) Причины, происхождение и значение миграции личинок аскарид, Доклады Академии Наук СССР, Т. XLVI, № 6, 1945;
- (3) Эволюция биологических циклов нематод отряда Ascaridida, Известия Академии Наук СССР, №4, 1946.

Сохранились множество газетных статей в местных изданиях г. Томска, где выражалась благодарность за чтение лекций И. М. Винниц-

ким в госпиталях и частях Красной Армии и популяризацию научных знаний.<sup>8</sup> Ученый был награжден грамотами Томского ДКА<sup>9</sup> и командованием МЭП-47<sup>10</sup>, отдельных госпиталей<sup>11</sup>, общественными организациями ТМИ, Томского Горкома ВКП(б) и Горисполкома и т. п.

Кроме фундаментальных научных исследований, И. М. Винницкий являлся председателем культурно-массовой секции Томского дома науки и техники; активно руководил работой студенческого научного кружка кафедры биологии; принимал участие в пополнении новыми экспонатами кафедрального биологического музея и т. п.

После начала войны, мама Ильи Марковича в 1941 г. в связи с угрозой оккупации Симферополя фашистскими войсками, также эвакуировалась в Томск (фото 4), однако не выдержала военных условий, заболела тифом и скончалась в больнице Томска практически сразу по приезде к сыну в январе 1942 г.

В 1943 году в совете ВИЭМ (Всесоюзного института экспериментальной медицины) защитил диссертацию «Экспериментальное эколого-филогенетическое изучение зависимостей между гистогенными защитными реакциями организма хозяина и биологическими циклами развития некоторых паразитических нематод» на соискание ученой степени доктора биологических наук (Протокол №15 от 3.11.1943) (фото 5). Официальными оппонентами его работы были профессор Н. И. Латышев, профессор Л. Я. Бляхер, профессор Л. М. Шабад. В 1944 году была утверждена ВАК ученая степень доктора биологических наук (26.11.1944), а в 16.01.1945 г. И. М. Винницкий был утвержден в звании профессора.

В ноябре 1944 г. по состоянию здоровья И. М. Винницкий был переведен в г. Кисловодск в научный центр с более мягким климатом (Протокол №2 заседания Ученого Совета Кисловодского медицинского института Наркомздрава СССР от 10.11.1944). Илья Маркович был избран по конкурсу заведующим кафедрой биологии). Однако в связи с расформированием в 1945 г. института и переводом его штата в освобож-

<sup>8</sup>«Красное знамя» №156 от 03.08.1943; «Советская здравница» №129 (150) от 24.10.1944; «Большевистская сталь» №125 (3396) от 16.06.1943 и др.

<sup>9</sup>Приказ №126 по Дому Красной армии Томского гарнизона от 26.08.1941; Грамоты от того же учреждения от 29.11.1941, от 26.09.1944 и др.

<sup>10</sup>Отзыв Управления местного эвакуопункта №47 от 8.09.1942 №М-1772 по г. Томску; благодарность этого же Управления – Приказ №38 от 21.02.1942 и др.

<sup>11</sup>Отзыв Эвакуационного госпиталя №1248 от 28.11.1942 по г. Томску (подписано зам. начальника госпиталя Колесником.), Приказ №200 от 19.06.1943 по Эвакогоспиталю №1242, Благодарность Военного госпиталя №408 от 24.02.1943 №А/2402 по г. Томску и др.



Фото 4. Томск. Дом, где проживал Илья Маркович

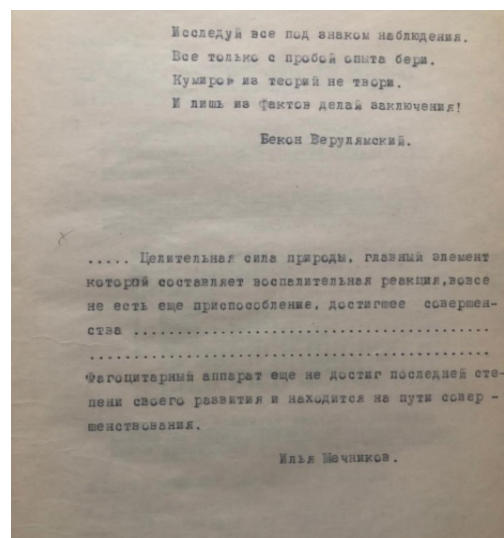
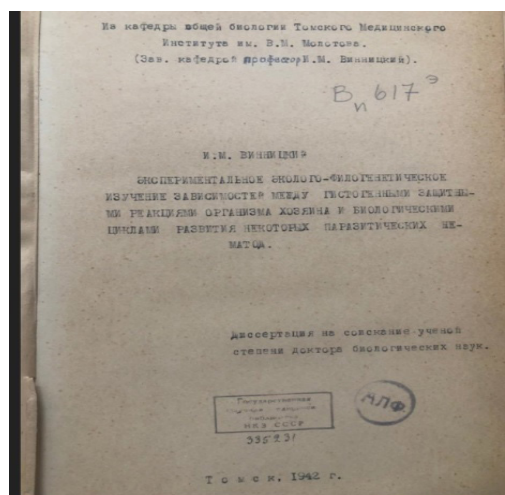


Фото 5. Диссертация на соискание степени доктора биологических наук Ильи Марковича Винницкого (1943 г.)

денный г. Кишинёв был вынужден уволиться. В этот период Илья Маркович временно работал заведующим кафедрой естествознания Пятигорского пединститута, пока не был переведен в научный центр Свердловского мединститута.

**Свердловск.** В 1946 по 1948 годы Илья Маркович заведовал кафедрой биологии Свердловского государственного медицинского института. За эти годы произошло становление кафедры, пополнение ее микроскопами, таблицами, гистологическими и паразитологическими препаратами. Среди работ И. М. Винницкого, опубликованных в период его работы в г. Свердловске, можно упомянуть:

(1) О возможности перфорации аскаридами неповрежденной ткани организма. В кн.: Гельминтол. сборн. М.-Л., Издание Академии Наук СССР 1946. С. 69-72. (сборник, посвященный академику К. И. Скрябину).

(2) Своеобразная защитная реакция организма плотоядных на интраперитональное введение нематод, 1948, Известие Академии Наук СССР, №1, С. 53 – 66 и некоторые иные работы [4, 5].

В этот период Министром здравоохранения СССР И. М. Винницкому присуждались различные ведомственные награды (благодарность Министра СССР, знак «Отличник здравоохранения», медаль «За победу над Германией», «За доблестный труд в ВОВ» в 1946 и другие годы).

И. М. Винницкий читал студентам ряд учебных курсов и продолжал проведение экспериментов в соответствии с тематикой научной работы. По воспоминаниям студентов, Илья Маркович был интересным и остроумным лектором, умел подать материал и увлечь своим предметом, сохранились десятки благодарственных и восторженных писем студентов.

В силу стечения обстоятельств организовать полноценную экспериментальную лабораторию в г. Свердловске ему не удалось; в феврале 1948 г. он вынужден был уволиться и обратился в профильное министерство за поиском нового места работы. В это же время недавняя выпускница СГМИ, ассистировавшая ему в экспериментах при проведении операций, стала ему женой и отправилась с ним в путь, как тогда казалось, в неизвестность. Новое назначение в г. Самарканд пришло лишь в конце апреля 1948 г.

**Самарканд.** С 1948 г. И.М. Винницкий профессор Узбекского государственного университета (УзГУ) в г. Самарканде, он занял должность заведующего кафедрой зоологии беспозвоночных (фото 6).

В этот период работа Ильи Марковича была главным образом сосредоточена на вопросах экспериментальной гельминтологии, экологии



**Фото 6.** Заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных УзГУ, 1950 г. Илья Маркович Винницкий с семьей – супругой и сыном Владимиром

и филогении гельминтов. Он выступал с докладами о результатах исследований в этой области на конференции, созванной Всесоюзным гельминтологическим обществом при Академии наук СССР в г. Москве в 1948 г. и посвященной 70-летию академика К. И. Скрябина, на Всесоюзном съезде анатомов, гистологов и эмбриологов в Ленинграде в 1949 г. и др. Являлся председателем комиссии по учебной и научной работе Центрального объединенного профкома УзГУ. Во время работы в г. Самарканде, кроме ряда научных статей, И. М. Винницким были подготовлены две монографии:

1 - Экспериментальное эколого-филогенетическое изучение зависимостей между гистоген-

ными защитными реакциями организма хозяина и биологическими циклами развития некоторых паразитических нематод (10 печ. листов и 62 табл. с макро и микрофотографиями);

2 - Изучение гистогенных реакций организма плотоядных на интерперитонеально введенные чужеродные мышцы и пульсирующие сердца (8 печ. листов и 51 таблица с макро и микрофотографиями).

Министерство высшего образования СССР выдало разрешение на выпуск данных монографий по линии Главлита УзССР. Рецензентом по данным работам выступил, в частности, Член-корреспондент АН СССР, профессор В. А. Догель.

К середине 1951 года начался новый всплеск борьбы с «космополитизмом», развивалось дело врачей, затронувшее в т. ч. 2-й Московский медицинский институт и т. п. И. М. Винницкий не дожидаясь апогея этих процессов, он умер 13 мая 1951 г. Вдова И. М. Винницкого пережила мужа на 61 год, воспитывала сына. У ученого осталось много потомков, некоторые из них занимаются научной работой в других сферах. Илья Маркович был похоронен в г. Самарканде, в связи с угрозой разрушения кладбища в 2017 году его прах был перенесен на семейное кладбище в г. Екатеринбурге.

**Научная деятельность.** Илья Маркович Винницкий занимался вопросами экспериментальной паразитологии. Основные интересы – миграция личинок аскариды, генетика (фото 7). Изучал миграцию личинок аскарид и в особенности процесс смены хозяев, эволюцию защитных реакций организма хозяина.

Первые работы И. М. Винницкого были опубликованы в 1932 году и демонстрируют опыты, проведенные по изучению процессов миграции личинок аскарид. И. М. Винницкий и его коллеги предложили оригинальную методику введения живых аскарид – в перитонеальную полость животных различных видов.

Результаты и выводы основаны на внушительных по своему размаху экспериментах. Илья Маркович и его коллеги проделали эксперименты с использованием – морских свинок, кроликов, котят, щенят, кур. Интересными выводами являются данные об эволюции защитно-приспособительных механизмов, происходящих у эмбрионов и личинок, в результате которых произошло образование мощнейших защитных яйцевых оболочек. По мнению авторов, в связи с этим личинки перестали покидать яйцо и заражение *per os* стало необходимостью [6; 7].

В работах описаны механизмы, происходящие в системе «паразит-хозяин», связанные с адаптивной способностью паразита нейтрали-



**Фото 7.** Заведующий кафедрой биологии медицинской Медицинской академии им. С.И. Георгиевского (современные названия кафедры и академии) в период 1935-1938 г. Илья Маркович Винницкий

зовать защитное для хозяина действие реакции инкапсуляции. «...Вероятность реализации потенциала факультативного промежуточного хозяина у нематод (в частности аскарид), когда полностью инкапсулированные личинки остаются живыми в течение длительного времени делает возможным поражение ими. Проявляя видовую специфичность к определенным хозяевам – на стадии личинки они такой видовой специфичностью не характеризуются». Вывод был очень интересным с точки зрения возможности заражения морских животных [8].

Илья Маркович не боялся высказывать теории и предположения, которые были диаметрально противоположны выводам Фюллеборна, Вюльнера, Камерона.

Эволюция с точки зрения Ильи Марковича шла не путем «выпадения», а, наоборот, путем «включения» в их цикл развития промежуточных хозяев – факультативных и облигатных [9]. Описаны явления интоксикации, дегенеративные явления, наступающие в ряде органов при паразитировании. В результате этих опытов было подтверждено, что токсины аскарид вызывают расстройство кровообращения и дегенеративные изменения внутренних органов. Опыты подтверждали наличие в полостной жидкости свежих аскарид очень быстро действующего сильного яда, специфически влияющего на стенки капилляров, парализующего контрактильную

способность, в результате чего происходило расширение сосудистой сетки, переполнение кровью и внутриорганные кровоизлияния. Было подтверждено, что в содержимом аскаридной жидкости присутствуют факторы свертывания крови. А также показано наличие в яде аскарид нейротоксического яда, действующего на моторную и чувствительную части ЦНС [10]. Было показано, что в свежих аскаридах содержатся летучие вещества, вызывающие аллергические реакции. Наблюдения и выводы были получены в многочисленных экспериментах. Они позволили дополнить и описать функции врожденного и приобретенного иммунитета.

Эксперименты, проведенные И. М. Винницким показали, что антитоксический иммунитет, приобретенный в результате введения живых аскарид в брюшную полость, не обладает видовой специфичностью, то есть иммунизированные одним видом аскарид животные становятся невосприимчивыми к токсинам другого вида [10].

Такие выводы были получены в результате проведения экспериментов с введением сыворотки иммунизированных морских свинок неиммунизированным. Были выявлены специфические антитела, которые вырабатываются на 6-12 сутки после введения животным живых аскарид в брюшную полость. Было еще раз продемонстрировано, что антитоксический аскаридный иммунитет и аскаридоцидный иммунитет носит временный характер (кафедра общей биологии Томского медицинского института, 11.09.1944 г.)

Работы И.М. Винницкого получили высокую оценку Академиков И. Ф. Шмальгаузена, К. И. Скрябина, Н. Г. Хлюпина, Н. М. Кулагина, члена-корреспондента Академии Наук В. А. Догеля, профессоров Л. Я. Бляхера, Н. И. Латышева, Л. М. Шабада, Д. Дайнеки и некоторых других. А вклад профессора в систему образования будущих врачей определяется разработанной им программой по курсам общей биологии, зоологии и паразитологии, утвержденные ВКВШ и рекомендованной для преподавания в медицинских институтах СССР.

**Научное общение.** Поддерживал тесные отношения с Академиком К. И. Скрябиным и другими выдающимися вышеупомянутыми учеными (фото 8).

Илья Маркович поддерживал и дружеские и деловые отношения и с коллегами, которые остались работать на кафедрах.

**Награды и звания.** Доктор философии Лейпцигского университета (1932/33); доктор биологических наук – 1944; профессор – 1945; почетные грамоты Дома Красной армии Томского гарнизона; грамота стахановца военного времени; грамота Томского горкома ВКП(б) и



**Фото 8. И. М. Винницкий и другие ученые на конференции в г. Москве в связи с 70-летним юбилеем Академика К. А. Скрябина, отмечавшимся 29 января 1949 года**

горисполкома за активную военно-физкультурную и оборонно-массовую работу; благодарности командования военных госпиталей; Медали «За победу над Германией», «За доблестный труд в Великой Отечественной Войне»; другие ведомственные награды, в частности, Народного комиссариата (Министерства) здравоохранения СССР.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Илья Маркович – ученый-гельминтолог, чья профессиональная деятельность внесла существенный вклад в становление и развитие гельминтологии нашей страны и в медицинское образование. Его труды не потеряли актуальности и сегодня, а масштаб экспериментальных работ был продолжен его коллегами на кафедре и является частью кафедрального воспитания молодых ученых и студентов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### Благодарности.

Авторы статьи выражают огромную благодарность и признательность членам семьи Ильи Марковича – сыну Владимиру Ильичу и внуку Данилу Владимировичу Винницким за любезно предоставленные материалы, на основе сохранившейся части копий документов – биографические сведения, а также фотографии, сведения о диссертационных работах и опубликованных научных статьях Ильи Марковича.

Особую благодарность заведующему сектором научной библиотеки КФУ им. В.И. Вернадского – Светлане Васильевне Козленко за помощь в подготовке научных материалов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Непомнящий А. А., Кравчук А. С. История Крымского федерального университета

имени В. И. Вернадского в документах и фотографиях / Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского». Белгород: КОНСТАНТА; 2018.

2. Книга памяти. Автономная Республика Крым, том 8. Доступно по: <https://bessmertnybarak.ru/books/person/516183>. Ссылка активна на 23.02.2021

3. Фоминых С. Ф., Некрылов С. А., Грибовский М. В., Мендрин Г. И., Венгеровский А. И., Новицкий В. В. Профессора медицинского факультета Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета (1878-2003): Биографический словарь. Томск: Изд-во Том. ун-та; 2000.

4. Винницкий И. М. О возможности перфорации аскаридами неповрежденной ткани организма / В кн.: Гельминтол. сборн. М.-Л., Издание Академии Наук СССР. 1946; 69-72.

5. Винницкий И. М. Своеобразная защитная реакция организма плотоядных на интраперитонеальное введение нематод / Известие Академии Наук СССР. 1948;1:53–66.

6. Винницкий И. М. Причины происхождения и значение феномена миграции личинок аскарид. Эволюционные пути биологических циклов развития в пределах отряда Ascaridata. / И.М. Винницкий // Докл. Акад. наук СССР. 1945; 46 (6): 282-284.

7. Винницкий И. М. Гуморально-иммунобиологическая реактивность экспериментальных животных, в перитонеальную область которых оперативно введены живые аскариды. Тр. Томск. Мед. Институт. Томск. 1946;13:98-99.

8. Винницкий И. М. Сравнительное изучение защитных реакций организма различных видов на параэнтерально внедренных и живущих нематод / И.М. Винницкий // Докл. Акад. наук СССР. 1945;46 (6): 439-451.

9. Винницкий И. М. Эволюция циклов развития нематод отряда Ascaridata. / И.М. Винницкий // Изв. Акад. Наук СССР. 1946;4:415-430.

10. Винницкий И. М. Аскаридная интоксикация и антитоксический аскаридный иммунитет. / И.М. Винницкий // Тр. Томск. мед. инст. Томск. 1946;13:96-97.

## REFERENCES

1. Nepomnyashchy A. A., Kravchuk A. S. History of the V. I. Vernadsky Crimean Federal University in documents and photographs / Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “V. I. Vernadsky Crimean Federal University”. Belgorod: KONSTANTA; 2018.

2. Book of memory. Autonomous Republic of Crimea, volume 8. Available at: <https://bessmertnybarak.ru/books/person/516183>. Accessed 23.02.2021.

3. Fominykh S. F., Nekrylov S. A., Gribovsky M. V., Mendrina G. I., Vengerovsky A. I., Novitsky V. V. Professors of the Medical Faculty of Tomsk University - Tomsk Medical Institute - Siberian State Medical University (1878-2003): Biographical Dictionary. Tomsk: Publishing house of Vol. University; 2000.

4. Vinnitskiy I. M. On the possibility of perforation of undamaged body tissue with roundworms In the book: Helmintol. prefabricated M.-L., Published by the Academy of Sciences of the USSR. 1946; 69-72.

5. Vinnitskiy I. M. A peculiar protective reaction of the organism of carnivores to the intraperitoneal introduction of nematodes / Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. 1948;1:53–66.

6. Vinnitskiy I. M. A peculiar protective reaction of the organism of carnivores to the intraperitoneal introduction of nematodes / Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. 1948;1:53–66.

7. Vinnitskiy I. M. The reasons for the origin and significance of the phenomenon of migration of ascaris larvae. Evolutionary paths of biological developmental cycles within the order Ascaridata. / THEM. Vinnitskiy // Dokl. Acad. Sciences of the USSR. 1945;46 (6):282-284.

8. Vinnitskiy I.M. Comparative study of the protective reactions of the organism of various species on parenterally introduced and living nematodes / I.M. Vinnitskiy // Dokl. Acad. Sciences of the USSR. 1945;46(6):439-451.

9. Vinnitskiy I. M. Evolution of developmental cycles of nematodes of the order Ascaridata. / THEM. Vinnitskiy // Izv. Acad. Sciences of the USSR. 1946;4:415-430.

10. Vinnitskiy I. M. Ascaris intoxication and antitoxic ascaris immunity. / THEM. Vinnitskiy // Tr. Tomsk. honey. inst. Tomsk. 1946;13:96-97.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Архипенко А. Л.<sup>1</sup>, Беренштейн М. В.<sup>1</sup>, Ухаботина А. В.<sup>1</sup>, Фомочкина И. И.<sup>2</sup>, Нуриддинова Э. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центральная научно-исследовательская лаборатория, 2кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Фомочкина Ирина Ивановна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им.В. И. Вернадского», e-mail: fomochkina\_i@mail.ru

**For correspondence:** Fomochkina I. I., MD, Professor of the Department of General and Clinical Pathophysiology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: fomochkina\_i@mail.ru

### Information about authors:

**Archipenko A. L.**, <https://orcid.org/0000-0002-0738-7936>

**Berenshteyn M. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-4569-5139>

**Ukhabotina A. V.**, <https://orcid.org/0000-0001-6682-3286>

**Fomochkina I. I.**, <https://orcid.org/0000-0003-3065-5748>

**Nuriddinova E. S.**, <https://orcid.org/0000-0003-0096-2755>

### РЕЗЮМЕ

На сегодняшний день для медицинского сообщества особенно актуальна проблема своевременной диагностики генетических нарушений плода. На данный момент наиболее эффективными являются молекулярно-генетические методы – большая и разнообразная группа методов, предназначенная для выявления повреждений в структуре участка ДНК вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований. Появление молекулярно-генетических методов открыло в изучении хромосом человека и их нарушении новое измерение – субмикроскопический уровень. Основными исследованиями, используемыми в клинической практике, являются: определение кариотипа; изучение материала замерших беременностей; исследование ооцитов и сперматозоидов; пренатальная инвазивная и неинвазивная диагностика; генетическое консультирование. Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), позволяет объективно выявлять нуклеотидный состав конкретной хромосомы или локуса. FISH-анализы важны для клинической диагностики различных хромосомных аномалий, включая делеции, дупликации и транслокации.

**Ключевые слова:** молекулярно-генетические методы; пренатальная диагностика; хромосомные аномалии.

### MOLECULAR-GENETIC APPROACHES TO DIAGNOSTICS OF HEREDITARY PATHOLOGY

Archipenko A. L.<sup>1</sup>, Berenshteyn M. V.<sup>1</sup>, Ukhabotina A. V.<sup>1</sup>, Fomochkina I. I.<sup>2</sup>, Nuriddinova E. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central Research Laboratory, <sup>2</sup>Department of General and Clinical Pathophysiology, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

Today, the problem of timely diagnosis of fetal genetic disorders is especially urgent for the medical community. At the moment, the most effective are molecular-genetic methods - a large and diverse group of methods designed to detect damage in the structure of a DNA section up to deciphering the primary sequence of bases. The emergence of molecular-genetic methods has opened up a new dimension in the study of human chromosomes and their violation - the submicroscopic level. The main studies used by healthcare professionals are: determination of the karyotype; study of the material of missed pregnancies; examination of oocytes and spermatozoa; prenatal invasive and non-invasive diagnostics; genetic counseling. The method of fluorescence in situ hybridization (FISH), allows you to objectively identify the nucleotide composition of a particular chromosome or locus. FISH assays are important for the clinical diagnosis of various chromosomal abnormalities, including deletions, duplications, and translocations.

**Key words:** molecular-genetic methods; prenatal diagnostics; chromosomal abnormalities

В 2001 году «Nature» и «Science» опубликовали две основополагающие статьи, в которых впервые была подробно описана почти полная последовательность генома человека [1; 2]. Эти исследования стали отправной точкой для нового периода в биомедицине и позволили добиться постоянного улучшения диагностики генетиче-

ских нарушений и внедрения геномного анализа в клиническую практику. По прошествии 20 лет можно утверждать, что картирование большого числа генов, ассоциированных с развитием заболеваний, изменило проведение традиционных эпидемиологических исследований, позволило расшифровать этиологию многих генетических



болезней, разработать методы генетического прогнозирования заболеваний, расширить возможности медико-генетического консультирования [3]. Реализация проектов национального уровня, таких как «Ноев ковчег» в МГУ им. М.В. Ломоносова и «Российские геномы» в Санкт-Петербургском государственном университете способствует дальнейшему развитию и совершенствованию геномных технологий, обеспечивает создание единого биокolleкционного пространства, в котором аккумулируются самые разнообразные данные о максимально возможном количестве биологических образцов [4; 5]. Развитие и масштабирование исследований в данной области позволит в перспективе открывать новые варианты лечения различных заболеваний, основывающиеся на технологиях геномного редактирования, для улучшения здоровья человека в целом.

Молекулярно-генетические методы – большая и разнообразная группа методов, предназначенная для выявления вариаций (повреждений) в структуре участка ДНК (аллеля, гена, региона хромосомы) вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований. Хотя ДНК-диагностика основана на сложных, трудоемких и относительно дорогостоящих исследованиях, она имеет важные преимущества перед традиционными методами диагностики. С помощью ДНК-диагностики можно решать задачи, которые часто не удается решить другими методами: подтверждение клинического диагноза или дифференциальная диагностика, досимптоматическая диагностика – когда клинические признаки заболевания с поздним дебютом отсутствуют, разнообразные подходы к пренатальной диагностике [6].

В настоящее время состояние репродуктивного здоровья в России вызывает обеспокоенность. Важнейшими факторами, которые влияют на процесс снижения состояния репродуктивного здоровья населения, являются мужской и женское бесплодие, невынашивание беременности, рождение детей с множественными врожденными пороками развития и др. Поскольку репродуктивные потери зачастую могут быть обусловлены генетическими факторами, для их выявления в настоящее время широко применяются цитогенетические и молекулярно-генетические исследования. Рост числа супружеских пар, применяющих вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), способствует еще более широкому внедрению указанных методов в лабораторную практику. В связи с этим, цель настоящего обзора – рассмотреть современные методы и подходы к молекулярно-генетической диагностике в сфере репродуктивного здоровья,

оценить преимущества и недостатки, выявить наиболее перспективные подходы, а также определить перспективы развития данной отрасли в междисциплинарном аспекте.

Развитие медицинской генетики в мире шло по пути создания центров, в которых можно провести любую генетическую диагностику с использованием самых современных методов, включая цитогенетические и молекулярно-цитогенетические. На национальном уровне развитие клинической цитогенетики и молекулярной генетики набирает обороты, причем широкое внедрение ВРТ отчасти явилось стимулом для их развития, поскольку генетические тесты проводятся в репродуктивной медицине для трех основных целей: выявление причин бесплодия, выявление генетических заболеваний, передающихся потомству, и оптимизация ВРТ. Основными исследованиями, направленными на совершенствование оказания медицинской помощи в сфере репродуктивного здоровья, являются:

1. исследование конституциональных особенностей индивидуума – определение кариотипа;
2. изучение материала замерших беременностей для выяснения причин как при естественной беременности, так и в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО);
3. исследование ооцитов и сперматозоидов;
4. пренатальная инвазивная, включая предимплантационную генетическую диагностику (ПГД) в циклах с применением ВРТ, и неинвазивная диагностика с целью профилактики хромосомной патологии у плода;
5. генетическое консультирование.

Кариотипирование супружеской пары представляет собой основной лабораторный метод диагностики хромосомных аномалий в репродуктивной медицине. Установлено, что каждый здоровый субъект является носителем 5/8 генетических изменений, связанных с рецессивными генетическими нарушениями; следовательно, даже при отсутствии специфических симптомов планирование семьи и репродукция нести в себе определенные риски. Более того, сообщалось, что почти 50% случаев бесплодия связаны с генетическими нарушениями [6; 7]. При наличии или подозрении на генетически обусловленный репродуктивный риск генетический тест позволяет более точно диагностировать бесплодие и дает возможность проинформировать семейную пару о возможности передачи болезни потомству. Накопленный опыт свидетельствует, что кариотипирование рекомендовано следующим группам пациентов с наличием как мужского, так

и женского факторов нарушения репродукции: первичное/вторичное бесплодие; нарушение сперматогенеза: необструктивная азооспермия, тяжелая олигозооспермия (<5 млн/мл сперматозоидов в эякуляте), астенозооспермия и др.; первичная /вторичная аменорея (преждевременная менопауза); задержка полового развития; отягощенный акушерский анамнез – привычное невынашивание (наличие 2 и более самопроизвольных аборт в I триместре беременности), мертворождение, рождение ребенка с множественными врожденными пороками развития.

Присутствие в кариотипе пациента числовой хромосомной аберрации или несбалансированной перестройки (делеции, дупликации), как правило, меняет дозовое соотношение генов, поэтому такие изменения повлекут за собой существенные отклонения в фенотипе (клинической картине). Напротив, наличие в кариотипе аберраций типа сбалансированных перестроек – транслокаций (робертсоновские и реципрокные), инверсий, некоторых маркерных хромосом, не несущих структурных генов, зачастую не приводят к потере или добавлению генетического материала. Их носители, как правило, фенотипически здоровы, но имеют риск рождения ребенка с хромосомной патологией. По данным литературы, если популяционная частота, например, таких сбалансированных транслокаций не превышает 0,1%, то их частота в группах мужчин и женщин с репродуктивными проблемами достигает 6,1% и 8% соответственно [8].

Появление молекулярно-цитогенетических методов открыло в изучении хромосом человека и их нарушении новое измерение – субмикроскопический уровень. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), позволяет объективно выявлять индивидуальные хромосомы и их отдельные участки на метафазных пластинках или интерфазных ядрах на основе особенностей их молекулярно-генетического строения – нуклеотидного состава конкретной хромосомы или локуса. Флуоресцентная гибридизация *in situ* – метод, в котором используются флуоресцентные зонды, которые связываются только с теми частями хромосомы, которые обладают высокой степенью комплементарности последовательностей. FISH-анализы важны для клинической диагностики различных хромосомных аномалий, включая делеции, дупликации и транслокации. В настоящее время мультифлуоресцентный FISH, в котором каждая хромосома окрашивается в свой цвет, может быстро сканировать набор хромосом с ограниченным разрешением. На практике использовать полный набор из 24 зондов нецелесообразно; вместо этого выбирают от пяти до семи зондов для хромосом,

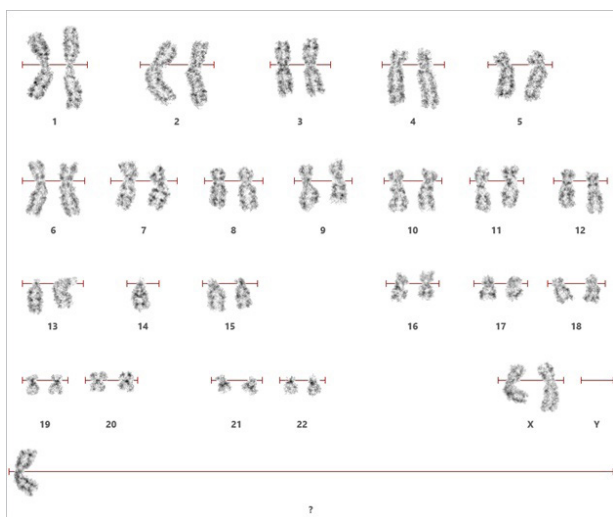
наиболее часто участвующих в анеуплоидии (например, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22 и X). Основными преимуществами метода флуоресцентной гибридизации *in situ* является возможность анализа интерфазных и метафазных хромосом, что устраняет необходимость в культуре клеток. При FISH-анализе можно одновременно контролировать несколько сайтов, если зонды гибридизации были помечены разными флуорофорами. Метод дает быстрые результаты (через 1-2 дня), предлагает высокую аналитическую специфичность (более 98%). Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* превращается в необходимую аналитическую процедуру в ходе цитогенетического исследования и стал востребованным сегодня в пре- и постнатальной диагностике, в мониторинге зигот после искусственного оплодотворения в процедуре ПГД в ходе селекции эмбрионов с нормальным кариотипом и т.д. При этом метод не лишен и некоторых недостатков, среди которых ограниченная количеством выбранных зондов способность обнаруживать хромосомные аномалии, отсутствие информации о других хромосомах, которые не подвергались тщательной проверке. Невозможность обнаружения некоторых структурных хромосомных аномалий (например, инверсии).

Кроме FISH-анализа, все более широкое использование инструментов, NGS (секвенирование следующего поколения), как для диагностических, так и для исследовательских целей, позволяет нам эффективно расширить наши знания в этой области, что важно при кариотипировании пациентов с репродуктивными проблемами, поскольку хромосомные изменения в кариотипе такой группы пациентов, как правило, не имеют отклонений в фенотипе [9].

Изучение материала замерших беременностей I триместра (наиболее доступный вариант – ворсины хориона) для выяснения причин как при естественной беременности, так и в циклах экстракорпорального оплодотворения, также выступает объектом для цитогенетической диагностики супружеских пар с репродуктивными проблемами. Кариотип клеток экстраэмбриональных оболочек плода хориона (плаценты), как правило, соответствует кариотипу зародыша. Этот материал можно получить при спонтанно замершей беременности у группы женщины с диагнозом привычное невынашивание (по определению ВОЗ – наличие в анамнезе у женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 недель). Представления о структуре хромосомных аномалий среди замерших беременностей сформированы на основе результатов многочисленных цитогенетических исследований

различных тканей зародышей, выполненных с использованием стандартного анализа метафазных хромосом.

В структуре выявленных хромосомных aberrаций в культуре абортного материала преобладают полиплоидии- 40%, трисомия 21 – 18%, трисомия 16 -11%, трисомия 18- 8%, трисомия 13 – 4%, моносомия X – 10%, прочие – 9% (рис.1) [10].



**Рис.1. Транслокационная форма синдрома Дауна. 46, XY, der(14;21)(q10;q10)+21)**

Однако, до 30% образцов тканей спонтанных абортусов оказываются не доступными для стандартного цитогенетического анализа вследствие дегенерации клеток [11]. Более широкие возможности исследования кариотипов материала абортусов дает молекулярно-цитогенетический анализ: FISH и NGS.

Основными задачами изучения материала замерших беременностей I триместра является выявление пациентов-носителей сбалансированных перестроек хромосом; выделение группы пациентов, у которых невынашивание неоднократно сопровождается той или иной хромосомной аномалией в кариотипе эмбриона и подготовка для них соответствующих рекомендаций. В семьях с невынашиванием и отягощенным акушерским анамнезом при нормальном кариотипе родителей и нормальном кариотипе абортуса целесообразно проведение хромосомного микроматричного анализа с целью определения микроделетий и микродупликаций. К ограничениям анализа относится невозможность выявления мозаицизма, полиплоидии, сбалансированных транслокаций, а также микроделетий и микродупликаций за пределами разрешающей способности метода.

Пациентам с проблемами репродуктивного характера может быть рекомендована генетиче-

ская диагностика половых клеток – ооцитов и сперматозоидов. Если носителем хромосомной аномалии (сбалансированной или несбалансированной, например, мозаичной формы синдром Тернера), является женщина, то возможно выполнение биопсии полярных телец с их последующим генетическим тестированием. Такая процедура представляет собой один из вариантов предимплантационной генетической диагностики. В цитогенетической лаборатории полярные тельца тестируют с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* либо на наличие анеуплоидий по хромосомам (X, Y, 18, 13, 21, 22, 16 и др.), либо на наличие структурной перестройки, которая ранее была обнаружена в кариотипе матери. Выполнение исследования способствует повышению вероятности наступления беременности в цикле ЭКО; уменьшению числа выкидышей; снижению риска потери беременности при других вариантах выполнения пренатальной диагностики – инвазивных методах (амниоцентез, хориоцентез), проводимых на более поздних сроках беременности. Надежность диагностического метода составляет более 90%.

Диагностика генетических нарушений сперматозоидов. Известно, что генетические факторы обуславливают, по крайней мере, 30–50% всех случаев тяжелых форм бесплодия у мужчин. Среди этих факторов выделяют основные три: изменения генетического аппарата на уровне хромосом – хромосомные аномалии (ХА), на уровне гена или группы генов (мутации), на уровне изменений тотальной ДНК (дисперсия хроматина и фрагментация ДНК). Вот почему, кроме стандартных морфологических, биохимических тестов, при мужском бесплодии рекомендовано применять молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические методы, которые позволяют оценить состояние генетического аппарата соматических и половых клеток у мужчин.

Метод FISH широко используют для исследования интерфазных ядер половых клеток (сперматозоидов) на предмет обнаружения многочисленных ХА (анеуплоидий). ХА в ядрах сперматозоидов могут встречаться у мужчин как с нормальным кариотипом, так и с измененным, однако с разной частотой. Доказано, что в последней группе их частота выше. Присутствие в кариотипе пациента числовой хромосомной aberrации или несбалансированной перестройки (дупликации), как правило, меняет дозовое соотношение генов, поэтому такие изменения повлекут за собой существенные отклонения в фенотипе (клиническая картина). Напротив, наличие в кариотипе aberrаций типа сбалансированных перестроек – транслокаций (робертсо-

новские и реципрокные), инверсий, некоторых маркерных хромосом, не несущих структурных генов, зачастую не приводят к потере или добавлению генетического материала. Их носители, как правило, фенотипически здоровы, но имеют риск рождения ребенка с хромосомной патологией. По данным литературы, если популяционная частота, например, таких сбалансированных транслокаций не превышает 0,1%, то их частота в группах мужчин и женщин с репродуктивными проблемами достигает 3,0–6,2% и 0,7–9,8% соответственно.

В последние годы широкую популярность приобрела гипотеза о том, что снижение репродуктивной функции иногда связано с патологическим состоянием общей ДНК сперматозоидов (фрагментированность – наличие одноцепочечных и двуцепочечных разрывов ДНК, неправильная упаковка хроматина и др.). В руководстве European Association of Urology по диагностике и лечению мужского бесплодия указано, что фрагментация ДНК сперматозоидов снижает шансы на зачатие естественным путем и повышает риск невынашивания беременности. В настоящее время патофизиологические механизмы, приводящие к фрагментации ДНК, еще не изучены. Предполагают, что причиной могут быть дефекты созревания хроматина сперматозоидов во время ремоделирования ядер в сперматиде, сперматозоиды с апоптотическими признаками в эякуляте и окислительный стресс, когда продуцируемые активные формы кислорода подавляют антиоксидантную защиту.

Доказано, что не всегда дефектный сперматозоид внешне выглядит патологическим, а это особенно важно при проведении процедуры ICSI, поскольку сперматозоиды, которые подбирают для цикла на основе нормальной морфологии, могут иметь повреждение на уровне молекулы ДНК. Предположительно сперматозоид с фрагментированной ДНК может оказывать отрицательное влияние на ранние этапы эмбрионального развития, особенно на формирование бластоцисты, что приводит к замиранию беременности. Таким образом, анализ фрагментации ДНК сперматозоидов может служить эффективным прогностическим инструментом, выявляющим мужской фактор нарушения фертильности. В норме содержание сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, не должно превышать, по данным разных авторов, 20–30%.

Наиболее часто применяемыми тестами для определения фрагментации ДНК являются Comet, TUNEL и анализ дисперсии хроматина (Halo). Метод Comet основан на принципе электрофореза, в результате которого фрагменты ДНК движутся от её основной массы в виде

«хвоста кометы». Метод TUNEL основан на флуоресцентной маркировке свободных концов нуклеотидных последовательностей, благодаря которой удаётся фиксировать количество одноцепочечных и двуцепочечных разрывов ДНК. Метод Halo, в отличие от других, выявляет не повреждённую, а цельную ДНК, вокруг которой образуется «ореол» из двуцепочечных петель после удаления протаминов.

Подходы к преодолению повышенной фрагментации в сперматозоидах человека начинают только разрабатываться, поэтому, ввиду неблагоприятного влияния высокого уровня фрагментации ДНК сперматозоидов на вынашивание беременности и частоту выкидышей, необходимо своевременное определение индекса фрагментации ДНК сперматозоидов и его коррекция такими методами, как изменение образа жизни, медикаментозная терапия и, в особых случаях, применение тестикулярных сперматозоидов в лечебных циклах ВРТ (ЭКО + ICSI).

Пренатальная диагностика – комплекс мероприятий, направленных на выявление врожденной и наследственной патологии у плода. Её разделяют на неинвазивную и инвазивную. Пренатальная неинвазивная диагностика призвана формировать группы высокого риска по возможности возникновения хромосомной (генной) патологии у потомства, в том числе у пациентов с репродуктивными проблемами. Основная задача такой диагностики – проведение в наиболее ранние сроки скринингов для беременных: в сроке 11–14 недель проводится ультразвуковой и биохимический скрининг с расчетом индивидуального комбинированного риска по хромосомным aberrациям с помощью специальных компьютерных программ. Группе высокого риска проводится инвазивная пренатальная диагностика, с целью кариотипирования плода. К неинвазивным пренатальным исследованиям в настоящее время следует отнести и неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ), которое позволяет при взятии образца крови матери, начиная уже с 10 недели беременности, провести генетическое тестирование ДНК. НИПТ основано на анализе внеклеточной ДНК (вкДНК) в материнской крови. Фетальный компонент вкДНК составляет примерно 10–20% от общего количества внеклеточной ДНК. Источником фетального компонента в ДНК является плацента, но она представляет весь генотип плода и быстро выводится из кровотока матери во время родов, что делает ее специфичной для беременности. Благодаря развитию генетических технологий стало возможным проводить высокоточный подсчет одиночных молекул и, таким образом, обнаруживать небольшие изменения в количестве

последовательностей на интересующей хромосоме в крови [12].

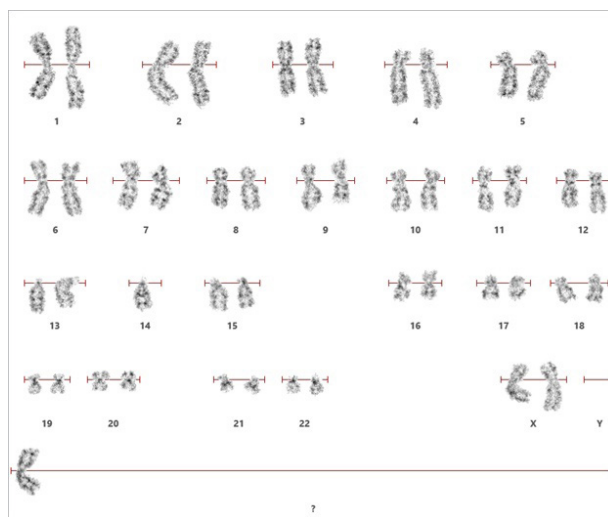
Неинвазивное пренатальное тестирование получило широкую валидацию, включая сравнение со стандартным пренатальным скринингом на анеуплоидию. Согласно современным представлениям – это высокоточный скрининговый тест с чувствительностью до 99% и специфичностью 99,5%, который можно использовать для определения риска самой распространенной хромосомной анеуплоидий – трисомии 21 хромосомы. По другим трисомиям чувствительность значительно ниже. Данный метод не лишен недостатков. В первую очередь это высокая стоимость анализа. Помимо этого, поскольку неинвазивное пренатальное тестирование исследует всю вкДНК в материнской крови (фетальный и материнский компоненты), результаты, которые не соответствуют кариотипу плода, могут быть получены в результате обнаружения материнских хромосомных перестроек или мозаицизма, в том числе плацентарного, и др. [13]. Так же, могут иметь место ложноотрицательные результаты: из-за низкого уровня фетальной вкДНК или технических лабораторных сложностей. Таким образом, НИПТ не является итоговым диагностическим методом и требует подтверждения положительного результата инвазивным исследованием.

При этом следует отметить, что НИПТ обладает гораздо большей чувствительностью, чем традиционные методы скрининга, для трисомии 21 и значительно снижает потребность в инвазивном тестировании [14]. Так, исследование почти 16000 несостоявшихся беременностей подтвердило более высокие показатели выявления синдрома Дауна с использованием НИПТ по сравнению с традиционным комбинированным скринингом в первом триместре с ложноположительным уровнем 0,06% по сравнению с 5,4% и положительной прогностической ценностью 80,9% по сравнению с 3,4% соответственно [14]. В настоящее время в разных странах проводятся когортные исследования, направленные на оценку эффективности и экономическое обоснование включения НИПТ в схему скрининговой программы 1 триместра беременности. Основными рекомендованными показаниями для проведения неинвазивного пренатального тестирования является повышенный риск хромосомной патологии по результатам комбинированного скрининга (средние скрининг-риски 1/100-1/300); невозможность проведения инвазивной ПД, в связи с наличием противопоказаний; угроза прерывания беременности в ранние сроки; желание беременной женщины. При этом существуют и некоторые ограничения, в виде многоплодной

беременности, редукции одного эмбриона по результатам УЗИ-исследования, применения донорских ооцитов или программ с вовлечением суррогатной матери и др.

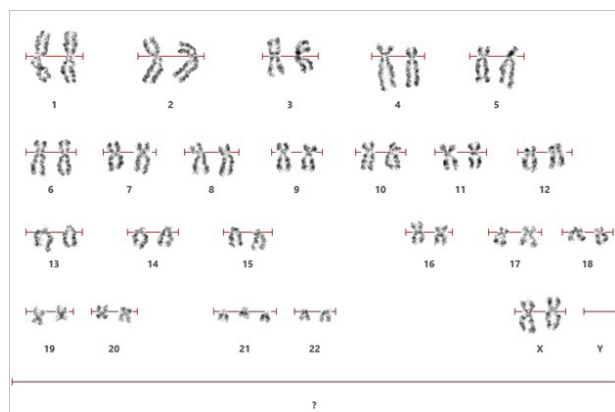
В случае положительного результата НИПТ для принятия решения о пролонгировании или прерывании беременности рекомендована инвазивная пренатальная диагностика. Биопсия ворсин хориона – один из наиболее оптимальных методов инвазивной пренатальной диагностики, проводится в период 9-12 недель беременности, риск самопроизвольного аборта при биопсии хориона составляет 1% [15]. Процедура включает аспирацию плацентарной ткани под ультразвуковым контролем и может выполняться с использованием чрескожного трансабдоминального, трансвагинального или трансцервикального доступа. В настоящее время в РФ подавляющем большинстве используется трансабдоминальный доступ.

Среди методов инвазивной пренатальной диагностики также используется амниоцентез – забор амниотической жидкости. В отличие от биопсии ворсин хориона метод является культуральным, так называемым «золотым стандартом» цитогенетики, т.к. позволяет исключить возможный плацентарный мозаицизм. Оптимальным сроком для проведения данного исследования является 16-20 недель. Риск самопроизвольного выкидыша - 1% (рис 2, 3).



**Рис.2. Транслокационная форма синдрома Патау в биоптате ворсин хориона. 46, XX,der(13;14)(q10;q10)+13.**

Еще одним методом инвазивной пренатальной диагностики является кордоцентез – пункция пуповины плода. Оптимальный срок выполнения кордоцентеза – 20-22 недели, риск самопроизвольного аборта – до 3%. Исследование лимфоцитов крови плода при кордоцентезе



**Рис.3. Синдром Дауна в биоптате ворсин плаценты. 47, XX,+21.**

тезе позволяет выявить генные и хромосомные болезни.

Ранее множественные врожденные пороки развития, врожденные пороки развития сочетанные с хромосомными аномалиями, ультразвуковые маркеры хромосомных болезней у плода или положительные результаты НИПТ, сбалансированная хромосомная перестройка у кого-либо из родителей, высокий риск рождения ребенка с синдромом Дауна по результатам комбинированного индивидуального риска (1:100 и выше) являлись абсолютными показаниями для проведения инвазивной пренатальной диагностики с целью исключения хромосомных болезней плода, но после внедрения системы раннего пренатального скрининга они значительно изменились.

Предимплантационную генетическую диагностику можно рассматривать как один из методов пренатальной инвазивной диагностики. Проведение ПГД стало возможным благодаря появлению метода FISH. Такое генетическое тестирование эмбриона проводят еще до переноса его в полость матки и наступления беременности. Впервые ПГД провели в 1988 г. в Лондоне (Великобритания). С тех пор в рамках программы ЭКО процедура ПГД применяется все чаще, поскольку позволяет повысить шансы на наступление беременности, особенно в позднем репродуктивном периоде, а также позволяет свести к минимуму риски появления потомства с генетическими аномалиями. Взятие материала эмбриона для анализа (биопсия) может проводиться на разных сроках развития эмбриона. Одним из вариантов является биопсия полярных телец ооцита, о которой мы писали выше. Метод технически сложен и имеет существенные ограничения, так как дает косвенную информацию только о яйцеклетке, а не об эмбрионе. Применяется в основном в странах, где действуют ограничения на манипуляции с эмбрионами.

Биопсия blastomera – выполняется на 3-й день развития эмбриона, когда эмбрион состоит из 6-10 клеток. Ограничением такого метода считается высокий уровень мозаицизма эмбрионов (до 55-73% по оценкам разных авторов), то есть хотя бы одна клетка эмбриона может иметь отличное от других количество хромосом. Биопсия трофэктодермы blastocysty – набирает все большую популярность в репродуктивной медицине – проводится на 5-6 день развития. Для анализа забирают несколько клеток наружной части blastocysty, которая не вовлечена в последующее формирование эмбриона и дает начало плаценте. Такой метод биопсии технически сложен, но имеет преимущества: большее количество материала для анализа и гораздо более низкий уровень мозаицизма эмбрионов на этой стадии развития. Общей характеристикой всех этапов биопсии является ограниченное количество образцов, доступных для генетического анализа, – зачастую это одна клетка. Именно этот аспект ПГД наиболее технически сложный, потенциально он может усугубляться неоптимальным качеством биопсии эмбриона и/или эмбриональных клеток.

После взятия материала проводят FISH-диагностику на заинтересованные, согласно анамнезу супружеской пары, хромосомы или диагностику ДНК одной клетки с помощью модификаций полимеразной цепной реакции. Хотя FISH-метод обеспечивает точный скрининг определенного числа хромосом, метод ограничен тем, что менее половины хромосом может быть оценено в каждой биопсированной клетке. Установлено, что применение FISH-диагностики не позволяет обнаружить до 20% эмбрионов с аномалиями [16]. Благодаря ПЦР-методу возможно провести диагностику таких заболеваний как муковисцидоз, гемофилия, выявить хромосомные нарушения, определить антигены HLA и резус-фактор [17]. Протоколы ПЦР должны соответствовать определенным условиям: результаты должны быть получены в максимально сжатые сроки, быть надежными, чувствительными и, прежде всего, абсолютно точными, чтобы исключить ошибочный диагноз. Еще одним методом оценки биоптатов является метод сравнительной геномной гибридизации на микроматрицах (CGH), который позволяет проводить исследование всех хромосом [16; 18]. Однако, самым инновационным методом диагностики считается сегодня метод NGS – высокопроизводительное секвенирование.

Предимплантационная генетическая диагностика позволяет значительно повысить эффективность лечения методами ВРТ пациентов, страдающих бесплодием, а также предотвратить

рождение ребенка с наследственным заболеванием [19]. Выявление генетического заболевания у плода методами инвазивной пренатальной диагностики предполагает необходимость прерывания беременности; предимплантационная диагностика преследует цель наступления беременности изначально здоровым плодом. Практика показала, что успех программы ВРТ с ПГД с применением NGS наступает в 70% случаев [19]. Секвенирование следующего поколения приобрело популярность благодаря его способности выявлять несбалансированные транслокации, сегментарные анеуплоидии, некоторые триплоидии и более низкие уровни мозаицизма более эффективно, чем другие методы [20]. Этот аспект имеет важное клиническое значение, поскольку у мозаичных эмбрионов, по-видимому, нарушена жизнеспособность и снижена вероятность рождения живого ребенка. В связи с этим, исходы беременности с выполнением NGS улучшаются за счет исключения таких эмбрионов из протоколов ВРТ.

При проведении предимплантационной генетической диагностики полученные бластоцисты замораживают, а затем переносят в криопротоколе в матку. Безопасность методов ПГД для эмбрионов доказана: установлено, что биопсия эмбриона не повышает вероятности пороков развития человека, родившегося из этого эмбриона. Однако необходимо учитывать, что в ходе диагностики на эмбрион оказывается дополнительное воздействие, которое несколько снижает вероятность наступления беременности по сравнению с таким же показателем в классической программе ЭКО. Процедура ПГД прежде всего рекомендована при носительстве моногенных генетических заболеваний, хромосомных нарушениях (хромосомные перестройки, в том числе транслокации, анеуплоидии); старшем репродуктивном возрасте у женщин; невынашивании беременности; повторных неудачных попытках ЭКО; тяжелом мужском факторе бесплодия; необходимости определения резус-фактора или HLA-типирования эмбриона.

Генетическое консультирование. В настоящее время необходимости генетического обследования пациентов с нарушением репродуктивной функции уделяется все большее внимание. неотъемлемой частью этого процесса является генетическое консультирование семьи, направленное на оценку генетического риска и пути профилактики рождения ребенка с врожденной и наследственной патологией в каждой конкретной семье. Врач-генетик собирает клинико-генеалогический и акушерский анамнез, проводит объективный осмотр пациентов, оценивает результаты лабораторных исследований, определя-

ет объем необходимого обследования, оценивает генетические риски и рекомендует дальнейшую тактику снижения генетического и акушерского рисков.

В ряде случаев в связи с высокими генетическими рисками для потомства (наличие моногенного наследственного заболевания в семье, наличие структурных хромосомных перестроек у одного из супругов, наличие невынашивания в семье неуточненного генеза) семье рекомендуется проведение вспомогательных репродуктивных технологий.

При высоких рисках по хромосомным патологиям рекомендуется проведение ЭКО с предимплантационной диагностикой на хромосомные патологии. При наличии в семье наследственной моногенной патологии проводится поиск мутаций в опеределенном гене вызывающей развитие данного заболевания, а в случае X-сцепленной рецессивной патологии – определение пола плода. Для исключения микроделций и микродупликаций используется хромосомный микроматричный анализ эмбрионов. Наиболее точным исследованием, позволяющим определить максимальное количество изменений у плода, является метод NGS. В случае мужского фактора бесплодия супруга и при нормальном кариотипе назначается молекулярно-генетическое исследование, позволяющее определить микроделции Y-хромосомы, носительство гена муковисцидоза и количество AR-повторов (андрогенного рецептора). Молекулярно-генетическое исследование назначается и женщинам с бесплодием и невынашиванием для определения мутаций в генах, отвечающих за репродуктивную функцию.

В редких случаях, супружеской паре рекомендуется ЭКО спермой донора либо ЭКО с донорской яйцеклеткой. Такое решение является оправданным в случае наличия 5 и более совпадений аллелей в трех локусах генов соединительной ткани HLA-II класса, при носительстве Робертсоновской транслокации 21 хромосомы, наличие у одного из супругов моногенного заболевания или носительство у супругов аутосомно-рецессивного заболевания при невозможности проведения предимплантационной диагностики.

Следовательно, необходимо, чтобы врач-генетик, консультирующий по вопросам нарушения репродуктивной функции, владел знаниями или тесно сотрудничал с врачами других специальностей: эндокринологами, репродуктологами, андрологами, гинекологами, цитогенетиками и т.д. Однако врач-генетик решает специфический круг вопросов, которыми не занимаются врачи другого профиля, – это

определение риска передачи генетического нарушения по наследству, методы профилактики наследственной патологии, информирование о необходимости обследования для других членов семьи. Поэтому коллегиальное медико-генетическое консультирование имеет большое значение для принятия оптимальных решений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подходы к преодолению генетических аномалий начинают только разрабатываться, но благодаря развитию медико-генетических технологий стало возможным обнаруживать минимальные изменения в хромосомах как уже развивающегося плода, так и половых клеток родителей. Таким образом, на данный момент, для уменьшения частоты возникновения отклонений, необходимо своевременное выявление генетических нарушений, что даёт возможность их коррекции посредством изменения образа жизни, медикаментозной терапии и т.д. Дальнейшее развитие исследований в данной области позволит в перспективе открывать новые варианты лечения различных заболеваний, основывающиеся на технологиях геномного редактирования, для улучшения здоровья человека.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания № FZEG-2020-0060 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий».

**Funding.** This work was financially supported by state task No FZEG-2020-0060 of the Russian Ministry of Science in the field of scientific research on the topic «Algorithms for molecular-genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies.»

### ЛИТЕРАТУРА

- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-1351. doi:10.1126/science.1058040.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. doi:10.1038/35057062.
- Vrijenhoek T., Kraaijeveld K., Elferink M. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects *European Journal of Human Genetics*. 2015;23:1142–1150. doi:10.1038/ejhg.2014.279.
- Калякин М. В., Серегин А. П., Соловченко А. Е., Каменский П. А., Садовничий В. А. Проект «Ноев ковчег»: промежуточные итоги и перспективы развития классических коллекций. *Acta Naturae*. 2018;4(39):49-58.
- Zhernakova D. V., Brukhin V., Malov S. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia. *Genomics*. 2020;1:442-458. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.03.007.
- Hussein N., Weng S.F., Kai J., Qureshi N. Preconception risk assessment for thalassaemia, sickle cell disease, cystic fibrosis and Tay-Sachs disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;8:1–29. doi:10.1002/14651858.
- Demain L. A. M., Conway G. S., Newman W. G. Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility. *Clin Genet*. 2017;91:199–207. doi:10.1111/cge.12896.
- Cariati F., D'Argenio, V., Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med*. 2019;17:267. doi:10.1186/s12967-019-2019-8.
- Mastantuoni E., Saccone G., Al-Kouatly H. B., Paternoster M., D'Alessandro P., Arduino B. Expanded carrier screening: a current perspective. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;230:41–54. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.09.014.
- Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: монография. СПб.: Изд-во «Н-Л»;2007.
- Zhang T., Sun Y., Chen Z., Li T. Traditional and molecular chromosomal abnormality analysis of products of conception in spontaneous and recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2018;125(4):414-420. doi:10.1111/1471-0528.15052.
- Rafi I., Hill M., Hayward J., Chitty L. S. Non-invasive prenatal testing: use of cell-free fetal DNA in Down syndrome screening. *Br J Gen Pract*. 2017;67(660):298-299. doi:10.3399/bjgp17X691625.
- Nicolaidis K. H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011;31(1):7-15. doi: 10.1002/pd.2637.
- Norton M. E., Jacobsson B., Swamy G. K., Laurent L. C., Ranzini A. C., Brar H., Tomlinson M. W., Pereira L., Spitz J. L., Holleman D., Cuckle H., Musci T. J., Wapner R. J. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 2015; 372(17):1589-97. doi:10.1056/NEJMoa1407349.



15. Alfirevic Z., Navaratnam K., Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;9(9). article CD003252. doi:10.1002/14651858.pub2.

16. Schoolcraft W. B., Fragouli E., Stevens J., Munne S., Katz-Jaffe M. G., Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1700-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.015.

17. Dreesen J., Destouni A., Kourlaba G. Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(8):1012-1018. doi:10.1038/ejhg.2013.277.

18. Capalbo A., Wright G., Elliott T., Ubaldi F. M., Rienzi L., Nagy Z. P. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2013;28:2298-307. doi:10.1093/humrep/det245.

19. Friedenthal J., Maxwell S. M., Munné S., Kramer Y., McCulloh D. H., McCaffrey C., Grifo J. A. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* 2018;109(4):627-632. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.017.

20. Munne S., Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril.* 2017;107:1085-91. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.03.024.

## REFERENCES

1. Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304-1351. doi:10.1126/science.1058040.

2. Lander E. S., Linton L. M., Birren B. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921. doi:10.1038/35057062.

3. Vrijenhoek T., Kraaijeveld K., Elferink M. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects *European Journal of Human Genetics.* 2015;23:1142-1150. doi:10.1038/ejhg.2014.279.

4. Kaljakin M. V., Seregin A. P., Solovchenko A. E., Kamenskij P. A., Sadovnichij V. A. Proekt

«Noev kovcheg»: promezhutochnye itogi i perspektivy razvitija klassicheskikh kolekcij. *Acta Naturae.* 2018;4(39):49-58.

5. Zhernakova D. V., Brukhin V., Malov S. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia. *Genomics.* 2020;1:442-458. doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.03.007.

6. Hussein N., Weng S. F., Kai J., Qureshi N. Preconception risk assessment for thalassaemia, sickle cell disease, cystic fibrosis and Tay-Sachs disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;8:1-29. doi:10.1002/14651858.

7. Demain L. A. M., Conway G. S., Newman W. G. Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility. *Clin Genet.* 2017;91:199-207. doi:10.1111/cge.12896.

8. Cariati, F., D'Argenio, V., Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med.* 2019;17:267. doi:10.1186/s12967-019-2019-8.

9. Mastantuoni E., Saccone G., Al-Kouatly H.B., Paternoster M., D'Alessandro P., Arduino B. Expanded carrier screening: a current perspective. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018;230:41-54. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.09.014.

10. Baranov V. S., Kuznecova T. V. *Citogenetika jembrional'nogo razvitija cheloveka: monografija.* SPb.: Izd-vo «N-L»; 2007.

11. Zhang T., Sun Y., Chen Z., Li T. Traditional and molecular chromosomal abnormality analysis of products of conception in spontaneous and recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology,* 2018;125(4):414-420. doi:10.1111/1471-0528.15052.

12. Rafi I., Hill M., Hayward J., Chitty L. S. Non-invasive prenatal testing: use of cell-free fetal DNA in Down syndrome screening. *Br J Gen Pract.* 2017;67(660):298-299. doi:10.3399/bjgp17X691625.

13. Nicolaides K. H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011;31(1):7-15. doi:10.1002/pd.2637.

14. Norton M. E., Jacobsson B., Swamy G. K., Laurent L. C., Ranzini A. C., Brar H., Tomlinson M. W., Pereira L., Spitz J. L., Holleman D., Cuckle H., Musci T. J., Wapner R. J. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med.* 2015; 372(17):1589-97. doi:10.1056/NEJMoa1407349.

15. Alfirevic Z., Navaratnam K., Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;9(9). article CD003252. doi:10.1002/14651858.pub2.

16. Schoolcraft W. B., Fragouli E., Stevens J., Munne S., Katz-Jaffe M. G., Wells D. Clinical application of comprehensive

- chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1700-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.015.
17. Dreesen J., Destouni A., Kourlaba G., et al. Evaluation of PCR-based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(8):1012-1018. doi:10.1038/ejhg.2013.277.
18. Capalbo A., Wright G., Elliott T., Ubaldi F. M., Rienzi L., Nagy Z. P. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2013;28:2298–307. doi:10.1093/humrep/det245.
19. Friedenthal J., Maxwell S. M., Munné S., Kramer Y., McCulloh D. H., McCaffrey C., Grifo J. A. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* 2018;109(4):627-632. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.017.
20. Munne S., Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril.* 2017;107:1085–91. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.03.024.

УДК: 615.22.224:578.834.1

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-2-75-81

## ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВУЮ СИСТЕМУ, У БОЛЬНЫХ С COVID-19

Иванцова Н. Л., Белякова А. Г., Дмитриевская М. И., Усеинова А. Н., Мельникова В. М.,

Абрамова К. И.

Кафедра базисной и клинической фармакологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Иванцова Наталья Леонидовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: ivantsova69@mail.ru

**For correspondence:** Ivantsova N. L., Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ivantsova69@mail.ru

### Information about authors:

**Ivantsova N. L.**, <http://orcid.org/0000-0003-3325-7948>

**Beliakova A. G.**, <http://orcid.org/0000-0003-4928-5134>

**Dmitrievskaya M. I.**, <http://orcid.org/0000-0001-5722-1726>

**Useinova A. N.**, <http://orcid.org/0000-0003-0725-5455>

**Melnikova V. M.**, <http://orcid.org/0000-0001-7698-7954>

**Abramova K. I.**, <https://orcid.org/0000-0002-3535-6870>

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время основной задачей органов общественного здравоохранения является разработка скоординированных глобальных мер для подготовки систем здравоохранения к решению проблемы распространения коронавирусной инфекции. Гипертония, ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет, особенно у пожилых людей, повышают восприимчивость к инфекции SARS-CoV-2. Антигипертензивные препараты – это группа лекарственных средств, необходимых для снижения артериального давления. К группе данных лекарств относятся ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2). АПФ2 – это специфическая мишень для SARS-CoV-2. Процесс проникновения и инфицирования которого, облегчается за счет сродства S-белка, находящегося на поверхности вируса, и АПФ2 рецептора человека. По этой причине проникновение вируса в клетки хозяина может облегчаться. Однако данная связь не влияет на ухудшение симптомов и течения коронавирусной инфекции за счет того, что при связывании спайкового белка SARS-CoV-2 (S-белка) с АПФ2 возможна индукция выпадения АПФ2 с поверхности клетки, что и снижает поверхностную экспрессию АПФ2. Влияние вируса обусловлено не только связыванием с АПФ2, но и с трансмембранной протеазой серин 2 (TMPRSS2). Доказано, что именно процесс связывания с TMPRSS2 играет более выраженную роль в инфицировании SARS-CoV-2, чем ангиотензин-превращающий фермент 2. Следовательно, прекращение приема антигипертензивных средств во время коронавирусной инфекции у людей с сердечно-сосудистыми заболеваниями является нецелесообразным.

**Ключевые слова:** антигипертензивные лекарственные средства; SARS-CoV; спайковые белки (S-белки); ангиотензин-превращающий фермент 2 (АПФ2); ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС).

### PECULIAR PROPERTIES OF USAGE OF DRUGS THAT AFFECT THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN PATIENTS WITH COVID-19

Ivantsova N. L., Beliakova A. G., Dmitrievskaya M. I., Useinova A. N., Melnikova V. M., Abramova K. I.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

Currently, the main task of public health authorities is a developing of coordinated global measures to prepare health systems to deal with the spread of coronavirus infection, an accompanying concern has been identified that is of particular interest to clinicians and researchers about hypertension. Hypertension, coronary artery disease and diabetes mellitus, especially in the elderly, increase susceptibility to SARS-CoV-2 infection. Antihypertensive drugs decrease blood pressure due to dilating blood vessels and decreasing cardiac output. One of the groups of these drugs includes inhibitors of angiotensin-converting enzymes (ACE). Angiotensin-converting enzyme 2 is a specific target for SARS-CoV-2, specially for the S-protein, which is located on its surface, and therefore the relationship of ACE inhibitors and the course of the disease plays an important role in treatment, since the penetration process and infection is facilitated by the affinity of the virus S-protein and the human ACE2 receptor. For this reason, the penetration of the virus into the host cells can be facilitated. However, this relationship does not affect the worsening of symptoms and the course of coronavirus infection due to the fact that when the SARS-CoV-2 spike protein (S-protein) binds to ACE2,

it is possible to induce the induction of ACE2 shedding from the surface, which also reduces the surface expression of ACE2. The effect of the virus is not only due to binding to ACE2, but also to TMPRSS2. It has been proven that it is because of its binding to TMPRSS2 that it plays a greater role in infection with SARS-CoV-2 than angiotensin-converting enzyme 2. Therefore, it is not advisable to stop taking antihypertensive drugs during coronavirus infection in people with cardiovascular diseases.

**Key words: antihypertensive drugs; SARS-CoV-2; spike proteins (S-proteins); angiotensin converting enzyme 2 (ACE2); renin-angiotensin-aldosterone system**

В настоящее время основной задачей органов общественного здравоохранения является разработка скоординированных глобальных мер для подготовки систем здравоохранения к решению проблемы распространения коронавирусной инфекции. Сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет, особенно у пожилых людей, повышают восприимчивость к инфекции SARS-CoV-2 [1; 2]. Препараты, снижающие артериальное давление – это группа лекарственных средств, наиболее часто назначаемых медикаментов в мире, что связано, в первую очередь, с высокой распространенностью артериальной гипертензии. К группе данных лекарств относятся ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2). АПФ2 – это специфическая мишень для SARS-CoV-2. Коронавирусная инфекция, вызванная тяжелым острым респираторным синдромом коронавируса-2 (SARS-CoV-2), была обнаружена в КНР в декабре 2019 года. Распространение тяжелого острого респираторного синдрома коронавируса-2 приняло масштабы пандемии, заразив > 100000 человек в 100 странах [1; 3]. Во всем мире с начала пандемии число умерших от связанных с COVID-19 заболеваний достигло 3 162 166 человек, излечились более 127 млн. В число стран с более 10 млн случаев заражения COVID-19 входят США, Индия и Бразилия. Лидером по числу заразившихся и скончавшихся остаются Соединенные Штаты, где выявлено суммарно 32 288 689 инфицированных COVID-19, зафиксирован 575 193 летальных исходов. Второе место по числу заразившихся занимает Индия, где количество подтвержденных случаев COVID-19 с начала пандемии составило 18 376 524, число скончавшихся – 204 832, выздоровело более 15 млн человек. В Бразилии зарегистрировано 14 590 678 заболевших, из них умерли 401 186 человек, выздоровели почти 13 млн. [4].

COVID-19 представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус [5]. Актуальность данной статьи обусловлена массовым распространением, заражением и высокой частотой летальных исходов от коронавирусной инфекцией. Особую роль играет наличие хронических заболеваний, касающихся сердечно-сосудистой системы, приема антигипертензивных средств на фоне коронавирусной инфекции [6]. Основной

целью работы является выявление положительных сторон приема антигипертензивных препаратов во время инфицирования COVID-19, выяснение причин улучшения состояния больных на фоне приема данной группы лекарственных средств.

Ренин-ангиотензин альдостероновая система (РААС) - важная гормональная система, которая, как известно, регулирует объемный гомеостаз и артериальное давление. РААС состоит из различных ферментов, биоактивных пептидов и рецепторов, которые вызывают разнообразные и противоположные клеточные и физиологические реакции [7].

Было обнаружено, что спайковые белки, которые играют важную роль в жизнедеятельности вириона, образуют подобия шипов и имеют почти идентичные трехмерные структуры в рецептор-связывающем домене. Данные белки играют ключевую роль в проникновении и инфицировании в здоровые клетки организма. S-белки имеют сродство с человеческим АПФ2 и плотно связывают вирус с рецепторными белками человека [8]. Также спайковые белки SARS-CoV-2 имеют 77% идентичности в аминокислотных последовательностях. Кроме того, для входа требуется праймирование S-белка клеточными протеазами, что влечет за собой расщепление S-белка в сайтах S1 / S2 и S2 'и способствует слиянию вирусной и клеточной мембран [9].

АПФ2 присутствует в артериальных и венозных эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках артерий и легочной ткани [10]. В ходе ряда исследований было выявлено, что глутамин в рецептор-связывающем домене SARS-CoV-2 может распознаваться лизином на рецепторе АПФ2. Основываясь на этом, вход в клетку-хозяин, опосредованный SARS-S, анализировали с использованием лентивирусной векторной системы. Через 48 ч после трансфекции клетки отделяли и промывали буфером, окрашивали козьей антисывороткой против АПФ2. После трех промывок буфером FACS клетки фиксировали 2% параформальдегидом и анализировали в проточном цитометре. Чтобы предотвратить удержание фрагментов расщепления АПФ2 на поверхности клетки, АПФ2 и клетки, коэкспрессирующие протеазу, осаждали и инкубировали с буфером на льду. Затем клетки

снова осаждали и собирали супернатанты, наличие АПФ2 в осадках и супернатантах анализировали вестерн-блоттингом [11].

Трансмембранная протеаза серин 2 (TMPRSS2), которая взаимодействует с АПФ2, может быть мишенью для таргетной терапии. И АПФ2, и TMPRSS2 экспрессируются во многих тканях хозяина, но уровни экспрессии АПФ2 и TMPRSS2 более выражены в клетках мужчин. Это говорит о том, что различия в экспрессии TMPRSS2 и АПФ2 в легких и других тканях, не зависящих от пола, могут не объяснять гендерные различия в тяжести SARS-CoV-2. Однако нацеливание на уровни активности и экспрессии TMPRSS2 является рациональным подходом к лечению COVID-19 и требует дальнейшего изучения. SARS-CoV может использовать эндосомальные цистеиновые протеазы катепсина В и L (CatB / L) и сериновую протеазу TMPRSS2 для праймирования S белков в клеточных линиях, а ингибирование обеих протеаз необходимо для надежной блокады проникновения вируса [12]. Чтобы определить, может ли SARS-CoV-2 использовать CatB / L для проникновения в клетки, использовался хлорид аммония, который повышает эндосомальный pH и тем самым блокирует активность CatB / L. В качестве мишеней использовались клетки 293T (TMPRSS2 - трансфицированные для экспрессии АПФ2 для устойчивого входа, управляемого S-белком) и клетки Caco-2. Хлорид аммония блокировал VSV-G-зависимый вход в обе клеточные линии. Обработка хлоридом аммония сильно ингибировала управляемое SARS-2-S и SARS-S проникновение в клетки TMPRSS2 - 293T. Ингибирование проникновения в клетки TMPRSS2 + Caco -2 было менее эффективным по сравнению с клетками 293T. Клинически доказанный ингибитор сериновой протеазы камостат мезилат, который активен против TMPRSS2, частично блокировал управляемое SARS-2-S проникновение в клетки Caco -2 и Vero-TMPRSS2. Чтобы проанализировать, может ли TMPRSS2 спасти управляемое SARS-2-S проникновение в клетки с низкой активностью CatB / L, клетки 293T, временно экспрессирующие АПФ2 отдельно или в комбинации с TMPRSS2, инкубировали с ингибитором CatB / L E-64d или DMSO. в качестве контроля и инокулировали псевдотипами, несущими указанные вирусные поверхностные белки. В совокупности SARS-CoV-2 может использовать TMPRSS2 для праймирования S-белка, а мезилат камостата, ингибитор TMPRSS2, блокирует заражение SARS-CoV-2 клеток легких. Следовательно, влияние вируса обусловлено не только связыванием с АПФ2, но и с TMPRSS2 [13].

Активация рецептора АПФ2 предотвращает развитие патологических процессов, таких как воспаление, активация симпатической нервной системы, апоптотическая гибель клеток, аутофагия [14]. Параллельно стимуляция рецептора АПФ2 активирует защитные механизмы в сердце, такие как регенерация сердца, расширение коронарных сосудов и компенсаторная гипертрофия сердечных миоцитов. Активация рецептора АПФ2 также косвенно ответственна за активацию рецептора Mas (MasR), который также может вносить вклад в защитные механизмы. Уменьшение размера инфаркта и улучшение сердечной деятельности после острого инфаркта миокарда можно объяснить полезными клеточными механизмами активации АПФ2, такими как противовоспалительный и антиапоптотический [6].

Согласно статистическим данным наиболее частой группой заражения COVID-19 являются пациенты с хроническими заболеваниями сердца [15]. Однако, связь этих двух факторов скорее всего обусловлена возрастной категорией самих больных, так как к данной группе пациентов относятся пожилые люди, которые больше подвержены появлению осложнений [16].

Сходство SARS-CoV-2 с клетками человека имеет большое значение, так как оно обуславливает выживаемость вируса в клетке хозяина и его дальнейшую репликацию [17; 18; 19]. Ренин влияет на начальную стадию преобразования пептидов за счет отщепления N-концевого декапептида. АПФ играет роль в превращении ангиотензина-1 в ангиотензин-2. АПФ – это мишень для ингибиторов АПФ при лечении хронических заболеваний сердца [20]. Функция АПФ2 заключается в превращении ангиотензина-1 в ангиотензин 1-9 и ангиотензина-2 в ангиотензин 1-7. Однако, несмотря на схожесть функциональных особенностей АПФ2 и АПФ, АПФ способствует вазодилатации, а АПФ2 вазоконстрикции. АПФ2 - это входной рецептор вируса для SARS-CoV-2, но в тоже время проявляет защитные для человека функции, обеспечивает гомеостаз кровяного давления через регулирование ренин-альдостерон-ангиотензиновой системы [3].

Высокая экспрессия АПФ2 ограничена эндотелиальными клетками артерий, артериол и венул сердца и почек, следовательно, является потенциальной терапевтической мишенью при лечении гипертонии и сердечных дисфункций. Опираясь на исследования, можно сделать вывод о том, что низкие уровни АПФ2 могут привести к повышенному уровню Ангиотензину II и, следовательно, к гипертонии [10]. Гипертоническая болезнь сердца характеризуется по-

вышенным артериальным давлением, таким образом, для лечения данного заболевания применяют препараты, способствующие снижению артериального давления. К данной группе лекарственных средств относят антигипертензивные препараты. Основным механизмом действия – это ингибирование АПФ, из-за чего тормозится отрицательное действие ангиотензина II на сердечно-сосудистую систему, в связи с чем, происходит вазодилатация и понижение давления [21].

Биологическое значение превращения ангиотензин II в ангиотензин- (1-7) двоякое: снижая ангиотензин II, можно предотвратить его потенциально пагубные действия; кроме того, образуется ангиотензин- (1-7), и этот пептид обладает тканезащитным действием, которое обычно противоположно нежелательным хроническим эффектам чрезмерного накопления ангиотензина II [22; 23; 24]. Это подчеркивает важность ферментов, которые расщепляют ангиотензин II с образованием ангиотензин - (1-7). Известно, что два других фермента образуют ангиотензин - (1; 7) непосредственно в результате расщепления ангиотензин II: пролилкарбоксипептидаза (PRCP) и пролилэндопептидаза POP. PRCP представляет собой серинкарбоксипроотеиназу, которая расщепляет С-концевую аминокислоту различных пептидов, таких как ангиотензин II, где предпоследней аминокислотой является пролин. Активность фермента чрезвычайно зависит от pH с оптимумом в кислотном диапазоне и практически не проявляет активности при физиологическом pH плазмы. POP представляет собой сериновую протеазу, которая участвует в ферментативной деградации несколько биологически активных пептидов, таких как ангиотензин I и ангиотензин II [25; 26]. Ферментативная активность POP была обнаружена в лимфоцитах, тромбоцитах, коре почек, эпителиальных клетках. Активность POP также была обнаружена в плазме, но физиологическая роль циркулирующих POP не была установлена [25].

При проникновении SARS-CoV-2 в клетки легких человека и присоединении к АПФ2 была выявлена роль трансмембранной сериновой протеазы (TMPRSS2), которая начинает экспрессироваться и способствовать заражению клеток вирусами. Данные процессы происходят за счет гидролиза S-белка вируса и его слияния с плазматической мембраной клетки человека [27; 28; 29]. Доказано, что TMPRSS2 способен к расщеплению АПФ2, что и ведет к облегчению инфицирования. Следовательно, сам АПФ2 не является причиной заражения, а лишь является мишенью для протеазы, которая и играет роль индуктора [7].

Несколько эпидемиологических исследований установили повышенную смертность у пациентов с артериальной гипертензией COVID-19. Однако важнейший вопрос, который остается без ответа, заключается в том, связана ли эта ассоциация исключительно с патогенезом артериальной гипертензии или с лечением антигипертензивными средствами [11].

Во-первых, повышенное содержание ИАПФ-2 оказывает мощное сосудорасширяющее, антиоксидантное и противовоспалительное средство. Так как АПФ2 регулирует секрецию ангиотензина (1; 7), который при связывании с рецептором Mas свойствами, которые при широком связывании с рецептором Mas смещают баланс от вазоконстрикции к вазодилатации с активацией рецептора Mas в пораженном сосудистом русле [30]. Также в ходе еще одного исследования было доказано положительное влияние антигипертензивных лекарственных средств на течение коронавирусной инфекции, наблюдалась меньшая частота смертности [9].

Также при связывании спайкового белка SARS-CoV-2 (S-белка) с АПФ2 можно индуцировать выпадение АПФ2 с поверхности клетки, что, в свою очередь, снижает поверхностную экспрессию АПФ2. На основе этих данных было предложено восстановление АПФ2 путем введения рекомбинантного АПФ2, чтобы обратить процесс повреждения легких во время вирусных инфекций [13].

**Заключение.** Таким образом, можно сделать вывод о том, что прием антигипертензивных препаратов (ингибиторов АПФ) не ухудшают течение COVID-19, а наоборот улучшают, с связи с подавлением экспрессии АПФ2 и предотвращению связывания спайкового белка (S-белка) SARS-CoV-2 с АПФ2 в легких. Любая результирующая дестабилизация контроля артериального давления при гипертонии, которая может возникнуть при смене лекарств, будет нести неприемлемый риск ускорения инсульта и сердечного приступа, риски, которые явно не являются чисто гипотетическими. Следовательно, при проведении параллельного лечения коронавирусной инфекции и гипертонической болезни сердца, прекращение приема антигипертензивных средств является нецелесообразным.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шпаков А. О. Ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа, как молекулярный посредник для инфицирования клетки

- вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2020;106(7):795–810. doi:10.31857/S0869813920060138
2. Zheng Y. Y., Ma Y. T., Zhang J. Y., Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.* 2020;259-260. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>
  3. Batlle D., Wysocki J., Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? *Clin. Sci. (Lond)*. 2020;134:543-545. doi:10.1042/CS20200163
  4. Онлайн карта распространения коронавируса [Электронный ресурс]. *Coronavirus Monitor*. Доступно по: <https://coronavirus-monitor.ru>. Ссылка активна на 30.04.2021.
  5. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001.
  6. Kaschina E., Namsolleck P., Unger T. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Res.* 2017;125(Pt A):39-47. doi:10.1016/j.phrs.2017.07.008.
  7. Fang L., Karakiulakis G., Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for Covid-19 infection? *Lancet Respir. Med.* 2020;8(4):20-21. doi:10.1016/S2213-2600(20)30116-8.
  8. Arendse L. B., Danser A. H., Poglitsch M., Touyz R. M., Burnett J. C. Jr., Llorens-Cortes C., Ehlers M. R., Sturrock E. D. Novel Therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure. *Pharmacol. Rev.* 2019;71(4):539-570. doi:10.1124/pr.118.017129.
  9. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T. S., Herrler G., Wu N. H., Nitsche A., Müller M. A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. 2020;271-280. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
  10. Danser A.H.J., Epstein M., Batlle D. Renin-angiotensin system blockers and the COVID-19 Pandemic: At present there is no evidence to abandon renin-angiotensin system blockers. *Hypertension*. 2020;1382-1385. doi:10.1161/Hypertensionaha.120.15082.
  11. Heurich A., Hofmann-Winkler H., Gierer S., Liepold T., Jahn O., Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* 2014;88(2):1293–307. doi:10.1128/JVI.02202-13.
  12. Mukerjee S., Gao H., Xu J., Sato R., Zsombok A., Lazartigues E. ACE2 and ADAM17 Interaction Regulates the Activity of Presympathetic Neurons. *Hypertension*. 2019;74(5):1181–1191. doi:10.1161/hypertensionaha.119.13133
  13. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395:497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
  14. Saavedra J. M., Armando I. Angiotensin II AT2 receptors contribute to regulate the sympathoadrenal and hormonal reaction to stress stimuli. *Cell Mol. Neurobiol.* 2018;38(1):85–108. doi:10.1007/s10571-017-0533-x.
  15. South A. M., Diz D., Chappell M. C. COVID-19, ACE2 and the Cardiovascular Consequences. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2020;1084-1090. doi:10.1152/ajpheart.00217.2020.
  16. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;215-220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
  17. Chen W. H., Strych U., Hotez P. J., Bottazzi M. E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2020;3:1–4. doi:10.1007/s40475-020-00201-6.
  18. Yushun W., Jian S., Rachel G., Ralph S., Fang L. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *American Society for Microbiology. Journal of Virology*. 2020;127-200. doi:10.1128 / JVI.00127-20.
  19. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R. S., Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS. *J. Virol.* 2020;127-120. doi:10.1128/JVI.00127-20.
  20. Mira B., Thangavel A., Mohamed A., Muath A., Jehad A., Fahd A. *Molecular Therapy. Methods and Clinical Development*. 2020;321-327. doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.017
  21. Zhou P., Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H. R., Zhu Y., Li B., Huang C. L., Chen H. D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R. D., Liu M. Q., Chen Y., Shen X. R., Wang X., Zheng X. S., Zhao K., Chen Q. J., Deng F., Liu

- L.L., Yan B., Zhan F. X., Wang Y. Y., Xiao G. F., Shi Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270–273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
22. Varagic J., Ahmad S., Nagata S., Ferrario C. M. ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1–7) balance in cardiac and renal injury. *Curr. Hypertens. Rep.* 2014;16(3):420. doi:10.1007/s11906-014-0420-5.
23. Turu G., Balla A., Hunyady L. The Role of  $\beta$ -arrestin proteins in organization of signaling and regulation of the AT1 angiotensin receptor. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019;10:519. doi:10.3389/fendo.2019.00519
24. Wu C., Lu H., Cassis L. A., Daugherty A. Molecular and pathophysiological features of angiotensinogen: a mini review. *N. Am. J. Med. Sci. (Boston)*. 2011;4:183-190. doi:10.7156/v4i4p183.
25. Patel S., Hussain T. Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018;20(5):41. doi:10.1007/s11906-018-0845-3
26. Patel V. B., Zhong J. C., Grant M. B., Oudit G. Y. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circ. Res.* 2016;118(8):1313-1326. doi:10.1161/Circresaha.116.307708.
27. Zhang H., Han G. W., Batyuk A., Ishchenko A., White K. L., Patel N., Sadybekov A., Zamlyny B., Rudd M. T., Hollenstein K., Tolstikova A., White T. A., Hunter M. S., Weierstall U., Liu W., Babaoglu K., Moore E. L., Katz R. D., Shipman J. M., Garcia-Calvo M., Sharma S., Sheth P., Soisson S. M., Stevens R. C., Katritch V., Cherezov V. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature*. 2017;544(7650):327-332. doi:10.1038/nature22035.
28. Lu H., Cassis L. A., Kooi C. W., Daugherty A. Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens. Res.* 2020;39(7): 492-500. doi:10.1038/hr.2016.17.
29. Zunke F., Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2017;2059–2070. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.001.
30. Xu J., Sriramula S., Xia H., Moreno-Walton L., Culicchia F., Domenig O., Poglitsch M., Lazartigues E. Clinical relevance and role of neuronal AT1 receptors in ADAM17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension. *Circ. Res.* 2017;121: 43-55. doi:10.1161/Circresaha.116.310509.
- the Entry of SARS-Cov and SARS-Cov-2 Viruses into the Cell. *Russian Physiological Journal I.M. Sechenov*. 2020;106 № 7;795–810. doi: 10.31857/S0869813920060138 (in Russ).
2. Zheng Y. Y., Ma Y. T., Zhang J. Y., Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.* 2020;259-260. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>
3. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001.
4. Online map of the spread of coronavirus [Internet]. *Coronavirus Monitor*. Available at: <https://coronavirus-monitor.ru>. Accessed 04.30.2021.
5. Batlle D., Wysocki J., Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? *Clin. Sci. (Lond)*. 2020;134:543-545. doi:10.1042/CS20200163
6. Kaschina E., Namsolleck P., Unger T. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Res.* 2017;125(Pt A):39-47. doi:10.1016/j.phrs.2017.07.008.
7. Fang L., Karakiulakis G., Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for Covid-19 infection? *Lancet Respir. Med.* 2020;8(4):20-21. doi:10.1016/S2213-2600(20)30116-8.
8. Arendse L. B., Danser A. H., Poglitsch M., Touyz R. M., Burnett J. C. Jr., Llorens-Cortes C., Ehlers M. R., Sturrock E. D. Novel Therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure. *Pharmacol. Rev.* 2019;71(4):539-570. doi:10.1124/pr.118.017129.
9. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T. S., Herrler G., Wu N. H., Nitsche A., Müller M. A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. 2020;271-280. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
10. Danser A.H.J., Epstein M., Batlle D. Renin-angiotensin system blockers and the COVID-19 Pandemic: At present there is no evidence to abandon renin-angiotensin system blockers. *Hypertension*. 2020;1382-1385. doi:10.1161/Hypertensionaha.120.15082.
11. Heurich A., Hofmann-Winkler H., Gierer S., Liepold T., Jahn O., Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by

## REFERENCES

1. Shpakov A.O. Angiotensin-Converting Enzyme of the Type 2 as a Molecular Mediator for



the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* 2014;88(2):1293-307. doi:10.1128/JVI.02202-13.

12. Mukerjee S., Gao H., Xu J., Sato R., Zsombok A., Lazartigues E. ACE2 and ADAM17 Interaction Regulates the Activity of Presympathetic Neurons. *Hypertension.* 2019;74(5):1181–1191. doi:10.1161/hypertensionaha.119.13133

13. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

14. Saavedra J. M., Armando I. Angiotensin II AT2 receptors contribute to regulate the sympathoadrenal and hormonal reaction to stress stimuli. *Cell Mol. Neurobiol.* 2018;38(1):85-108. doi:10.1007/s10571-017-0533-x.

15. South A. M., Diz D., Chappell M. C. COVID-19, ACE2 and the Cardiovascular Consequences. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2020;1084-1090. doi:10.1152/ajpheart.00217.2020.

16. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020;215-220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5.

17. Chen W. H., Strych U., Hotez P. J., Bottazzi M. E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2020;3:1-4. doi:10.1007/s40475-020-00201-6.

18. Yushun W., Jian S., Rachel G., Ralph S., Fang L. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *American Society for Microbiology. American Society for Microbiology. Journal of Virology.* 2020;127-200. doi:10.1128 / JVI.00127-20.

19. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R. S., Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS. *J. Virol.* 2020;127-120. doi:10.1128/JVI.00127-20.

20. Mira B., Thangavel A., Mohamed A., Muath A., Jehad A., Fahd A. *Molecular Therapy. Methods and Clinical Development.* 2020;321-327. doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.017

21. Zhou P., Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H. R., Zhu Y., Li B., Huang C. L., Chen H. D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang

R. D., Liu M. Q., Chen Y., Shen X. R., Wang X., Zheng X. S., Zhao K., Chen Q. J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F. X., Wang Y. Y., Xiao G. F., Shi Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7.

22. Varagic J., Ahmad S., Nagata S., Ferrario C. M. ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1–7) balance in cardiac and renal injury. *Curr. Hypertens. Rep.* 2014;16(3):420. doi:10.1007/s11906-014-0420-5.

23. Turu G., Balla A., Hunyady L. The Role of  $\beta$ -arrestin proteins in organization of signaling and regulation of the AT1 angiotensin receptor. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2019;10:519. doi:10.3389/fendo.2019.00519

24. Wu C., Lu H., Cassis L. A., Daugherty A. Molecular and pathophysiological features of angiotensinogen: a mini review. *N. Am. J. Med. Sci. (Boston).* 2011;4:183-190. doi:10.7156/v4i4p183.

25. Patel S., Hussain T. Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018;20(5):41. doi:10.1007/s11906-018-0845-3

26. Patel V. B., Zhong J. C., Grant M. B., Oudit G. Y. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circ. Res.* 2016;118(8):1313-1326. doi:10.1161/Circresaha.116.307708.

27. Zhang H., Han G. W., Batyuk A., Ishchenko A., White K. L., Patel N., Sadybekov A., Zamlyny B., Rudd M. T., Hollenstein K., Tolstikova A., White T. A., Hunter M. S., Weierstall U., Liu W., Babaoglu K., Moore E. L., Katz R. D., Shipman J. M., Garcia-Calvo M., Sharma S., Sheth P., Soisson S. M., Stevens R. C., Katritch V., Cherezov V. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature.* 2017;544(7650):327–332. doi:10.1038/nature22035.

28. Lu H., Cassis L. A., Kooi C. W., Daugherty A. Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertens. Res.* 2020;39(7): 492–500. doi:10.1038/hr.2016.17.

29. Zunke F., Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2017;2059–2070. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.001.

30. Xu J., Sriramula S., Xia H., Moreno-Walton L., Culicchia F., Domenig O., Poglitsch M., Lazartigues E. Clinical relevance and role of neuronal AT1 receptors in ADAM17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension. *Circ. Res.* 2017;121: 43-55. doi:10.1161/Circresaha.116.310509.

## РОЛЬ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ФАКТОРА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Каде А. Х.<sup>1</sup>, Занин С. А.<sup>1</sup>, Сидоренко А. Н.<sup>1</sup>, Цымбалов О. В.<sup>1</sup>, Муратова А. Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ), 350063, ул. Митрофана Седина, 4, Краснодар, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 355017, ул. Мира, 310, Ставрополь, Россия

**Для корреспонденции:** Каде Азамат Халидович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, e-mail: akh\_kade@mail.ru

**For correspondence:** Kade Azamat Kh., MD, Department of General and Clinical Pathologic Physiology, Kuban state medical university, e-mail: akh\_kade@mail.ru

### Information about authors:

**Kade A. Kh.**, <https://orcid.org/0000-0002-0694-9984>

**Zanin S. A.**, <https://orcid.org/0000-0002-5667-0623>

**Sidorenko A. N.**, <https://orcid.org/0000-0002-5102-5641>

**Tsymbalov O. V.**, <https://orcid.org/0000-0002-6203-9272>

**Muratova A. Yu.**, <https://orcid.org/0000-0001-7213-679 X>

### РЕЗЮМЕ

Гипоксия-индуцибельные факторы (hypoxia inducible factor, HIF) являются важнейшими внутриклеточными регуляторами транскрипции. При нормоксии данные белки подвергаются посттрансляционным модификациям (гидроксилированию), которые препятствуют взаимодействию с коактиваторами (CBP/p300) и способствуют разрушению HIF. Две основные системы, которые гидроксилируют HIF это пролилгидроксилазы и фактор, ингибирующий HIF-1 (Factor-inhibiting HIF-1, FIH-1). При гипоксии данные ингибирующие механизмы прекращают работу. Это приводит к димеризации HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  с конститутивно синтезируемым кислород-независимым HIF-1 $\beta$ . Основным вектором работы HIF является адаптация к гипоксии. Для выполнения этой задачи увеличивается кислородная емкость крови (HIF стимулирует синтез эритропоэтина, и его рецепторов, всасывание и транспорт железа), ангиогенез, анаэробная продукция АТФ, компенсация внутриклеточного ацидоза и т.д. Гиперфункция HIF лежит в основе канцерогенеза. Опухолевые клетки характеризуются усиленными ангиогенезом, пролиферацией, уклонением от апоптоза, иммунного надзора, атипичным метаболизмом (например, эффектом Варбурга). Эти процессы находятся под контролем HIF. Герминативные мутации генов HIF или других генов, участвующих в регуляции работы данного фактора транскрипции, приводят к болезни Гиппеля-Линдау, врожденным эритроцитозам и другим патологиям. Подавление HIF изучается в качестве перспективной противоопухолевой стратегии. Гипофункция вносит вклад в патогенез анемии при хронической болезни почек и сосудистой rareфикации при патологической гипертрофии миокарда. Стимуляция HIF, путем ингибирования пролилгидроксилаз, исследована в испытаниях 3 фазы и используется для лечения анемии при хронической болезни почек. Указанная терапия, по-видимому, сопоставима по профилю безопасности с лекарственными эритропоэтинами. Риск тромбозов при приеме ингибиторов пролилгидроксилаз несколько выше.

**Ключевые слова:** гипоксия-индуцибельные факторы, пролилгидроксилазы, белок фон Гиппеля-Линдау, канцерогенез, сосудистая rareфикация, ингибиторы пролилгидроксилаз

### ROLE OF HIF IN HEALTH AND DISEASE

**Kade A. Kh.<sup>1</sup>, Zanin S. A.<sup>1</sup>, Sidorenko A. N.<sup>1</sup>, Tsymbalov O. V.<sup>1</sup>, Muratova A. Yu.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Kuban state medical university, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup>Stavropol state medical university, Stavropol, Russia

### SUMMARY

Hypoxia inducible factors (HIFs) are important intracellular regulators of transcription. In normoxia, these proteins undergo posttranslational modifications (hydroxylation) that prevent interaction with coactivators (CBP/p300) and promote HIF degradation. The two main systems that hydroxylate HIF are prolylhydroxylases and factor-inhibiting HIF-1 (Factor-inhibiting HIF-1, FIH-1). Under hypoxia, these inhibitory mechanisms stop working. This leads to dimerization of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and HIF-3 $\alpha$  with constitutively synthesized oxygen-independent HIF-1 $\beta$ . The main vector of HIF operation is adaptation to hypoxia. To perform this task, oxygen capacity of the blood (HIF stimulates the synthesis of erythropoietin and its receptors, iron absorption and transport), angiogenesis, anaerobic ATP production, compensation of intracellular acidosis, etc.). Hyperfunction of HIF underlies carcinogenesis. Tumor cells are characterized by enhanced angiogenesis, proliferation, evasion of apoptosis, immune surveillance, and atypical metabolism (e.g., the Warburg effect). These processes are under the control of HIF. Herminative mutations of HIF genes or other genes involved in the regulation of this transcription factor lead to von Hippel-Lindau disease, congenital erythrocytosis, and

other pathologies. Suppression of HIF is being studied as a promising anti-tumor strategy. Hypofunction of HIF contributes to the pathogenesis of anemia in chronic kidney disease and vascular rarity in pathological myocardial hypertrophy. Stimulation of HIF, by inhibition of prolyl hydroxylases, has been investigated in phase 3 trials and is used to treat anemia in chronic kidney disease. This therapy appears to be comparable in safety profile to the drug erythropoietins. The risk of thrombosis is slightly higher with prolylhydroxylase inhibitors.

**Key words:** hypoxia-inducible factors, prolyl hydroxylases, von Hippel-Lindau protein, carcinogenesis, vascular rarefaction, prolyl hydroxylase inhibitors.

Реакция разных систем организма: сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, нервной, системы крови, - на любую гипоксию, как в антенатальном, так и в постнатальном периодах фундирована на молекулярном уровне работой факторов транскрипции HIF (hypoxia inducible factor) [1]. Изучение роли HIF и систем, контролирующих его функцию (специфических внутриклеточных детекторов уровня кислорода), удостоилось нобелевской премии в области физиологии и медицины в 2019 году (У. Кейлин, Г. Семенца, П. Ратклифф). Данные механизмы консервативны (обнаруживаются у большинства многоклеточных, кроме гребневи́ков (Stenophora) и губок (Porifera)) и довольно однотипны в разных клетках организма [2]. Уникальный же ответ разных клеток на гипоксию связан с разным «набором» активных генов, экспрессия которых регулируется HIF, а также с тканеспецифическими особенностями посттранскрипционных, посттрансляционных процессов и взаимодействиями между HIF и другими регуляторами транскрипции.

При нормоксии (21% O<sub>2</sub>) белки HIF- $\alpha$  (их домены кислород-зависимой деградации (oxygen-dependent degradation domain, ODDD) на карбоксильном конце) подвергаются двум основным посттрансляционным модификациям:

1. гидроксигидроксилированию остатков пролина (в 402 и 564 положениях HIF-1 $\alpha$ , здесь и далее имеются в виду человеческие HIF) и
2. гидроксигидроксилированию остатков аспарагина (в 803 положении HIF-1 $\alpha$ ) [2; 3].

Первую реакцию катализируют пролилгидроксилазы (ПГ) 1, 2 и 3 (относятся к суперсемейству негемовых Fe(II)- и 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ), которые используют кислород (доступный им в состоянии нормоксии) и альфа-кетоглутарат в качестве субстратов [3]. Пролілгидроксилаза 2 играет ведущую роль в инактивации HIF-1 $\alpha$ , в то время как ПГ1 и ПГ3 регулируют работу HIF-2 $\alpha$  [2; 3].

Гидроксигидроксилированные остатки пролилов соединяются с белком фон Гиппеля-Линдау, который привлекает VCCRE2 комплекс и E2-убиквитинлигазу, чем способствует убиквитинации и протеосомальной деградации HIF-1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  и 3 $\alpha$  [2; 3].

Вторая модификация – гидроксигидроксилирование аспарагина – производится фактором, ингиби-

рующим HIF-1 (Factor-inhibiting HIF-1, FIH-1). Этот механизм имеет 4 ключевых отличия от предыдущего:

1. работает не только в условиях нормоксии, но и при легкой гипоксии (уровень 1-13% называется также физиоксией или физоксией), являясь как бы «вторым эшелон» инактивации HIF,
2. нарушает функцию HIF (точнее, взаимодействие с транскрипционными коактиваторами CBP/p300), а не запускает его разрушение,
3. воздействует преимущественно на HIF-1 $\alpha$ , в меньшей степени на HIF-2 $\alpha$ ,
4. полное «выключение» FIH-1 у лабораторных животных не приводит к выраженной дисфункции HIF (то же верно в отношении ПГ1 и ПГ3, но не ПГ2, без которой развиваются тяжелые дефекты плаценты и сердца) [2; 3; 4].

Описаны и другие посттрансляционные модификации HIF: ацетилирование лизина в 532 положении (усиливает протеосомальную деградацию) ацетилтрансферазой ARD-1 (arrest defective-1), S-нитрозилирование цистеина в 800 положении (усиливает взаимодействие с транскрипционными коактиваторами), фосфорилирование (разное влияние), сумоилирование лизинов-391, - 477 и - 532 (подавляющий эффект), деацетилирование сиртуином 1 (усиление активности). HIF является негистоновой мишенью метилтрансфераз G9a, GLP, SET7/9 которые посредством метилирования лизинов подавляют его функцию, напротив, деметилирование лизинов ферментом LSD1 (lysine-specific demethylase) оказывает стимулирующее влияние [5; 6]. Белки теплового шока (HSP90) стабилизируют HIF. Активность фактора транскрипции регулируется при помощи РНК-интерференции, например, микро-РНК-429 оказывает подавляющее влияние по принципу отрицательной обратной связи [7]. Транскрипт генов HIF при нормоксии также нестабилен. Синтез HIF стимулируется многими митогенными факторами (инсулином, тромбоцитарным фактором роста (PDGF), инсулиноподобным фактором роста (IGF)) через каскады митоген-активируемых протеинкиназ, например, ERK (также усиливает взаимодействие HIF и транскрипционными коактиваторами) и путь трансдукции фосфатидил-

инозитол-3-киназы, протеинкиназы В и mTOR (mammalian target of rapamycin). Эти механизмы усиления транскрипции и стабилизации HIF обеспечивают его функционирование при уровне  $O_2 > 5\%$ , хотя и менее интенсивное, чем при выраженной гипоксии [5; 8].

В условиях гипоксии (0,1-1%  $O_2$ ) кислород-зависимые механизмы лишаются своего субстрата, и HIF приступает к работе. HIF-1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  и 3 $\alpha$  димеризуются с конститутивно синтезируемым кислород-независимым HIF-1 $\beta$ , привлекают коактиваторы (CREB-binding protein (CBP)/p300) и взаимодействуют с гипоксия-респонсивным элементом (hypoxia response element, HRE), содержащим последовательность 5'-(A/G)CGTG-3' [2]. Этим прямым способом, а также несколькими непрямыми путями контролируется экспрессия тысяч генов. Усиление транскрипции происходит преимущественно прямым способом, напротив, многие гены, активность которых при гипоксии подавляется, связаны с HIF косвенно: через другие регуляторы экспрессии, эпигенетические механизмы, РНК-интерференцию и т.д. [2; 3]. Некоторые из мишеней являются общими для разных HIF, другие – нет. Например, гены эритропоэтина (ЭПО), сосудисто-эндотелиального фактора роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF), глюкозного транспортера GLUT1, EGLN3, регулируются HIF-1 и HIF-2, а BNIP3, CAR9, LDHA и PGK1 – только HIF-1 [2; 3; 9]. С этим связана определенная функциональная асимметрия: первый фактор преимущественно воздействует на гликолиз и апоптоз, второй — стимулирует клеточный рост, миграцию, ангиогенез [9]. Другие важные отличия HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$  это:

1. тканеспецифическая экспрессия HIF-2 $\alpha$  (почки, печень, легкие, эндотелий),
2. активация первого фактора преобладает на ранних этапах гипоксии (до 24 часов) и при остром глубоком дефиците кислорода (<0,1%), второй фактор работает при хронической гипоксии (48 часов и более).

Переключение (HIF switch) между двумя этими видами ответа является одним из ключевых событий в ряду изменений при гипоксии и потенциальной точкой приложения терапии [9].

Работа HIF направлена на адаптацию клетки и организма к гипоксии. Белки, контролируемые HIF, участвуют в:

1. метаболизме углеводов и анаэробном производстве энергии (глюкозные транспортёры, ферменты гликолиза),
2. компенсации внутриклеточного ацидоза (карбоангидразы IX, монокарбоксилатные транспортёры),

3. усилении ангиогенеза (сосудисто-эндотелиальный фактор роста),
4. стимуляции синтеза эритропоэтина и его эффектов (эритропоэтиновые рецепторы),
5. метаболизме железа (двухвалентный металлотранспортер, ферропортин, трансферрин),
6. торможении апоптоза (при уровне кислорода 1-3%),
7. стимуляции апоптоза (при уровне кислорода менее 0,5%),
8. воспалении [1; 2; 3; 10; 11; 12].

Влияние HIF на воспаление сложно. Некоторые мишени фактора транскрипции усиливают воспаление. Среди них неспецифические рецепторы (TLR4), цитокины, ферменты (циклооксигеназа 2, индуцибельная NO-синтаза). Другие мишени HIF имеют противовоспалительное действие - аденозиновые рецепторы и ферменты, участвующие в синтезе аденозина [2].

Как можно заметить, изменение профиля экспрессии под действием HIF в целом подчиняется общему правилу: процессы, способствующие адаптации к гипоксии, становятся более интенсивными. Это имеет обратную негативную сторону. Гипоксия является неперенным спутником воспаления и канцерогенеза (которые также тесно связаны). Свойствами злокачественного фенотипа являются (среди прочих) усиленные пролиферация и ангиогенез, метаболические нарушения (активизация гликолиза, эффект Варбурга, уклонение от аутофагии, компенсация закисления), утрата межклеточных контактов (HIF непрямым способом подавляет синтез E-кадгерина), эпителиально-мезенхимальный переход, перитуморозное воспаление, дисфункция иммунной системы, мультилекарственная резистентность (P-гликопротеин также мишень HIF) [2; 5]. Все это способствует гиперактивации HIF, характерная для атипичных клеток. Неудивительно, что HIF и связанные с ним молекулы рассматриваются как перспективные мишени противоопухолевой терапии. Именно в этом контексте негативные последствия гиперактивации HIF изучены наиболее хорошо.

Некоторые патологии, связанные с дисфункцией HIF:

- вторичный приобретенный эритроцитоз в ответ на гипоксию (например, синдром обструктивного апноэ сна, ХОБЛ, Пиквикский синдром, стеноз почечной артерии, курение),
- не менее 4 врожденных эритроцитозов (герминативные мутации EPOR, EGLN1, EPAS1, в том числе чувашская полицитемия, мутация VHL),

- сосудистые пороки развития (например, артериовенозные мальформации),
- сосудистая rareфикация при патологической гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности,
- воспаление,
- ишемия (например, ишемическая болезнь сердца),
- легочная гипертензия,
- феохромоцитома/параганглиома (герминативные и соматические мутации VHL, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, EGLN1, FH, MDH2, EPAS1),
- синдром Пакака-Чжуанга (феохромоцитомы/параганглиомы, соматостатинома, полицистемия),
- болезнь Гиппеля-Линдау (герминативные мутации VHL, гемангиомы сетчатки, гемангиобластомы мозга, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, феохромоцитома, нейроэндокринные опухоли, кисты почек, поджелудочной железы и другие признаки),
- спорадический светлоклеточный почечно-клеточный рак (инактивация белка фон Гиппеля-Линдау в 70% случаев), прочие опухоли [2; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19].

Фармакологическое воздействие на систему HIF может быть как блокирующим, так и стимулирующим. Первое, как сказано выше, может стать эффективной противоопухолевой стратегией. Многочисленные исследования посвящены плейотропным HIF-подавляющим эффектам уже применяемых по другим показаниям лекарств (амфотерицин В, дигоксин, метформин, индометацин, ибупрофен, ингибиторы протеасом, PI3K, mTOR, топоизомераза, HSP90, деацетилаз гистонов и др.) и испытаниям новых препаратов [2; 5].

Наиболее активно исследуемый способ стимулировать HIF – это использование пролилгидроксилазных ингибиторов (дапродустат, молидустат, роксадустат, вададустат и др.), которые изучаются у пациентов с ЭПО-дефицитной анемией при хронической болезни почек. По данным исследований 3 фазы, эти препараты увеличивают концентрацию гемоглобина и улучшают утилизацию железа тканями, что отражается в понижении уровня гепцидина, сывороточного железа, ферритина, повышении общей железосвязывающей способности сыворотки, уровня трансферрина. Риск серьезных побочных эффектов сопоставим с таковым у лекарственных эритропоэтинов. Риск тромботических осложнений при приеме ингибиторов пролилгидроксилазы выше, чем у эритропоэтинов [19; 20; 21; 22]. На ранних стадиях находятся разработки лекарств, которые, возможно, будут применяться

при критической ишемии конечностей и воспалительных заболеваниях кишечника [2].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гипоксия-индуцибельные факторы и связанная с ними внутриклеточная кислород-чувствительная система являются ключевыми регуляторами клеточных функций. Нарушения работы HIF лежат в основе важнейших типовых патологических процессов - гипоксии, воспаления, канцерогенеза. Это открывает перспективные возможности воздействия на кислород-чувствительную систему клетки. Данное воздействие может быть как ингибирующим, так и стимулирующим. Торможение HIF может стать эффективной антиопухолевой стратегией лечения. Ингибирование пролилгидроксилазы показало определенные положительные результаты у пациентов с хронической болезнью почек и анемией.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Samanta D., Prabhakar N. R., Semenza G. L. Systems biology of oxygen homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2017;9(4):e1382. doi:10.1002/wsbm.1382.
2. Semenza G. L. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2019;59:379-403. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637.
3. Bishop T., Ratcliffe P. J. HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. *Circulation research*. 2015;117(1):65-79. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305109.
4. Bartoszewska S., Janaszak-Jasiecka A., Ochocka R. J., Collawn J. F., Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis*. 2018;21(2):183-202. doi:10.1007/s10456-018-9600-2.
5. Soni S., Padwad Y. S. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncologica*. 2017;56(4):503-515. doi: 10.1080/0284186X.2017.1301680.
6. Nam H. J., Baek S. H. Epigenetic regulation of the hypoxic response. *Current Opinion in Physiology*. 2019;7:1-8. doi:10.1016/j.cophys.2018.11.007.
7. Bartoszewska S., Kochan K., Piotrowski A., Kamysz W., Ochocka R. J., Collawn J. F., Bartoszewski R. The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression

- in human endothelial cells through a negative feedback loop. *The FASEB Journal*. 2015;29:1467–1479. doi: 10.1096/fj.14-267054.
8. Carrera S., Senra J., Acosta M. I., Althubiti M., Hammond E. M., de Verdier P. J., Macip S. The role of the HIF-1 $\alpha$  transcription factor in increased cell division at physiological oxygen tensions. *PloS one*. 2014;9(5):e97938. doi: 10.1371/journal.pone.0097938.
  9. Serocki M., Bartoszezewska S., Janaszak-Jasiecka A., Ochocka R. J., Collawn J. F., Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis*. 2018;21(2):183-202. doi: 10.1007/s10456-018-9600-2.
  10. Obacz J., Pastorekova S., Vojtesek B., Hrstka R. Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Molecular cancer*. 2013;12(1):93. doi:10.1186/1476-4598-12-93.
  11. Palazon A., Goldrath A. W., Nizet V., Johnson R. S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014;41(4):518-528. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008.
  12. Lee J. W., Ko J., Ju C., Eltzschig H. K. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(6):1-13. doi: 10.1038/s12276-019-0235-1.
  13. Vaidya A., Flores S. K., Cheng Z. M., Nicolas M., Deng Y., Opatowsky A. R., Lourenço D. M. Jr., Barletta J. A., Rana H. Q., Pereira M. A., Toledo R. A., Dahia P. L. M. EPAS1 mutations and paragangliomas in cyanotic congenital heart disease. *The New England journal of medicine*. 2018;378(13):259. doi:10.1056/NEJMc1716652.
  14. Abdallah A., Pappo A., Reiss U., Shulkin B. L., Zhuang Z., Pacak K., Bahrami A. Clinical manifestations of Pacak Zhuang syndrome in a male pediatric patient. *Pediatric blood & cancer*. 2020;67(4):e28096. doi:10.1002/pbc.28096.
  15. Wang P., Guan D., Zhang X. P., Liu F., Wang W. Modeling the regulation of p53 activation by HIF 1 upon hypoxia. *FEBS letters*. 2019;593(18):2596-2611. doi: 10.1002/1873-3468.13525.
  16. Sermeus A., Michiels C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell death & disease*. 2011;2(5):e164-e164. doi:10.1038/cddis.2011.48.
  17. Nakamura M., Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*. 2018;15(7):387-407. doi:10.1038/s41569-018-0007-y.
  18. Oldfield C. J. Duhamel T. A., Dhalla N. S. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020;98(2):74-84. doi:10.1139/cjpp-2019-0566.
  19. Кононенко В.И., Кит О.И., Комарова Е.Ф., Максимов А.Ю., Позднякова В.В., Новикова И.А., Демидова А.А. Оценка экспрессии факторов транскрипции, неоангиогенеза и апоптоза при послеоперационных осложнениях у больных с различным течением рака слизистой оболочки полости рта. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2017;1(1):64-68. doi:10.25207/1608-6228-2017-1-64-68.
  20. Chen H., Cheng Q., Wang J., Zhao X., Zhu S. Long-term efficacy and safety of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors in anaemia of chronic kidney disease: A meta-analysis including 13,146 patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2021. doi:10.1111/jcpt.13385.
  21. Wen T., Zhang X., Wang Z., Zhou R. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors in Patients with Renal Anemia: A Meta-Analysis of Randomized Trials. *Nephron*. 2020;144(11):572-582. doi:10.1159/000508812.
  22. Wang B., Yin Q., Han Y. C., Wu M., Li Z. L., Tu Y., Zhou L. T., Wei Q., Liu H., Tang R. N., Cao J. Y., Lv L. L., Liu B. C. Effect of hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors on anemia in patients with CKD: a meta-analysis of randomized controlled trials including 2804 patients. *Renal Failure*. 2020;42(1):912-925. doi: 10.1080/0886022X.2020.181112.

## REFERENCES

1. Samanta D., Prabhakar N. R., Semenza G. L. Systems biology of oxygen homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2017;9(4):e1382. doi:10.1002/wsbm.1382.
2. Semenza G. L. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2019;59:379-403. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637.
3. Bishop T., Ratcliffe P. J. HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. *Circulation research*. 2015;117(1):65-79. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305109.
4. Bartoszezewska S., Janaszak-Jasiecka A., Ochocka R. J., Collawn J. F., Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis*. 2018;21(2):183-202. doi:10.1007/s10456-018-9600-2.
5. Soni S., Padwad Y. S. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncologica*. 2017;56(4):503-515. doi: 10.1080/0284186X.2017.1301680.

6. Nam H. J., Baek S. H. Epigenetic regulation of the hypoxic response. *Current Opinion in Physiology*. 2019;7:1-8. doi:10.1016/j.cophys.2018.11.007.
7. Bartoszevska S., Kochan K., Piotrowski A., Kamysz W., Ochocka R. J., Collawn J. F., Bartoszewski R. The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *The FASEB Journal*. 2015;29:1467–1479. doi:10.1096/fj.14-267054.
8. Carrera S., Senra J., Acosta M. I., Althubiti M., Hammond E. M., de Verdier P. J., Macip S. The role of the HIF-1 $\alpha$  transcription factor in increased cell division at physiological oxygen tensions. *PloS one*. 2014;9(5):e97938. doi: 10.1371/journal.pone.0097938.
9. Serocki M., Bartoszevska S., Janaszak-Jasiecka A., Ochocka R. J., Collawn J. F., Bartoszewski R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis*. 2018;21(2):183-202. doi:10.1007/s10456-018-9600-2.
10. Obacz J., Pastorekova S., Vojtesek B., Hrstka R. Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Molecular cancer*. 2013;12(1):93. doi:10.1186/1476-4598-12-93.
11. Palazon A., Goldrath A. W., Nizet V., Johnson R. S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014;41(4):518-528. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008.
12. Lee J. W., Ko J., Ju C., Eltzschig H. K. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(6):1-13. doi: 10.1038/s12276-019-0235-1.
13. Vaidya A., Flores S. K., Cheng Z. M., Nicolas M., Deng Y., Opatowsky A. R., Lourenço D. M. Jr., Barletta J. A., Rana H. Q., Pereira M. A., Toledo R. A., Dahia P. L. M. EPAS1 mutations and paragangliomas in cyanotic congenital heart disease. *The New England journal of medicine*. 2018;378(13):259. doi:10.1056/NEJMc1716652.
14. Abdallah A., Pappo A., Reiss U., Shulkin B. L., Zhuang Z., Pacak K., Bahrami A. Clinical manifestations of Pacak Zhuang syndrome in a male pediatric patient. *Pediatric blood & cancer*. 2020;67(4):e28096. doi:10.1002/pbc.28096.
15. Wang P., Guan D., Zhang X. P., Liu F., Wang W. (2019). Modeling the regulation of p53 activation by HIF 1 upon hypoxia. *FEBS letters*. 2019;593(18):2596-2611. doi:10.1002/1873-3468.13525.
16. Sermeus A., Michiels C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell death & disease*. 2011;2(5):e164-e164. doi:10.1038/cddis.2011.48.
17. Nakamura M., Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*. 2018;15(7):387-407. doi:10.1038/s41569-018-0007-y.
18. Oldfield C. J. Duhamel T. A., Dhalla N. S. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020;98(2):74-84. doi:10.1139/cjpp-2019-0566.
19. Kononenko V.I., Kit O.I., Komarova E.F., Maksimov A.Yu., Pozdnyakova V.V., Novikova I.A., Demidova A.A. Evaluation of the expression of transcription, neoangiogenesis and apoptosis factors in case of postoperative complications in patients with different progression of oral mucosa cancer. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2017;1(1):64-68. (In Russ.). doi: 10.25207/1608-6228-2017-1-64-68.
20. Chen H., Cheng Q., Wang J., Zhao X., Zhu S. Long-term efficacy and safety of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors in anaemia of chronic kidney disease: A meta-analysis including 13,146 patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2021. doi:10.1111/jcpt.13385.
21. Wen T., Zhang X., Wang Z., Zhou R. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors in Patients with Renal Anemia: A Meta-Analysis of Randomized Trials. *Nephron*. 2020;144(11):572-582. doi:10.1159/000508812.
22. Wang B., Yin Q., Han Y. C., Wu M., Li Z. L., Tu Y., Zhou L. T., Wei Q., Liu H., Tang R. N., Cao J. Y., Lv L. L., Liu B. C. Effect of hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors on anemia in patients with CKD: a meta-analysis of randomized controlled trials including 2804 patients. *Renal Failure*. 2020;42(1):912-925. doi: 10.1080/0886022X.2020.181112.

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2

Хайтович А. Б., Ткач В. В., Ткач А. В.

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

**Для корреспонденции:** Хайтович Александр Борисович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: khaitovych@rambler.ru

**For correspondence:** Khaitovich Alexander Borisovich, MD, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: khaitovych@rambler.ru

### Information about authors:

**Khaitovich A. B.**, <http://orcid.org/0000-0001-9126-1182>

**Tkach V. V.**, <http://orcid.org/0000-0002-3455-8809>

**Tkach A.V.**, <http://orcid.org/0000-0002-9234-3021>

### РЕЗЮМЕ

В статье представлен обзор современных методов лабораторной диагностики заболеваний, вызванных вирусом SARS-COV-2. Представлена сравнительная характеристика методов, применяемых для выявления вирусов SARS-COV-2 и специфических антител. Описаны показания для их использования, преимущества, недостатки, эффективность в зависимости от поставленных медицинских и эпидемиологических задач. Указаны варианты интерпретации полученных результатов лабораторных исследований с учетом временных изменений относительно начала проявления симптомов заболевания.

**Ключевые слова:** SARS-COV-2, COVID-19, методы амплификации, ОТ-ПЦР RT-LAMP, серологические методы, ИФА, ИХА, метод CRISPR

### SPECIFIC LABORATORY METHODS IN DIAGNOSTICS OF INFECTION CAUSED BY THE SARS-COV-2 VIRUS

Khaitovich A. B., Tkach V. V, Tkach A.V.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

### SUMMARY

The article provides an overview of modern methods of laboratory diagnosis of diseases caused by the SARS-COV-2 virus. A comparative description of the methods used to detect SARS-COV-2 viruses and specific antibodies is presented. The indications for their use, advantages, disadvantages, efficacy, depending on the medical and epidemiological tasks, are described. The options for the interpretation of the results of laboratory studies, taking into account the time changes relative to the onset of the manifestation of the symptoms of the disease, are indicated.

**Key words:** SARS-COV-2, COVID-19, amplification methods, RT-LAMP, RT-PCR, serological methods, ELISA, IHA, CRISPR method

В настоящее время одна из мировых проблем - новая коронавирусная инфекция COVID-19, распространение которой приняла масштабы пандемии и продолжается больше года. Из-за отсутствия этиотропных методов лечения COVID-19 и в начальной стадии пандемии вакцин, самыми действенными мерами для снижения распространения SARS-CoV-2 были раннее выявление и изоляция зараженных пациентов, что возможно только при эффективной и своевременной диагностике COVID-19. Несмотря на появления вакцин в настоящее время и до периода появления коллективного иммунитета в различных регионах, одной из актуальных задач в борьбе с пандемией является проведе-

ние специфической лабораторной диагностики SARS-CoV-2 как ключевого аспекта установления этиологии патологического процесса и бессимптомного носительства, контроля эпидемического распространения инфекции, проведения противоэпидемических мероприятий, разработки стратегий защиты жизни и здоровья населения.

Первые случаи пневмонии не установленной этиологии были обнаружены в декабре 2019 г. в г. Ухань, Китай [1]. 7 января 2020 г. китайским ученым удалось выявить ранее неизвестный коронавирус [2]. 11 февраля 2020 года исследовательская группа по коронавирусу Международного Комитета объявила официальное на-



звание нового вируса *SARS-CoV-2* (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) [3; 4; 5; 6]. Заболевание, вызываемое *SARS-CoV-2*, получило название COVID-19 (COrona VIRus Disease 2019, коронавирусное заболевание 2019) [7]. С середины января 2020 г. в базе данных ГенБанка были представлены последовательности генома Wuhan seafood market pneumonia virus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). Открытие возбудителя и его молекулярно-генетическая структура явились научной основой создания различных диагностических тест-систем, которые определили современную систему лабораторной диагностики вируса *SARS-CoV-2*, возбудителя нового заболевания известного в настоящее время как COVID-19.

За небольшой промежуток времени (несколько месяцев) в разных странах мира были решены и продолжают совершенствоваться в настоящее время теоретические и практические вопросы лабораторной диагностики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом *SARS-CoV-2*. Все специфические лабораторные исследования, применяемые на современном этапе для диагностики COVID-19, можно разделить на две большие группы: прямые – обнаружение возбудителя и непрямые – обнаружение иммунного ответа человека на контакт с возбудителем.

На настоящий момент лабораторная диагностика включает: вирусоскопический метод (изучение вируса в электронно-микроскопическом исследовании); вирусологический метод (индикация и идентификация вируса); молекулярно-генетический метод (группа методов, позволяющая обнаружить в исследуемом материале РНК вирусов, мутации генов); иммунохимические методы для обнаружения антигенов (выявление в секретах и другом материале белков вируса); серологический метод (определение антител в сыворотках крови). В разработке находится аллергологический метод (диагностика, проводимая для определения индивидуальной переносимости организмов химических веществ – аллергенов).

Материалом для лабораторных исследований являются: респираторный материал (мазок из носо- и ротоглотки, мокрота, эндотрахеальный аспират или бронхоальвеолярный лаваж), фекалии, моча, конъюнктивальные секреты - для методов амплификации нуклеиновых кислот (исследование осуществляют в 1-й, 3-й и 11-й дни); сыворотка крови – для серологических методов (на 1-й и 14-й день). Для выявления антигенов вируса чаще используют образцы материала из верхних дыхательных путей. Отмечено, что образцы из нижних дыхательных путей более информативны для исследования,

поскольку содержат более высокое количество нуклеиновых кислот вируса, что обусловлено преимущественным поражением при COVID-19 альвеолярных клеток II типа. Комбинированное тестирование, включающее образцы отделяемого из дыхательных путей, фекалий, крови и др. повышает чувствительность диагностики у пациентов с подозрением на новую коронавирусную инфекцию [8; 9]. Для забора материала необходимо использовать соответствующие средства индивидуальной защиты, вирусные зонд-тампоны (стерильный Дакрон или тампон из вискозы, но не из хлопка) и транспортную среду для вирусного материала, содержащую противогрибковые и антибиотические добавки [10].

**Вирусоскопический метод.** *SARS-CoV-2* относится к семейству Betacoronavirus и представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус. Под электронным микроскопом имеет круглую или эллиптическую, часто плеоморфную форму с шиповидными отростками длиной 9 - 12 нм, образующими вокруг вирусной частицы «корону». Диаметр вирусной частицы варьирует от 60 до 140 нм (рис.1) [11].

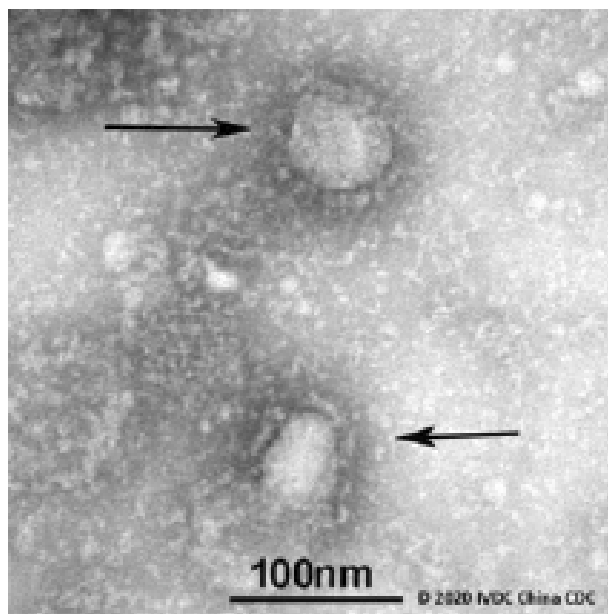


Рис. 1. Первое электронно-микроскопическое изображение коронавируса SARS-CoV 2, полученное учеными Китайского центра по контролю и профилактике заболеваний (Chinese Center for Disease Control and Prevention, CCDC) [11].

**Вирусологический метод.** Для выделения *SARS-CoV-2* использовались образцы секрета дыхательных путей от больных COVID-19, которые инокулировали в культуре клеток Vero E6 - линия перевиваемых клеток (клон Vero 76), применяющейся в качестве клеток-хозяев для

выращивания вируса. Цитопатические эффекты проявлялись через 3 суток (рис.2) [12; 13; 14] в виде образования везикул, окруженных двойной мембраной [15]. Эти везикулы, по-видимому, являются аутофагосомами, которые не сливаются с лизосомами [16]. Индукция апоптоза в *SARS-CoV-2* инфицированных клетках линии Vero E6 была подтверждена морфологическими и биохимическими анализами [17]. Известно, что в индукции апоптоза участвуют неструктурные белки *SARS-CoV-2*, обеспечивающие репликацию вируса [18, 19]. Структурные белки *SARS-CoV-2* N (nucleocapsid), E (envelope), M (membrane) и S (spike) также обладают способностью вызывать апоптоз *in vitro* [20]. Посев культуры вируса осуществляется в лаборатории с уровнем биобезопасности 3 (BSL-3), что соответствует 2 группе патогенности по российской классификации. Идентификация вируса проводится с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), полного секвенирования генома и электронной микроскопии.

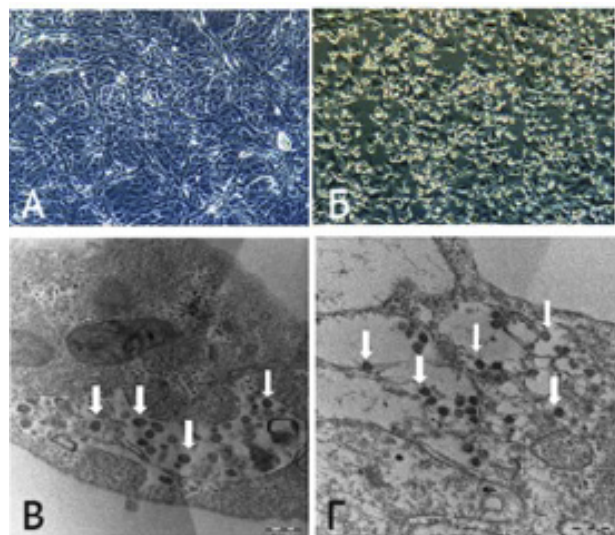


Рис. 2. Клетки Vero инфицированные SARS-CoV-2 под оптическим и электронным микроскопом [12].

Условные обозначения. А. Исходная культура клеток Vero. Б. Цитопатические эффекты клеток Vero, вызванные SARS-CoV-2 (3-и сутки после инокуляции) В и Г. Электронные микрофотографии тонких срезов клеток Vero, инфицированных SARS-CoV-2. Белые стрелки указывают на агрегаты внутриклеточных вирионов.

В настоящее время ВОЗ не рекомендует культивирование вируса в качестве рутинной диагностической процедуры, поскольку данный метод требует много времени и ресурсов. Кроме того, манипуляции с живыми вирусными культурами сопровождаются риском распростране-

ния и циркуляции вирусов внутри лабораторных учреждений. Однако выделение вирусов все же проводить необходимо для разработки некоторых тестов для диагностики *SARS-CoV-2*, приготовления цельновирионных убитых вакцин и некоторых других типов, проверки эффективности лекарственных препаратов и вакцин при появлении мутаций и т.д.

**Молекулярно-генетические методы** включают: полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и ее виды, петлевую изометрическую амплификацию в виде технологии LAMP-реакции, секвенирование, биологическое микрочипирование, технологию CRISPR.

**Полимеразная цепная реакция.** Для выявления РНК вируса *SARS-CoV-2* широко применяются методы амплификации, для проведения которых выпускаются как наборы, предназначенные для лабораторного использования, так и тест-системы, и устройства, позволяющие проводить диагностику инфицирования *SARS-CoV-2* вне лабораторий, на месте оказания помощи (Point-of-Care – POC).

«Золотым стандартом» диагностики COVID-19 является ОТ-ПЦР, который применяется для рутинного подтверждения случаев заболевания. Выявление РНК *SARS-CoV-2* этим методом включает три этапа: экстракцию РНК из образцов исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции и амплификацию участка кДНК данного коронавируса с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Для экстракции суммарной РНК вируса предпочтительно использовать метод фильтрующей колонки и метод магнитных шариков. Метод «кипящего раствора» относительно низок по эффективности выделения нуклеиновой кислоты, что может привести к неправильному обнаружению, поэтому его не рекомендуется использовать.

Реакция обратной транскрипции проводится с целью образования комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК. Затем с полученными пробами кДНК проводится реакция амплификации участков при помощи специфичных к этим участкам кДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых мишеней кДНК, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала [21; 22; 23; 24].

В качестве целевых мишеней рекомендуется использовать несколько генов: нуклеокапсида (N), мелкой мембраны (E), «протеиновых шипов» (S) и специфической РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP). Поскольку происходят новые мутации в геноме вируса *SARS-CoV-2*, для

повышения надежности диагностики в качестве мишеней используют комбинацию 2-3 специфических генов. В разных странах мира для детекции РНК-вируса используются разные гены вирусных, которые кодируют разные белки (таблица 1). [9; 25 - 27].

Таблица 1

**Определение генов-мишеней у *SARS-CoV-2* в тест-системах ПЦР, используемых в некоторых странах ведущими производителями**

Страна и организация	Рекомендуемые гены-мишени
Китай, China CDC	N (nucleocapsid phosphoprotein), ORF1ab
Германия, Charite	N, E (envelope protein), RdRP (ORF1ab)
Гонконг, Гонконгский университет (HKU)	N, ORF1b-nsp14
Япония, National Institute of Infectious Diseases	S (surface glycoprotein), ORF1a, ORF10
США US CDC, Atlanta	N (три варианта набора олигонуклеотидов для выявления последовательности гена N)
Франция, Париж, Институт Пастера,	Two targets in RdRP
Таиланд, Национальный Институт Здоровья	N
Россия, ООО НПФ «Литех»	RdRp, E
Россия, ООО «ДНК-Технология ТС»	N, E (1), E (2)
Россия, ООО «Компания Алкор Био»	ORF1ab, ORF8, N
Россия, Компания «ИнтерЛабСервис»	upE геном MERS-Cov и ген Pol SARS-Cov
Россия, Институт «Вектор»	ORF1a

В настоящее время известно в мире более тысячи тест-систем для ПЦР-диагностики, которые имеют разные гены мишени, только в Российской Федерации разные институты, фирмы производят около 400 тест-систем. По данным, которые приводятся в наставлениях, их чувствительность составляет от  $10^3$  до  $10^5$  копий на 1 мл. Праймеры зонда RdRp-SARSr (Charité) имеет несколько более низкую чувствительность [22]. Однако сравнительного и оценочного изучения различных тест-систем для ПЦР по генам-мишеням в исследуемом материале до настоящего времени вероятно не проводилось и отсутствуют результаты такого исследования в доступной научной литературе. Поэтому интерпретировать результаты ПЦР у пациентов, особенно при выполнении исследований в разных лабораториях в некоторых случаях достаточно сложно. Однако следует отметить, что принципиальных различий в использовании поиска специфических генов в разных странах нет.

В последние несколько месяцев предложен количественный тест ПЦР для обнаружения РНК вируса *SARS-CoV-2* в биоматериале, первый в России, который создали сотрудники научной группы разработки новых методов диагностики острых респираторных заболеваний

Центрального научно-исследовательского института (ЦНИИ) эпидемиологии Роспотребнадзора. Количественное содержание РНК *SARS-CoV-2* можно определять в любых биологических материалах человека: мазках из носоглотки, мокроте, фекалиях, плазме крови и других образцах. Этот анализ важен не только для выявления заразившихся и их своевременной изоляции, но и для больных с признаками поражения легких [28].

*Интерпретация ПЦР анализа.* У большинства пациентов с COVID-19 вирусная РНК в мазке из носоглотки, измеренная с помощью порогового цикла (количества циклов репликации, необходимых для получения флуоресцентного сигнала), обнаруживается за три дня до появления симптомов и достигает пика в течение первой недели их появления. Чем ниже значения порогового цикла, тем выше нагрузки вирусной РНК. Значение порогового цикла менее 40 клинически регистрируется как ПЦР положительный результат. Эта позитивность начинает снижаться к третьей неделе и впоследствии становится незаметной. Однако, значения порогового цикла, полученные у тяжелобольных госпитализированных пациентов, ниже, чем значения при легких случаях тече-

ния болезни. Положительная ПЦР-активность может сохраняться и после 3-х недель с начала заболевания, когда большинство легких случаев уже дают отрицательный результат. Однако «положительный» результат ПЦР отражает только обнаружение вирусной РНК и не обязательно указывает на наличие жизнеспособного вируса. Преимуществами ПЦР являются высокая чувствительность и специфичность, по сравнению с другими методами и технологиями, тем не менее у метода ПЦР есть и существенные недостатки, такие как дорогостоящее оборудование для амплификации, довольно сложные методы обнаружения и анализа результатов, дорогостоящие наборы реагентов.

Существенную проблему специфической диагностики COVID-19 составляют ложноположительные и ложноотрицательные результаты исследований, которые могут быть связаны как с объективными факторами (изменчивостью вируса, развитием инфекционного процесса, чувствительностью и специфичностью наборов и тест-систем), так и с субъективными факторами (ошибками при выполнении операционных процедур на преаналитических и аналитических этапах исследований, неправильным выбором методов исследований).

К появлению ложноотрицательных результатов приводит ряд факторов: низкое качество образцов; образец был взят слишком рано или слишком поздно в течение заболевания; при обращении с образцом или в ходе его транспортировки не были соблюдены необходимые требования; технические факторы, связанные с выполнением теста, например, мутация вируса или ингибирование ПЦР. Поскольку выделение РНК в хорошем качестве в потоковом режиме выделения представляет собой очень сложную задачу, существует вероятность того, что РНК из образца может быть повреждена, и ПЦР станет недостаточно эффективной. Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец нуклеиновой кислоты, по результатам анализа рисков отнесены следующие вещества: гемоглобин, присутствующий в образце РНК в результате неполного удаления в ходе выделения РНК из образца биоматериала, содержащего примесь крови, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце РНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки. Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, такие как слизь, кровь, элементы тканевого распада и воспаления, местные лекарственные препараты,

в том числе содержащиеся в назальных спреях и др. удаляются в ходе выделения нуклеиновой кислоты с использованием комплектов/наборов для пробоподготовки. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения нуклеиновых кислот, позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения нуклеиновых кислот [24].

Диапазон вирусной нагрузки *SARS-CoV-2* может варьировать в широких пределах от очень низких значений ( $10^4$  и менее копий/мл) в биоматериале от лиц с бессимптомным носительством и лиц на стадии выздоровления до крайне высоких значений (более  $10^9$  копий/мл) в биоматериале от пациентов с клинической картиной острой вирусной пневмонии. В связи с этим, при выполнении исследований в клинической лаборатории серьезную опасность представляет риск кросс-контаминации между образцами на всех этапах работы, особенно при аликвотировании и выделении РНК. Перекрестная контаминация высококопийным биоматериалом может приводить к появлению спорадических ложноположительных результатов.

Для повышения чувствительности ПЦР-тест система должна содержать в своем составе внутренний контрольный образец, который добавляется во все пробы для контроля правильности выделения РНК и реакции обратной транскрипции [29]. Отсутствие такого контроля может также потенциально приводить к некоторому количеству ложноотрицательных результатов.

Положительным считают результат при обнаружении относительного числа копий хотя бы одной специфической последовательности РНК *SARS-CoV-2* в образцах носоглотки или мокроты. Регулярное определение последовательности вируса в образцах из клинических материалов может быть полезным для мониторинга мутаций вирусного генома, способных повлиять на эффективность диагностических тестов, и указывает на наличие различных генотипов вируса в образцах верхних и нижних дыхательных путей пациента [30].

*Секвенирование.* Для пациентов с подозрением на COVID-19, в дополнение к традиционному ПЦР-анализу, используют стратегию макрогеномного обнаружения (mNGS), основанную на технологии секвенирования, с непосредственным извлечением нуклеиновых кислот всех микроорганизмов в зараженных образцах для высокопроизводительного секвенирования.

Путем сравнения специальной микробной базы данных с интеллектуальным алгоритмом анализа получают информацию о видах подозреваемых патогенных микроорганизмов и одновременно обнаруживают различные респираторные патогены, включая вирус *SARS-CoV-2*, обеспечивая более точную и всестороннюю картину заражения. Высокотехнологичное решение позволяет наблюдать за изменениями генома вируса и появлению новых мутаций и оперативно реагировать на них. Изменения генома вируса оказывают прямое влияние как на эффективность создаваемых вакцин и используемых методов диагностики и лечения, так и на его вирулентность и трансмиссивность [31]. Контролировать быстро меняющуюся ситуацию помогут мониторинг генетических изменений и своевременная передача данных в общую международную базу EpiCoV GISAID.

Технология секвенирования включает следующие этапы: экстракцию нуклеиновых кислот из образца биоматериала, секвенирование, биоинформационный анализ и получение результатов тестирования, их интерпретация.

Среди используемых протоколов секвенирования чаще всего в мире используется ARTIC Network, основанная на реагентах зарубежных производителей с длительными сроками поставки, что отражается на оперативности проведения исследований. Кроме того, глубина покрытия генома *SARS-CoV-2* оказывается неравномерной, что снижает качество данных о некоторых областях генома. В России был создан консорциум (CoRGI), который разработал тест-систему Parseq Lab, прошедшую апробацию в ФГБУ «НИИ гриппа им А.А. Смородинцева» Минздрава России и выявила ряд преимуществ: за счет использования большего количества более коротких ампликонов, по сравнению с протоколом ARTIC Network, добиться более равномерного покрытия генома *SARS-Cov-2*; проанализировать больше образцов в 2 раза; сократить временные затраты на анализ; стандартизировать анализ данных; создать набор в основном отечественных реагентов; разработать специальное программное обеспечение для обработки данных используя адаптированное программное обеспечение; позволить существенно облегчить обработку данных, подвести анализ под единые алгоритмы и стандарты. Все это является базой для широкого внедрения секвенирования нового поколения геномов *SARS-CoV-2* в различные научные и диагностические учреждения и лаборатории России [32].

*Изотермическая амплификация.* Альтернативный подход к амплификации специфического образца ДНК, который не требует изменения

температуры реакционной смеси, и поэтому называется изотермической амплификацией. Проведение изотермической амплификации требует намного меньше времени и не требует прибора -амплификатора, что делает методику особенно удобной для применения в нестационарных условиях и во время приема пациента. Преимущества методики: быстрый протокол, минимальное количество требуемого оборудования, надежное проведение реакции в присутствии ингибиторов полимерации, простая оптическая детекция прохождения реакции. Одним из нескольких существующих вариантов изотермической амплификации является LAMP-реакция – это метод специфической диагностики, который называется петлевая изотермальная амплификация RT-LAMP (reverse transcriptioncoupled – Loop-Mediated Isothermal Amplification) и позволяет проводить обратную транскрипцию и амплификацию в одной пробирке, без переноса жидкости. Сущность данного метода заключается в удвоении участка нуклеиновой кислоты с высокой специфичностью, эффективностью и скоростью в условиях постоянной температуры. Амплификацию проводят с помощью четырех - шести специально подобранных праймеров, что обеспечивает высокую специфичность реакции, так как они узнают 6 или 8 последовательностей-мишеней, что в 10 раз превышает чувствительность стандартной ПЦР [24].

Для LAMP-амплификации достаточно меньше 10 копий целевого участка в исходной реакционной смеси. И иногда из-за меньшей чувствительности к примесям и ингибиторам в качестве образца можно использовать даже грубые лизаты и биологические жидкости. Преимуществами метода петлевой изотермальной амплификации также являются: сокращение времени анализа образцов (более чем в 3 раза) за счет сокращения числа стадий предварительной подготовки. Конечные результаты анализа можно получить уже через 15 - 60 минут; простота - выполняется в один этап, легко визуализировать конечные продукты; экономическая эффективность - не требуется специальных дорогостоящих реагентов и оборудования [33]. Сравнительная характеристика методов амплификации приведена в таблице 2.

*Биологические микрочипы.* Еще одним способом обнаружения коронавируса является тест на основе микрочипов. Биологические микрочипы представляют собой совокупность ячеек, расположенных на поверхности стекла или пластика. На матрице-подложке биочипа расположено множество ячеек с гидрогелем (диаметр ячейки около 100 мкм, на одном квадратном сантиметре размещается до тысячи ячеек). В ячейках содержатся молекулы-зонды (фрагменты ДНК,

Таблица 2

## Сравнительная характеристика ПЦР и LAMP

Характеристика	ПЦР	LAMP
Предварительный этап денатурации нуклеиновой кислоты (НК)	Необходим	Не нужен
Температурный режим	Требует термоциклирования	Изотермический (обычно 65°C)
Специфичность	Средняя (2 праймера)	Высокая (4-6 праймеров)
Чувствительность к примесям	Высокая Как правило, требуется выделение НК	Более низкая Выделение НК требуется не всегда
Степень амплификации	10 <sup>9</sup> раз (30 циклов)	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup> раз
Время реакции	45 мин - > 3 ч	5 – 60 мин
Приборы	Дорогой амплификатор	Недорогой термоблок, термостат или водяная баня
РНК-матрица	Предварительный этап обратной транскрипции, дополнительный фермент обязателен	Обратная транскрипция при той же температуре, дополнительный фермент необязателен
Визуальные методы детекции	Нет	Есть

РНК, белки). Каждая ячейка является аналогом микропробирки, в которой происходит реакция между молекулами-зондами и молекулами исследуемой пробы [34].

Когда молекулы подходят друг к другу как ключ к замку, происходит гибридизация - соединение молекул с помощью химических связей. Ячейка, в которой произошла реакция, флуоресцирует, потому что пробу предварительно обрабатывают светящейся меткой. С помощью обратной транскриптазы РНК коронавируса продуцирует кДНК, меченную специфическими зондами. Затем эти меченные кДНК помещаются в лунки и гибридизуются с твердофазными олигонуклеотидами, закрепленными на микрочипе с последующей промывкой для удаления свободных ДНК. В результате РНК коронавируса может быть определена путем исследования специфических зондов [35].

**Технология CRISPR.** Перспективным направлением в диагностике COVID-19 являются тесты, основанные на методе CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), например, SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing - специфический высокочувствительный ферментативный репортер разблокировки). CRISPR – система представляет собой локусы бактерий, архей и вирусов, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными по своей структуре спейсерами. Тесты основаны на способности системы CRISPR узнавать специфические геномные участки и вырезать их с помощью нуклеаз - Cas-белков. Метод SHERLOCK основан на использовании

Cas13 для детекции РНК вируса в концентрации от 10 - 100 молекул РНК на микролитр [36]. Исследователи, работающие с этой технологией, считают, что в дальнейшем возможно применение платформы SHERLOCK вместо специфических ПЦР-анализов. Тест имеет высокую аналитическую специфичность и чувствительность и позволяет проводить количественное определение геномной РНК. Время от загрузки материала до получения результата 5 - 30 минут. Постановка метода в данном варианте требует очень высокой чистоты реагентов и окружающего пространства в связи с возможным перекрестным загрязнением гетерогенными нуклеазами, существенно искажающими результаты исследования. В данный момент этой технологией тестировались только образцы очищенной вирусной РНК, поэтому адаптировать метод для тестирования реальных клинических образцов ещё предстоит [37 - 39].

**Иммунохимические методы определения антигенов.** При возникновении ситуаций, в которых методы амплификации нуклеиновых кислот недоступны, либо их применение клинически нецелесообразно ввиду длительного времени выполнения, для диагностики инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, допускается использование иммунохимических экспресс-тестов, которые позволяют непосредственно выявлять в секрете дыхательных путей белки вируса, синтезирующиеся в ходе репликации. Большинство таких тест-систем основаны на называемой сэндвич-схеме иммуноанализа с применением латерального проточного метода. Устройство состоит из пластиковой тест-кассеты с лунками

для образца и буфера, полоски с мембраной на основе нитрата целлюлозы с нанесенной на ней тестовой линией (сорбированы специфические антитела против комплексов определяемого антигена с конъюгированными антителами), а также контрольной линией (сорбированы специфические антитела против конъюгированных антител). Благодаря удобству применения и короткому времени, которое необходимо для выполнения теста, такие экспресс-тесты могут способствовать переходу к децентрализованным схемам проведения тестирования пациентов, у которых возникают первые симптомы заболевания, за счет расширения масштабов тестирования и увеличения темпов диагностической работы. Однако, эти тесты имеют меньшую чувствительность по сравнению с методами амплификации нуклеиновых кислот. Согласно исследованиям, при использовании данных тестов для анализа образцов материала из верхних дыхательных путей наблюдался крайне большой разброс чувствительности в диапазоне 0 - 94% [40 - 49], тогда как специфичность оставалась стабильно высокой (более 97%). Наилучшая эффективность применения наблюдаются у пациентов с высокой вирусной нагрузкой (значение  $Ct \leq 25$  или  $>10^6$  копий вирусного генома/мл), как правило, находящихся на предсимптомной (1–3 дня до появления симптомов) или в начале манифестной (первые 5–7 дней болезни) стадии заболевания [50; 51]. Спустя 5–7 дней от момента появления симптомов заболевания имеется высокая вероятность снижения вирусной нагрузки у пациентов, и при обследовании с использованием иммунохимических экспресс-тестов возрастает вероятность получения ложноотрицательных результатов [10].

Для правильной интерпретации результатов диагностических экспресс-тестов и принятия рациональных мер необходимо располагать сведениями о распространенности заболевания по данным эпиднадзора, так как эта информация определяет прогностическую ценность положительного и отрицательного результата. Меньшая, по отношению к методам амплификации нуклеиновых кислот, ожидаемая чувствительность этих экспресс-тестов не позволяет их применять для скрининга. Однако возможность быстрого (в течение 20 минут) получения результата, при высокой специфичности, возможно идентифицировать носителя инфекции в случае получения положительного результата и приступить к соответствующим лечебным и противоэпидемиологическим мероприятиям. Отрицательный результат такого экспресс-теста должен быть обязательно перепроверен в исследовании методом амплификации нуклеи-

новых кислот. Объем накопленных в настоящее время фактических данных в отношении эффективности и практического применения иммунохимических экспресс-тестов для определения в исследуемом материале вируса *SARS-CoV-2* недостаточен и требует дальнейшего изучения.

**Серологические методы** включает набор технических приемов: иммунохроматографический анализ (ИХА), иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА), определение вируснейтрализующих антител.

Инфекция COVID-19 может быть обнаружена косвенно – путем изучения иммунного ответа организма человека на проникновение вирус *SARS-CoV-2*. Чтобы ответить на вопрос, подвергался ли человек воздействию *SARS-CoV-2* и развился ли у него иммунный ответ, используют тесты на выявление антител к данному вирусу. В их основе лежат методы иммуноферментного анализа, иммунохроматографии и их аналогов, появившиеся позже молекулярно-генетических методов выявления *SARS-CoV-2*, так как для их разработки требуются знания о тех белках вируса *SARS-CoV-2*, на которые реагирует иммунная система человека. Но для этого необходимо время, чтобы изучить строение вируса.

Серологические исследования целесообразно осуществлять с диагностической, эпидемиологической, лечебной и профилактической целями.

Диагностическая цель использования серологических методов исследования: во-первых если клиническое и эпидемиологическое подозрение на COVID-19 у пациента существует и продолжает сохраняться, но ПЦР-исследование не проводилось или дало отрицательный либо неопределенный результат, то для доказательной оценке состояния патологического процесса у пациента и объективного клинического диагноза необходимо определение различных антител - IgM, IgG, IgA к вирусу *SARS-CoV-2*; во-вторых - для оценки уровня антител к вирусу у медицинского персонала, работающего с больными COVID-19 необходимо определение IgM, IgG, IgA.

В эпидемиологических исследованиях серологические методы используются: для обследования популяции и определения доли переболевших, перенесших инфекцию без симптомов, не контактировавших с возбудителем (определение IgG); при оценке инфицированности контактных при отсутствии обнаружения РНК вируса и т.д.

Для решения профилактических задач серологические методы применяются: при разработке, испытаниях и контроле эффективности вакцин (определение IgG) и оценки состояния коллективного иммунитета в регионе.

В лечебных целях результаты серологических тестов помогают идентифицировать потенциальных доноров реконвалесцентной плазмы (один из методов лечения тяжелых больных COVID-19) [30].

**Иммунохроматографический анализ (ИХА).** Быстрыми методами определения сывороточных антител для выявления вирусных белков являются Point-of-care (POC) - «прикроватные» тесты с использованием метода ИХА (RDT (боковой поток)/иммунохроматографический анализ). В POC - тестах могут выявляться IgG или IgG и IgM, или общие антитела в сыворотке, плазме, цельной крови и/или слюне. Важные преимущества – возможность использования капиллярной крови, быстрое исполнение. В зависимости от реагентов выявляют антитела IgG, IgM и IgA. Иммунохроматографические экспресс-тесты нашли широкое применение в местах оказания медицинской помощи, они используются в диагностике COVID-19 для качественного выявления антител и указывают только на наличие или отсутствие антител IgM и IgG против *SARS-CoV-2*. Портативность тест-кассеты и быстрота исполнения (результат в течение 10-30 минут) делают эти тесты удобными для использования в point-of-care, начиная с 3-го дня появления симптомов заболевания. Результаты иммунохроматографического теста не должны использоваться в качестве единственного критерия для диагностики инфекции COVID-19, особенно при отрицательных результатах.

**Иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA).** Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA) в диагностике COVID-19 на текущий период времени разработан в качественном и количественном вариантах. В качестве материала для ИФА-исследования используют образцы сыворотки или плазмы крови. В результате положительной реакции образуется окрашенный продукт окисления, производящий результирующий сигнал, отражающий наличие специфических антител в образце пациента. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию в образце антител к *SARS-CoV-2*. При диагнозе COVID-19 методом ИФА наиболее часто определяют наличие у пациента антитела IgM или IgG к *SARS-CoV-2*, это самый чувствительный тест определения антител в сыворотках крови.

**Иммунохемилюминесцентный анализ (CLIA/ИХЛИА).** ИХЛИА является аналогом ИФА. В диагностике у пациентов с COVID-19 позволяет определить количественный уровень содержания антител IgM или IgG к штамму *SARS-CoV-2* коронавируса в клиническом образце (сыворотке, гепаринизированной или цитратной плазме) на автоматизированных анализаторах. Принцип реакции: двухстадийный сэндвич-метод.

Лабораторные тесты методами ELISA/ИФА (иммуноферментный анализ) и CLIA/ИХЛИА (иммунохемилюминесцентный анализ) для выявления антител требуют обученного персонала и специального оборудования. Используются в лабораторных условиях, обеспечивая высокий уровень качества и незаменимы при массовом скрининге. Существуют разнообразные решения, варьирующие по аналитическим характеристикам чувствительности и специфичности, уровня автоматизации, операционной эффективности, производительности, скорости выдачи результатов, подключению к информационным решениям и пр.

**Интерпретация результатов.** Определение уровня антител в диагностике COVID-19 позволяет определить различные фазы инфекционного процесса (рис. 3) [52]. IgA начинают формироваться и доступны для детекции примерно со 2 дня от начала заболевания, достигают пика через 2 недели и сохраняются длительное время. IgM начинают выявляться примерно на 7-е сутки от начала заражения, достигают пика через неделю и могут сохраняться в течение 2-х месяцев и более.

Примерно с 3-й недели или ранее определяются IgG к *SARS-CoV-2* [53]. Активная фаза

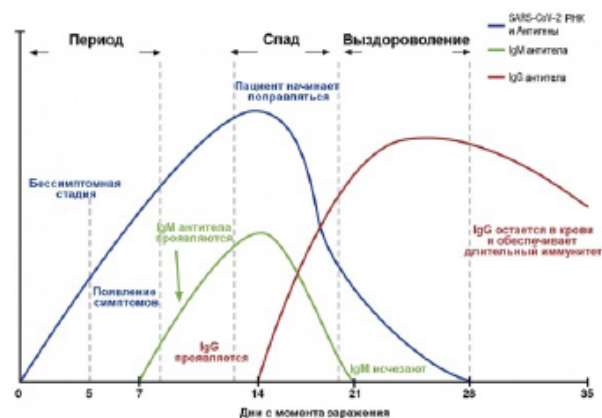


Рис. 3. Результаты выявления антигенов и антител на различных этапах инфекционного процесса COVID-19 [52].

устанавливается при выявлении диагностически значимого уровня IgA или IgM в единственном образце или значимым нарастанием уровня IgG в парных сыворотках, взятых с интервалом в 2-4 недели. Фаза сероконверсии характеризуется тем, что антитела могут не выявляться в первичном образце, но выявляются во взятых через несколько дней образцах. Если концентрация IgA и IgM существенно снижается (падение титра в 2-4 раза) во время выздоровления, при сохраняющихся IgG через 2 недели после курса лечения и позднее позволяет говорить о фазе реконвалес-



ценции. Перенесенная инфекция характеризуется персистенцией IgG без роста его уровня в парных сыворотках и отсутствие IgA и IgM. Определение уровня IgG в высоких титрах через 4 недели после вакцинации позволяет подтвердить наличие поствакцинального иммунитета [54].

Серологическая диагностика особенно важна для пациентов с легкой и средней степенью тяжести заболевания с поздними проявлениями симптомов – через две недели после попадания вируса. Кроме того, определение антител становится важным инструментом для понимания степени распространения COVID-19 среди населения и выявления лиц, обладающих иммунитетом и потенциально «защищенных» от заражения (оценка иммунного статуса популяции) [55].

Как правило, обнаружение специфических антител после заражения *SARS-CoV-2* указывает на то, что существует стимуляция антигена, которая не всегда связана с развитием инфекционного процесса, поэтому этот метод является эффективным дополнением к обнаружению нуклеиновых кислот и является лишь косвенным доказательством проникновения в организм *SARS-CoV-2*.

Потенциальной проблемой описанных методов диагностики является вероятность получения ложноположительных результатов за счет иммунного ответа на другие коронавирусы, поскольку все вирусные белки в определенной степени будут вызывать реакцию образования антител. Не исключаются и ложноотрицательные ответы, которые могут быть при исследовании биологических образцов, взятых на серонегативном этапе развития инфекции, или при обследовании пациентов со сниженным иммунитетом. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты могут также появляться при нарушении правил проведения лабораторных исследований на всех этапах.

Для минимизации ложноположительных результатов рекомендуется ввести алгоритм последовательного тестирования пациентов, у которых получены первоначальные положительные результаты на антитела классов IgM/IgA или IgG, с использованием другого теста. С этой целью необходимо использовать тест-систему с максимальными чувствительностью и специфичностью, а также с одновременным выявлением антител классов IgA, IgM, IgG, которая будет играть роль референтной (верифицирующей) тест-системы. В качестве такой тест-системы может использоваться тест-система для выявления рецептор-связывающего домена поверхностного гликопротеина S у *SARS-CoV-2*.

*Определение вируснейтрализующих антител.* Анализ «нейтрализации антител» приме-

няется для определения наличия у пациента эффективных (вируснейтрализующих) антител и защитного иммунитета против COVID-19, так как дает количественную информацию о способности антител пациента. В сыворотке крови людей, иммунизированных или перенесших вирусное заболевание, обнаруживаются антитела, способные нейтрализовать инфекционные свойства вируса. Эти антитела выявляются при смешивании сыворотки с соответствующим вирусом и последующем введении этой смеси в культуру клеток. На основании отсутствия цитопатического действия вируса судят о нейтрализующей способности антител. Эта реакция в условиях *in vitro* широко используется для определения вида или типа вируса и титра нейтрализующих антител на этапе идентификации вируса в вирусологическом методе. Метод исследования трудоемкий, по времени занимает до 5 дней, не рекомендуется в качестве обычной диагностической процедуры. В диагностике COVID-19 применяют 2 типа нейтрализационных тестов: вирус-нейтрализационный тест (VNT), такой как plaque-reduction neutralization (PRNT)/нейтрализация бляшкообразования или микро-нейтрализация, когда используется *SARS-CoV-2* вирус из клинического изолята или рекомбинант *SARS-CoV-2* expressing reporter proteins; а также псевдовirus-нейтрализационный тест (pVNT), при котором используется рекомбинантный псевдовirus (подобно vesicular stomatitis virus, VSV) с инкорпорированным S белком *SARS-CoV-2*. Результат анализа нейтрализации антител демонстрирует способность плазмы или сыворотки пациента, перенесшего COVID-19, оказывать нейтрализующее действие на вирус в условиях живой культуры *in vitro*. В настоящее время этот метод применяется, главным образом, для научных целей [56, 57].

В России в настоящее время зарегистрировано 327 различных тест-систем для выявления *SARS-CoV-2*, включая контрольные материалы для подтверждения воспроизводимости и правильности определения *SARS-CoV-2*. На 276 тест-систем, из которых, установлен срок государственной регистрации до 01.01.2022 года, пролонгирована временная регистрация до 1 мая 2022 г. Должны быть внесены поправки в постановление Правительства РФ №507 от 15 апреля 2020 года, регламентирующее временный порядок обращения тест-систем. В перечень входят:

- 69 наборов реагентов для качественного и количественного выявления антител к *SARS-CoV-2*, методом иммуноферментного анализа, среди которых: иммуноферментное выявление специфических антител класса IgG (32 набора);

- иммуноферментное выявление специфических иммуноглобулинов класса IgM (19 наборов); иммуноферментное выявление специфических иммуноглобулинов класса IgA (5 наборов); иммуноферментное выявление суммарных антител IgG/IGM (9 наборов); иммуноферментное выявление суммарных антител IgM-IgG-IgA (4 набора).
- 66 наборов реагентов для иммунохроматографического выявления антител к *SARS-CoV-2*, (быстрые тесты), среди которых: иммунохроматографический анализ для качественного обнаружения общих антител IgM и IgG (63 набора); иммунохроматографический анализ для качественного обнаружения антител IgG (2 набора); метод латерального потока (1 набор).
  - 89 наборов реагентов для выявления антител иммунохемилюминесцентным методом, среди которых: иммунохемилюминесцентный метод выявления антител класса IgG (21 набор); иммунохемилюминесцентный метод выявления антител класса IgM (19 наборов); иммунохемилюминесцентный метод выявления общих антител класса IgM/IgG (20 наборов).
  - 38 наборов контрольных материалов для подтверждения воспроизводимости и правильности качественного определения антител класса (IgG)/(IgM).
  - 44 набора реагентов для выявления антигена *SARS CoV-2*, среди которых: экспресс-тесты для обнаружения антигена вируса *SARS-CoV-2* в мазках из носоглотки методом иммунохроматографического анализа (37 набора); иммуноферментное определение нуклеокапсидного антигена *SARS-CoV-2* (3 набора).
  - 2 набора реагентов для иммунодиагностического определения антигена усиленной хемилюминесценции (2 набора).
  - 2 набора контрольных материалов для качественного определения антигена нуклеокапсидного белка *SARS-CoV-2* (2 набора).
  - 50 наборов реагентов для выявления РНК коронавируса *SARS-CoV-2* методом ПЦР, включая контрольные материалы для подтверждения воспроизводимости и правильности определения мРНК *SARS-CoV-2* [58].

**Перспективные методы лабораторной диагностики.** Специалисты НМИЦ гематологии и НИИ имени Л. Пастера в Санкт-Петербурге создаются тесты, чтобы выявлять Т-лимфоциты, за-

щищающие от COVID-19, даже при отсутствии антител. Технология позволит подтверждать перенесенную коронавирусную инфекцию в спорных случаях и будет использована для оценки эффективности вакцинации от COVID-19. Известно, что Т-лимфоциты хранят информацию о ранее выявленных иммунной системой в организме антигенах и формируют долговременный иммунитет к перенесенным инфекционным заболеваниям, особенно это характерно для вирусных инфекций. Проведенные исследования показали, что Т-лимфоциты, специфичные к *SARS-CoV-2* обнаруживаются у людей, которые перенесли инфекцию бессимптомно и не выработали антитела, их выявляют в образцах крови, взятых еще до пандемии. Это связано с перекрестным иммунитетом, вызванным ранее перенесенными циркулировавшими коронавирусными инфекциями. У переболевших, особенно легко и бессимптомно не вырабатываются антитела, а Т-лимфоциты присутствуют. Исследования показывают, что уже через полгода у значительной части переболевших количество антител сильно снижается, а у некоторых они исчезают. Т-клеточный ответ потенциально сохраняется гораздо дольше, но провести скрининг сложно, из-за технических трудностей – отсутствия простого метода определения специфических Т-лимфоцитов. Для этого разрабатывается тест-система. Эта технология основана на методе выявления реагирующих на вирус Т-лимфоцитов, конкретным набором фрагментов коронавирусных белков, не дающих ложно-положительную реакцию Т-клеток [59].

Другой тест для оценки клеточного иммунитета пациенту относится к варианту аллергологического метода, когда внутривенно вводят специальный искусственный антиген к коронавирусу, после чего наблюдают за реакцией. Образование папулы, как при реакции Манту, означает положительный результат, то есть у пациента есть Т-клеточный иммунитет. На интенсивность иммунной реакции указывает размер образовавшейся припухлости, которую медицинский работник измеряет линейкой и принимает решение о необходимости вакцинации [60].

Таким образом, существуют различные специфические методы лабораторной диагностики COVID-19. Какие использовать из этих методов для клинической и эпидемиологической диагностики, чаще определяется не объективными критериями: патогенезом заболевания или эпидемической ситуацией, а возможностями лабораторной службы в конкретном регионе и территории. Поэтому на качество и достоверность лабораторного исследования влияют не существующий арсенал методов, который со-

временный, хорошо технически оснащенный и научно-обоснованный, а конкретно для каждого региона организация лабораторной службы, ее оснащенность и подготовленность специалистов проводить исследования на современном методическом уровне.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы лабораторной диагностики являются основными в установлении специфического происхождения заболеваний, особенно это важно при диагностике инфекционных заболеваний. Современный уровень достоверной лабораторной диагностики достаточно высокий и основан на современных методах в основе которых лежат достижения науки в молекулярной биологии, генетике, иммунологии, биотехнологии, микробиологии, вирусологии, физики, химии и т.д. Эти достижения как раз и позволили достаточно быстро обеспечить расшифровку этиологической причины новой коронавирусной инфекции. Однако, как и имеющийся исторический опыт было показано, что без широкого использования в каждой стране современной лабораторной базы, оснащенной современными технологиями не решит проблемы широкого использования лабораторных методов только силами крупных научно-исследовательских центров. Огромное количество больных в разном клиническом состоянии и носителей инфекции требует мощной и широко территориально расположенной лабораторной базы в каждом регионе страны на уровне области или крупного города, а также овладение специалистами лабораторной службы методическими и техническими приемами многих лабораторных методов.

Мировой опыт этиологической диагностики COVID-19 доказывает необходимость сочетания молекулярно-генетических и специфических иммунологических лабораторных тестов. Для их проведения выпускаются в разных странах, в том числе и в Российской Федерации, как наборы, предназначенные для лабораторного использования, так и тест-системы, и устройства, позволяющие проводить диагностику инфицирования *SARS-CoV-2* вне лабораторий, на месте оказания помощи, т.е. необходим спектр методов и арсенал технических приемов для разных видов диагностики. Происходящая пандемия, вызванная COVID-19, не только подтвердила, но и показала необходимость обратить внимание на состояние лабораторной службы в структуре каждого региона.

На современном этапе рекомендуемый алгоритм лабораторной специфической диагностики COVID-19 включает выявление РНК *SARS-CoV-2* (тест-система, ориентированная на две/

три мишени генома вируса) методом ОТ-ПЦР/изотермальная амплификация и серологическое исследование на специфические антитела IgM, IgG, IgA. Интерпретация результатов исследований методами амплификации нуклеиновых кислот и определения антител к *SARS-CoV-2* должна проводиться с учетом анамнеза, эпидемиологических и клинических данных.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ryu S., Chun B. C. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus. *Epid. He alth.* 2020;42:2020006. doi:10.4178/epih.e2020006.
2. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y. M., Wang W., Song Z. G., Hu Y., Tao Z. W., Tian J. H., Pei Y. Y., Yuan M. L., Zhang Y. L., Dai F. H., Liu Y., Wang Q. M., Zheng J. J., Xu L., Holmes E. C., Zhang Y. Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3.
3. Gorbalenya A. E. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus – The species and its viruses, a statement of the Coronavirus Study Group. Available at February 11, 2020; Accessed: February 13, 2020. doi:10.1101/2020.02.07.937862.
4. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 48. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situationreports/20200308-sitrep-48-covid19.pdf?sfvrsn=16f7ccef>.
5. CDC. 2019 Novel Coronavirus, Wuhan, China: 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) in the U. S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-in-us.html>.
6. Otto M A. Wuhan Virus: What Clinicians Need to Know. *Medscape Medical News.* January 27, 2020. Available at: <https://www.medscape.com/viewarticle/924268>.
7. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report 11 (31 January 2020). Available at: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7_4).
8. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Министерство здравоохранения Российской Федерации. Версия 11. Москва, 2021.

9. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Surveillance and case definitions. Electronic resource. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus2019/technicalguidance/surveillance-and-case-definitions>.
10. Временное руководство по лабораторной диагностике COVID-19 в условиях пандемии: Методические рекомендации № 89. М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2020.
11. China's CDC releases first image of new coronavirus, shares genetic info with Japan, Thailand. Electronic resource. Available at: <https://amp.ibtimes.sg/chinas-cdc-releases-first-image-new-coronavirus-shares-genetic-info-japan-thailand-38238>.
12. Kim J. M., Chung Y. S., Jo H. J. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2020. 11(1):3-7. doi:10.24171/j.phrp.2020.11.1.02.
13. Drosten C., Gunther S., Preiser W. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:1967–1976. doi:10.1056/NEJMoa030747.
14. Sims A. C., Baric R. S., Yount B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J. Virol.* 2005; 79: 15 511–524. doi: 10.1128/JVI.79.24.15511-15524.2005.
15. de Wilde A. H., Raj V. S., Oudshoorn D., Bestebroer T. M., van Nieuwkoop S., Limpens R. W. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. *J. Gen. Virol.* 2013;94 (Pt 8):1749–1760. doi:10.1099/vir.0.052910-0.
16. Cottam E. M., Whelband M. C., Wileman T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*. 2014;10(8):1426-4141. doi:10.4161/auto.29309.
17. He L., Ding Y., Zhang Q. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *J. Pathol.* 2006;210:288–297. doi:10.1002/path.2067.
18. Yan H., Xiao G., Zhang J. SARS coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* 2004;73:323–331. doi:10.1002/jmv.20094.
19. Tan Y. J., Fielding B. C., Goh P-Y. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J. Virol.* 2004;78:14043–14047. doi: 10.1128/JVI.78.24.14043-14047.2004.
20. Law P. T., Wong C. H., Au T. C. The 3a protein of severe acute respiratory syndrome associated coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 1921–1930. doi: org/10.1099/vir.0.80813-0.
21. Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):2431. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
22. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
23. National Institute for Viral Disease Control and Prevention (China). Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus. Beijing: National Institute for Viral Disease Control and Prevention (China); 21 Jan 2020. Chinese. Available at: [http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121\\_211337.htm](http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.htm).
24. Хайтович А. Б., Ткач А. В. Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных заболеваний: методическое пособие. Симферополь: Издательский дом КФУ; 2021.
25. U.S. Department of Health & Human Services (2020) Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Jan 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf>. Accessed 28 Jan 2020 Coronavirus. 24.
26. U.S. Department of Health & Human Services (2020) 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. 24 Jan 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed 28 Jan 2020.
27. Мавзютов А. Р., Гарафутдинов Р. Р., Халикова Е. Ю. и др. Проблемные аспекты диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 с помощью обратнo-транскрипционной ПЦР. *Биомика*. 2020;12(4):564-590. doi:10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50.
28. В Роспотребнадзоре создали тест для определения количества коронавируса в биоматериале. Available at: [https://news.rambler.ru/science/46003652/?utm\\_content=news\\_media&utm\\_medium=read\\_more&utm\\_source=copylink](https://news.rambler.ru/science/46003652/?utm_content=news_media&utm_medium=read_more&utm_source=copylink).
29. В Роспотребнадзоре создали тест для определения количества коронавируса в биоматериале. Available at: <https://news.rambler.ru/science/46003652-v-rosпотреbnadzore-sozdali>

test-dlyaopredeleniya-kolichestva-koronavirusa-v-biomateriale/.

30. Набор реагентов «ПЦП-РВ-2019-нСov». Available at: <https://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-ptsr-v-realnom-vremeni/nabor-reagentov-ptsr-rv-2019-ncov.html>.

31. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings, CDC. May, 2020. Available at: [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html).

32. Хайтович А. Б. Коронавирусы (таксономия, структура вируса). Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2020;10(3):69-81. doi:10.37279/2224-6444-2020-10-3-69-81.

33. Первая отечественная тест-система для секвенирования полного генома коронавируса SARS-CoV-2. Available at: <https://genetics-info.ru/news/pervaya-otechestvennaya-test-sistema-dlya-sekvenirovaniya-polnogo-genoma-koronavirusa-sars-cov-2/>.

34. Zhang Y., Odiwuor N., Xiong J., Sun L., Nyaruaba R. O., Wei H., Tanner N. A. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. doi:10.1101/2020.02.26.20028373.

35. Ласточкина О. В., Горелова П. В. Биологические микрочипы – новый уровень лабораторных исследований. Аналитика. 2017;5(36):76-86. doi: 10.22184/2227-572X.2017.36.5.76.86.

36. Hardick J., Metzgar D., Risen L. et al. Initial performance evaluation of a spotted array Mobile Analysis Platform (MAP) for the detection of influenza A/B, RSV, and MERS coronavirus, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2018;91:245-247. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.011.

37. Wright A. V., Nunez J. K., Doudna J. A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 14;164(1-2):29-44. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.035.

38. Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Lee J. W. Nucleic acid detection with CRISPRCas13a/C2c2, *Science.* 2017;356(6336):438-442. doi: 10.1126/science.aam9321.

39. Freije C. A., Myhrvold C., Boehm C. K. et al., Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13, *Mol. Cell.* 2019;76:826-837. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.013.

40. Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Kellner M. J. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6, *Science.* 2018; 360(6387):439-444. doi:10.1126/science.aag0179.

41. Porte L., Legarraga P., Vollrath V., Aguilera X., Munita J. M., Araos R. Evaluation of novel

antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis.* 2020:S1201-9712(20)30405-7. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.098.

42. Diao B., Wen K., Chen J., Liu Y., Yuan Z., Han C. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein. medRxiv. 2020:2020.03.07.20032524. doi:10.1101/2020.03.07.20032524.

43. Lambert-Niclot S., Cuffel A., Le Pape S., Vauloup-Fellous C., Morand-Joubert L., Roque-Afonso A. M. et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8). doi:10.1128/JCM.00977-20.

44. Mertens P., De Vos N., Martiny D., Jassoy C., Mirazimi A., Cuypers L. Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:225-234. doi: 10.3389/fmed.2020.00225.

45. Blairon L., Mokrane S., Wilmet A., Dessilly G., Kabamba-Mukadi B., Beukinga I. Large-scale, molecular and serological SARS-CoV-2 screening of healthcare workers in a 4-site public hospital in Belgium after COVID-19 outbreak. *J Infect.* 2020:S0163- 4453(20)30514-4. doi: 10.1016/j.jinf.2020.07.033.

46. Mak G. C., Cheng P. K., Lau S. S., Wong K. K., Lau C. S., Lam E. T. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2020;129:104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500.

47. Nagura-Ikeda M., Imai K., Tabata S., Miyoshi K., Murahara N., Mizuno T. et al. Clinical evaluation of selfcollected saliva by RT-qPCR, direct RT-qPCR, RT-LAMP, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020;JCM.01438-20. doi: 10.1128/JCM.01438-20.

48. Omi K., Takeda Y., Mori M. SARS-CoV-2 qRT-PCR Ct value distribution in Japan and possible utility of rapid antigen testing kit. medRxiv. doi: 10.1101/2020.06.16.20131243.

49. Scohy A., Anantharajah A., Bodéus M., KabambaMukadi B., Verroken A., Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol.* 2020;129:104455. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104455.

50. Weitzel T., Legarraga P., Iruretagoyena M., Pizarro G., Vollrath V., Araos R. et al. Head-to-head comparison of four antigen-based rapid detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. bioRxiv. doi:10.1101/2020.05.27.119255.

51. Weiss A., Jellingso M., Sommer M. A. Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*. 58:102916. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102916.
52. Arons M. M., Hatfield K. M., Reddy S. C., Kimball A., James A., Jacobs J. R. et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(22):2081-2090. doi: 10.1056/NEJMoa2008457.
53. Sethuraman N., Jeremiah S. S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. May 6.2020. doi:10.1001/jama.2020.825.
54. Хайтович А. Б., Ермачкова П. А. Патогенез COVID-19. *Таврический медико-биологический вестник*. 2020;23(4):112-131.
55. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W. et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in 2 humans and its potential bat origin. *bioRxiv*. 2020. doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
56. Subbaraman N. Coronavirus tests: researchers chase new diagnostics to fight the pandemic. *Nature*. 2020. doi:10.1038/d41586-020-00827-6.
57. Wu F., Wang A, Liu M., Wang Q., Chen J., Xia S. et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*.2020. doi: 10.1101/2020.03.30.20047365.
58. Перечень тест-систем для выявления коронавируса 2 (SARS-CoV-2) в России. Электронный ресурс. Available at: <https://intermedika.ru/article/polnyj-perechen-diagnosticheskikh-testov-dlja>.
59. В России создают тест на определение Т-клеточного иммунитета к коронавирусу. Available at: <https://blood.ru/smi-o-nas/2016-v-rossii-sozdayut-test-na-opredelenie-t-kletochnogo-immuniteta-k-koronavirusu.html>.
60. Кожная проба покажет наличие клеточного иммунитета. Электронный ресурс. Available at: <https://www.pasteurorg.ru/article/261/3395/Areg-Totolyan-Kozhnaya-proba-pokazhet-nalichie-kletochnogo-immuniteta>.
1. Ryu S., Chun B. C. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus. *Epid. He alth*. 2020;42:2020006. doi:10.4178/epih.e2020006.
2. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y. M., Wang W., Song Z. G., Hu Y., Tao Z. W., Tian J. H., Pei Y. Y., Yuan M. L., Zhang Y. L., Dai F. H., Liu Y., Wang Q. M., Zheng J. J., Xu L., Holmes E. C., Zhang Y. Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020.03 Feb;579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
3. Gorbalenya A. E. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus – The species and its viruses, a statement of the Coronavirus Study Group. Available at February 11, 2020; Accessed: February 13, 2020. doi.org/10.1101/2020.02.07.937862.
4. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 48. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200308-sitrep-48-covid19.pdf?sfvrsn=16f7ccef>.
5. CDC. 2019 Novel Coronavirus, Wuhan, China: 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) in the U. S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-in-us.html>.
6. Otto M A. Wuhan Virus: What Clinicians Need to Know. *Medscape Medical News*. January 27, 2020. Available at <https://www.medscape.com/viewarticle/924268>.
7. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report 11 (31 January 2020). Available at: [https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7\\_4](https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7_4).
8. Temporary guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Ministry of Health of the Russian Federation. Version 11. Moscow, 2021 (In Russ.).
9. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Surveillance and case definitions. Electronic resource. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technicalguidance/surveillance-and-case-definitions>.
10. Interim guidelines for laboratory diagnostics of COVID-19 in the context of a pandemic: Methodological recommendations No. 89. Moscow: SBU «NII OZMM DZM», 2020 (In Russ.).
11. China's CDC releases first image of new coronavirus, shares genetic info with Japan, Thailand. Electronic resource. URL: <https://amp.ibtimes.sg/chinas-cdc-releases-first-image-new-coronavirus-shares-genetic-info-japan-thailand-38238>.
12. Kim J. M., Chung Y. S., Jo H. J. et al. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2020. 11(1): 3-7. doi.org/10.24171/j.phrp.2020.11.1.02

13. Drosten C., Gunther S., Preiser W. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1967–1976. doi: 10.1056/NEJMoa030747.
14. Sims A. C., Baric R. S., Yount B. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J. Virol.* 2005;79:15 511–524. doi: 10.1128/JVI.79.24.15511-15524.2005.
15. de Wilde A. H., Raj V. S., Oudshoorn D., Bestebroer T. M., van Nieuwkoop S., Limpens R. W. et al. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. *J. Gen. Virol.* 2013;94(Pt 8):1749–1760. doi:10.1099/vir.0.052910-0
16. Cottam E. M., Whelband M. C., Wileman T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy.* 2014; 10 (8):1426-4141. doi: 10.4161/auto.29309.
17. He L., Ding Y., Zhang Q. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *J. Pathol.* 2006;210:288–297. doi: 10.1002/path.2067.
18. Yan H., Xiao G., Zhang J. SARS coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* 2004;73:323–331. doi:10.1002/jmv.20094.
19. Tan Y-J., Fielding B. C., Goh P-Y. et al. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J. Virol.* 2004;78:14043–14047. doi: 10.1128/JVI.78.24.14043-14047.2004.
20. Law P. T., Wong C. H., Au T. C. The 3a protein of severe acute respiratory syndrome associated coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 1921–1930. doi: org/10.1099/vir.0.80813-0.
21. Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance.* 2020;25(3):2431. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
22. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
23. National Institute for Viral Disease Control and Prevention (China). Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus. Beijing: National Institute for Viral Disease Control and Prevention (China); 21 Jan 2020. Chinese. Available from: [http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121\\_211337.htm](http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.htm)
24. Khaitovich A. B., Tkach A.V. Molecular-genetic methods for the diagnosis of infectious diseases: a methodological guide. Simferopol: KFU Publishing House, 2021(In Russ.).
25. U.S. Department of Health & Human Services (2020) Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Jan 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf> (accessed 28 Jan 2020 Coronavirus. 24).
26. U.S. Department of Health & Human Services (2020) 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. 24 Jan 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> (accessed 28 Jan 2020).
27. Mavzyutov A. R., Garafutdinov R. R., Khalikova E. Yu. et al. Problematic aspects of the diagnosis of SARS-CoV-2 coronavirus infection by back-transcriptional PCR. *Biomics.* 2020;12(4):564-590. doi:10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50 (In Russ.).
28. Rosпотребнадзор has created a test to determine the amount of coronavirus in biomaterial. Electronic resource. URL: [https://news.rambler.ru/science/46003652/?utm\\_content=news\\_media&utm\\_medium=read\\_more&utm\\_source=copypink](https://news.rambler.ru/science/46003652/?utm_content=news_media&utm_medium=read_more&utm_source=copypink) (In Russ.).
29. Rosпотребнадзор has created a test to determine the amount of coronavirus in biomaterial. Available at: <https://news.rambler.ru/science/46003652-v-rospotrebnadzore-sozdali-test-dlya-opredeleniya-kolichestva-koronavirusa-v-biomateriala> (In Russ.).
30. Set of reagents «PCR-RV-2019-nCov». Available at: <https://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-ptsr-v-realnom-vremeni/nabor-reagentov-ptsr-rv-2019-ncov.html> (In Russ.).
31. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings, CDC (May, 2020). Available at: [www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html).
32. Khaitovich A. B. Coronaviruses (taxonomy, structure of the virus). *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2020;10(3):69-81. doi: 10.37279/2224-6444-2020-10-3-69-81(In Russ.).
33. The first domestic test system for sequencing the complete genome of the SARS-CoV-2 coronavirus. Available at: <https://genetics-info.ru/news/pervaya-otchestvennaya-test-sistema-dlya-sekvenirovaniya-polnogo-genoma-koronavirusa-sars-cov-2/>(In Russ.).

34. Zhang Y., Odiwuor N., Xiong J., Sun L., Nyaruaba R. O., Wei H., Tanner N. A. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. doi:10.1101/2020.02.26.20028373.
35. Lastochkina O. V., Gorelova P. V. Biological microchips – a new level of laboratory research. *Analytics*. 2017; 5(36):76-86. doi: 10.22184/2227-572X.2017.36.5.76.86 (In Russ.).
36. Hardick J., Metzgar D., Risen L. Initial performance evaluation of a spotted array Mobile Analysis Platform (MAP) for the detection of influenza A/B, RSV, and MERS coronavirus, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2018;91:245-247. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.011.
37. Wright A. V., Nunez J. K., Doudna J. A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell* 14;164(1-2):29-44. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.035.
38. Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Lee J. W. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2, *Science*. 2017;356(6336):438-442. doi: 10.1126/science.aam9321.
39. Freije C. A., Myhrvold C., Boehm C. K. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13, *Mol. Cell*. 2019;76:826-837. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.013.
40. Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Kellner M. J. et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6, *Science*. 2018; 360(6387):439-444. doi: 10.1126/science.aaq0179.
41. Porte L., Legarraga P., Vollrath V., Aguilera X., Munita J. M., Araos R. Evaluation of novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis.* 2020;S1201- 9712(20)30405-7. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.098.
42. Diao B., Wen K., Chen J., Liu Y., Yuan Z., Han C. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein. *medRxiv*. 2020:2020.03.07.20032524. doi:10.1101/2020.03.07.20032524.
43. Lambert-Niclot S., Cuffel A., Le Pape S., Vauloup-Fellous C., Morand-Joubert L., Roque-Afonso A. M. et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8). doi:10.1128/JCM.00977-20.
44. Mertens P., De Vos N., Martiny D., Jassoy C., Mirazimi A., Cuypers L. Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:225-234. doi: 10.3389/fmed.2020.00225.
45. Blairon L., Mokrane S., Wilmet A., Dessilly G., Kabamba-Mukadi B., Beukinga I. et al. Large-scale, molecular and serological SARS-CoV-2 screening of healthcare workers in a 4-site public hospital in Belgium after COVID-19 outbreak. *J Infect.* 2020:S0163- 4453(20)30514-4. doi: 10.1016/j.jinf.2020.07.033.
46. Mak G. C., Cheng P. K., Lau S. S., Wong K. K., Lau C. S., Lam E. T. et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2020;129:104500 doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500.
47. Nagura-Ikeda M., Imai K., Tabata S., Miyoshi K., Murahara N., Mizuno T. et al. Clinical evaluation of selfcollected saliva by RT-qPCR, direct RT-qPCR, RT-LAMP, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020;JCM.01438-20. doi: 10.1128/JCM.01438-20.
48. Omi K., Takeda Y., Mori M. SARS-CoV-2 qRT-PCR Ct value distribution in Japan and possible utility of rapid antigen testing kit. *medRxiv*. doi: 10.1101/2020.06.16.20131243.
49. Scohy A., Anantharajah A., Bodéus M., KabambaMukadi B., Verroken A., Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol.* 2020;129:104455. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104455.
50. Weitzel T., Legarraga P., Iruretagoyena M., Pizarro G., Vollrath V., Araos R. et al. Head-to-head comparison of four antigen-based rapid detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *bioRxiv*. doi: org/10.1101/2020.05.27.119255.
51. Weiss A., Jellingso M., Sommer M. A. Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine.* 58:102916. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102916.
52. Arons M. M., Hatfield K. M., Reddy S. C., Kimball A., James A., Jacobs J. R. et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *New England Journal of Medicine.* 2020;382(22):2081-2090. doi: 10.1056/NEJMoa2008457.
53. Sethuraman N., Jeremiah S. S., Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 *JAMA.* May 6.2020. doi:10.1001/jama.2020.825.
54. Khaitovich A. B., Ermachkova P. A. Pathogenesis of COVID-19. *Tavrishesky medicobiological Bulletin.* 2020;23(4):112-131 (In Russ.).
55. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in 2 humans and its



potential bat origin. bioRxiv. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

56. Subbaraman N. Coronavirus tests: researchers chase new diagnostics to fight the pandemic. Nature. 2020. doi:10.1038/d41586-020-00827-6.

57. Wu F., Wang A, Liu M., Wang Q. , Chen J., Xia S. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. medRxiv.2020. doi:10.1101/2020.03.30.20047365.

58. List of test systems for detecting coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Russia. (In Russ.). Available

at: <https://intermedika.ru/article/polnyj-perechen-diagnosticheskikh-testov-dlja>.

59. A test is being created in Russia to determine T-cell immunity to coronavirus. (In Russ.). Available at: <https://blood.ru/smi-o-nas/2016-v-rossii-sozdayut-test-na-opredelenie-t-kletochnogo-immuniteta-k-koronavirusu.html>.

60. A skin test will show the presence of cellular immunity. (In Russ.). Available at: <https://www.pasteurorg.ru/article/261/3395/Areg-Totolyan-Kozhnaya-proba-pokazhet-nalichie-kletochnogo-immuniteta>

## СУЩЕСТВУЮЩИЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ САЛИВАДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Шатохина А. С.<sup>2</sup>, Быков И. М.<sup>1</sup>, Филиппов Е. Ф.<sup>1</sup>, Курзанов А. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 350063, ул. Седина 4, Краснодар, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» Министерства здравоохранения Краснодарского края, 350040, ул. Димитрова 146, Краснодар, Россия

**Для корреспонденции:** Курзанов Анатолий Николаевич, д.м.н., профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: kurzanov@mail.ru

**For correspondence:** Kurzanov Anatoly Nikolaevich, MD, Professor of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University, e-mail: kurzanov@mail.ru

### Information about authors:

**Shatokhina A. S.**, <https://orcid.org/0000-0001-7719-370X>

**Bykov I. M.**, <https://orcid.org/0000-0002-1787-0040>

**Filippov E. F.**, <https://orcid.org/0000-0001-5817-0924>

**Kurzanov A. N.**, <https://orcid.org/0000-0002-0566-256X>

### РЕЗЮМЕ

Используемые в настоящее время методы лабораторной диагностики рака молочной железы (РМЖ) и связанные с ними диагностические процедуры не являются совершенными. В настоящее время имеется ограниченное количество данных, подтверждающих использование биомаркеров слюны в качестве диагностических инструментов для РМЖ. В данном обзоре представлены результаты исследований в области саливадиагностики РМЖ. Наиболее исследованными биомаркерами в составе смешанной слюны при РМЖ являются: эпидермальный фактор роста, раковый антиген 15-3, рецептор эпидермального фактора роста HER2/ neu. По данным литературы целесообразно использование слюны в качестве альтернативы крови для обнаружения мутаций в генах BRCA1 / 2 при выявлении наследственных форм РМЖ. Показано, что определение слюнной пероксидазы, конечных продуктов позднего гликирования, общего антиоксидантного статуса и малонового диальдегида могут иметь существенное значение в неинвазивной диагностике РМЖ. Также рассматривается возможность использования для ранней диагностики РМЖ исследования профиля свободных аминокислот в слюне, транскриптомных биомаркеров - мРНК CSTA, TPT1, IGF2BP1, GRM1, GRIK1, H6PD, MDM4 и S100A8 и протеомного биомаркера - карбоангидразы VI, полиаминов, а также ряда метаболических белков. Полагают, что исследования слюны могут оказаться такими же полезными, как и исследования биомаркеров крови в лабораторной диагностике РМЖ, а изучение и описание констелляций исследуемых биохимических и генетических показателей крови и слюны при РМЖ представляет не только научную, но и практическую ценность для совершенствования лабораторных методов диагностики этого заболевания. Взаимосвязь биохимических и генетических факторов слюны и крови, а также перспективы использования их наиболее информативных констелляций для ранней диагностики РМЖ в настоящее время становится предметом детальных научных исследований, что подтверждается информацией, представленной в данном обзоре.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, саливадиагностика, скрининг, биомаркеры

### EXISTING AND POTENTIAL POSSIBILITIES OF SALIVARY DIAGNOSTICS IN BREAST CANCER

Shatokhina A. S.<sup>2</sup>, Bykov I. M.<sup>1</sup>, Filippov E. F.<sup>1</sup>, Kurzanov A. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup>SBHI COD-1 State Budgetary Healthcare Organisation «Clinical Oncology Disptnsary № 1» Krasnodar, Russia

### SUMMARY

Currently used methods of laboratory diagnostics of breast cancer (BC) and related diagnostic procedures are not perfect. Nowadays, there exists a restricted amount of information proving the application of salivary biomarkers as diagnostic instruments for BC. This review presents the research results in the field of salivary diagnostics in BC. The most well studied biomarkers of BC in mixed saliva are: epidermal growth factor, cancer antigen 15-3, epidermal growth factor receptor HER2/neu. Some publications suggest that it is appropriate to use saliva as an alternative to blood to detect gene mutations in BRCA1/2 when searching for hereditary forms of BC. It was shown that determination of salivary peroxidase, advanced glycation end products, total antioxidant status and malone dialdehyd can be of significant importance in non-invasive diagnostics of BC. As a further possibility for early diagnosis of BC, it is considered to use profile analysis of free amino acids in saliva, transcriptomic biomarkers - mRNA CSTA, TPT1, IGF2BP1, GRM1, GRIK1, H6PD, MDM4, S100A8 and proteomic biomarker - carboanhydrase VI, polyamines as well as a number of metabolic proteins. It is assumed that analysis of saliva can become as useful in laboratory diagnostics of BC as analy-

sis of blood biomarkers. Moreover, research and description of constellations of analyzed blood and saliva biochemical and genetic values in BC are not only of a scientific interest, but are also of practical utility in order to improve laboratory diagnostics methods for this disease. Relationship between biochemical and genetic factors of saliva and blood, as well as the future use of their most informative constellations for early diagnosis of BC becomes currently a subject of detailed scientific research, which is proved by the facts provided in this review.

**Key words: breast cancer, salivary diagnostics, screening, biomarkers.**

Рак молочной железы (РМЖ) - это наиболее часто диагностируемый вид онкопатологии и основная причина смерти от рака среди женщин [1]. Междисциплинарный подход, включающий хирургическое, лучевое и системное лечение, в последние годы способствовал снижению смертности от РМЖ. Вероятно, снижение в основном связано с улучшением скрининга РМЖ и адъювантной терапии [2]. Ранняя диагностика РМЖ жизненно важна для увеличения выживаемости, снижения заболеваемости и снижения вероятности рецидива заболевания [3]. Когда РМЖ диагностируется на ранней стадии, лечение оказывается более успешным [4]. РМЖ очень неоднородное заболевание, что затрудняет его диагностику и лечение. Диагностика РМЖ включает выявление заболевания с помощью радиологического скрининга и подтверждающей биопсии. Обычный скрининг с физическим осмотром и маммографией имеет чувствительность (54%) и специфичность (77%) [5]. Биопсия ткани молочной железы и гистопатологические исследования являются эталонным стандартом диагностики, но процедура инвазивна и сопряжена с определенными рисками [6]. Современным трендом в развитии диагностики РМЖ является разработка неинвазивных или малоинвазивных диагностических процедур. К их числу в первую очередь относятся различные инструментальные (маммография, УЗИ, МРТ, ПЭТ) методы анализа. Использование методов молекулярной диагностики также ориентировано на неинвазивный анализ биологических жидкостей. Лабораторная онкодиагностика объединяет методы определения онкомаркеров – веществ, детектируемых в крови или других биожидкостях при развитии патологического процесса. Количество биомаркеров, реально используемых и рекомендуемых для диагностики и мониторинга РМЖ весьма ограничено.

Большинство онкозаболеваний являются системными и имеют многофакторный характер. Следовательно, биологические жидкости, такие как кровь, моча, и слюна, среди прочего, являются инструментами для прогнозирования развития и прогрессирования рака, отражая системные изменения в многомерных паттернах биомаркеров. Использование серийных уровней сывороточных онкомаркеров потенциально полезно при оценке эффективности проводимой

терапии. Однако доступные биомаркеры на основе крови не получили значимого применения для ранней диагностики РМЖ [7]. Одним из основных препятствий для скрининга РМЖ является тот факт, что большинство применяемых методов являются дорогостоящими, трудозатратными и обременительными для пациентов.

В то время как методы визуализации все еще нуждаются в развитии, биомаркеры РМЖ в сыворотке крови уже продемонстрировали свои ограничения. Таким образом, выявление информативных маркеров в биологических жидкостях организма для ранней диагностики РМЖ остается во многом не решенной проблемой. Актуальной проблемой в диагностической медицине является разработка методов, которые являются информативными, эффективными и неинвазивными. В этой связи любой новый диагностический подход, который потенциально может улучшить раннюю диагностику рака, мониторинг заболеваний и предполагает улучшение общей выживаемости заслуживает рассмотрения [8]. В последние годы в качестве надежной биожидкости для обнаружения системных патологических состояний, таких как рак, стали рассматривать смешанную слюну (ротовую жидкость), молекулярные компоненты которой могут отражать системный статус организма [9]. Одна из современных тенденций в раннем выявлении РМЖ указывает на возможное решение - использование биомаркеров цельной слюны. Важно отметить, что слюна имеет преимущества перед кровью в качестве биологической жидкости для клинической лабораторной диагностики поскольку ее сбор осуществляется неинвазивно, что снижает дискомфорт для пациента, когда требуется повторный сбор образцов и она содержит все биомаркеры, присутствующие в крови, хотя и в меньших количествах. Слюна как диагностический инструмент может внести существенное дополнение к арсеналу средств ранней диагностики и мониторинга РМЖ.

Первым исследованным биомаркером в составе смешанной слюны при РМЖ был эпидермальный фактор роста (EGF) [10]. Значительно повышенные концентрации EGF были обнаружены в слюне у пациентов с РМЖ в сравнении с группой здоровых женщин, тогда как в плазме были обнаружены противоположные результаты и не было корреляции между значениями EGF в

плазме и слюне. Самые высокие значения EGF в слюне были обнаружены в подгруппе пациентов с наличием местных рецидивов. Примерно в то же время к систематическому изучению возможностей саливадиагностики РМЖ приступили исследователи Отдела диагностических и биомедицинских наук Научного центра здоровья Техасского университета в Хьюстоне (США) под руководством профессора Чарльза Ф. Стрекфуса (C.F. Streckfus). Уже в 1999 году исследователи обнаружили наличие ракового антигена 15-3 (CA 15-3) и рецепторов эпидермального фактора роста (с-erbB-2) в слюне, взятой у 135 здоровых женщин [11].

Целесообразность исследования именно этих онкомаркеров в составе слюны очевидна и логична. Раковый антиген CA 15-3, сверхэкспрессируется при различных эпителиальных раках и играет решающую роль в прогрессировании заболевания. CA 15-3 и CA 27.29 являются антигенами гликопротеина MUC-1. CA 15-3 и CA 27.29, являются биомаркерами, одобренными Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для мониторинга и лечения запущенного или рецидивирующего РМЖ [12]. Сывороточный CA 15-3 в основном используется для определения прогноза РМЖ и эффективности терапии поскольку сывороточные уровни CA 15-3 пропорциональны разным стадиям и размеру опухоли. CA 27.29 обладает более высокой чувствительностью и меньшей специфичностью, чем CA15-3 [13].

Семейство белковых биомаркеров, которое включает рецепторы эпидермального фактора роста (HER1 или с-erbB-1) и HER2, которые напрямую определяют поведение эпителиальных клеток [14]. Их избыточная экспрессия в тройных отрицательных типах РМЖ часто является признаком плохого прогноза и, в конечном итоге, худших шансов на выживание [15]. HER2, также известный как HER2 / neu или с-erbB-2, является важным биомаркером для диагностики типов РМЖ, предиктором прогрессирования HER2-положительных клеточных линий РМЖ, прогностическим индикатором снижения выживаемости пациентов с метастатическим РМЖ [16; 13].

Результаты исследования [11] установили исходный уровень для измерения биомаркеров в слюне женщин без признаков злокачественного заболевания и обосновали представление о том, что концентрации CA 15-3 и с-erbB-2 в слюне могут быть полезны для выявления РМЖ и / или послеоперационного наблюдения за пациентами, проходящими лечение от РМЖ. В 2000 году были опубликованы первые результаты ис-

следований содержания в слюне рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), p53, катепсина D, сerb B-2 (HER2 / neu) и ракового антигена CA15-3 у пациентов с РМЖ [17], которые впервые обнаружили диагностически значимые уровни опухолевых маркеров: ракового антигена 15-3 (CA15-3), с-erbB-2 и белка-супрессора онкогена 53 (p53) в слюне женщин с РМЖ. Уровни erb и CA15-3 у исследуемых пациентов были значительно (на 50%) выше, чем уровни в слюне здоровых контрольных субъектов и пациентов с доброкачественными опухолями. Результаты этого пилотного исследования предполагают, что эти маркеры потенциально могут использоваться при первоначальном выявлении и / или последующем скрининге для выявления РМЖ. Исследование [18] было предпринято, чтобы установить возможную полезность белкового компонента слюны с-erbB-2 у пациентов с РМЖ. Определение концентрации с-erbB-2 и CA 15-3 выполняли в образцах стимулированной цельной слюны и сыворотки крови, взятых у пациентов перед любой дополнительной терапией или операцией, и последовательно во время терапии. Анализ парных t-тестов показал, что концентрации с-erbB-2 в слюне показали значительную разницу между значениями до и после терапии ( $t = 4,245$ ,  $P < 0,0001$ ). Кроме того, содержание с-erbB-2 в слюне показало большее процентное снижение во всех методах лечения по сравнению с другими маркерами [18]. Это предварительное исследование показало, что анализ экспрессии белка с-erbB-2 в слюне может быть очень полезным диагностическим инструментом для измерения реакции пациента на химиотерапию и / или хирургическое лечение РМЖ.

Из-за гетерогенности экспрессии с-erbB-2 проведены более исчерпывающие протеомные исследования [19]. Авторы проанализировали протеомные профили слюны при инвазивном раке груди, протоковой карциноме *in situ* и фиброаденомах. Было идентифицировано всего 130 белков, 40 из которых имели значительную дифференциальную экспрессию в группе злокачественных и доброкачественных заболеваний по сравнению с контрольной группой. Аналогичное исследование, анализирующее профили белков слюны у женщин с инвазивной протоковой карциномой стадии IIa и стадии IIb, выявило в общей сложности 174 белка, из которых 55 были обнаружены на обеих стадиях. Интересно, что 20 и 28 белков были специфичными для стадии IIa и стадии IIb соответственно [20]. В другом исследовании профили белков слюны сравнивали среди пациентов с РМЖ с положительным или отрицательным рецептором с-erbB-2, в результате было выявлено 188 белков

слюны в обеих группах, из которых 34 белка с повышенной регуляцией и 37 белков с пониженной регуляцией экспрессировались значительно дифференцированно. Считается, что большинство изменений белков слюны, вторичных по отношению к статусу рецептора c-erb B-2, связаны с иммунным ответом, метаболизмом и структурой клеток. Было предложено использовать уровни HER2 в слюне для обнаружения HER2-типов РМЖ [21]. В эти же годы исследователи других лабораторий проанализировали коррелятивную взаимосвязь между уровнем СА15-3 в сыворотке и слюне [21; 22]. В группе пациентов с ранней стадией РМЖ измерялась концентрация СА15-3 в слюне и сыворотке по сравнению с контрольной группой [22]. Показатели концентрации СА15-3 слюны и сыворотки были выше на стадии II по сравнению с стадией I РМЖ. Несмотря на более низкую скорость слюноотделения у онкологических больных, наблюдалась значительная положительная корреляция между концентрациями СА15-3 в сыворотке и слюне, а также между концентрациями СА15-3 в сыворотке и дебитом СА15-3 в слюне. Результаты этого исследования позволили предположить, что СА 15-3 слюны может потенциально использоваться при начальном раннем выявлении рака молочной железы у женщин. Было проанализировано содержание СА15-3 в слюне и сыворотке пациентов с РМЖ и в группе здоровых добровольцев контрольной группы [23]. Результат сравнения концентрации СА15-3 в слюне и уровня в сыворотке ни в группе пациенток с РМЖ ни в контрольной группе не был статистически значимым, однако корреляция между концентрацией СА 15-3 в слюне и сыворотке была положительной и статистически значимой. Это позволило авторам предположить, что слюна может быть альтернативой крови для лабораторного мониторинга РМЖ. В более поздней работе [24] также сообщили об умеренной корреляции между концентрацией СА15-3 в слюне и сыворотке крови. В недавнем исследовании [25] определили концентрации СА15 3 в слюне и крови у пациенток с РМЖ с применением новых диагностических тестов хемилюминесцентного и электрохемилюминесцентного анализа с целью оценки новых диагностических подходов путем исследования СА15 - 3 в слюне. Уровни СА15 3 были самыми высокими для РМЖ IV стадии. В другом исследовании, выполненном в той же лаборатории была обнаружена умеренная связь между СА15-3 в сыворотке и слюне у пациенток с РМЖ ( $r = 0,56$ ;  $P = <0,01$ ) [26].

Примерно 5 % случаев РМЖ вызваны наследованием мутаций в генах репарации ДНК. Наиболее хорошо в этой связи изучены гены BRCA1

и BRCA2. Гены-супрессоры опухолей BRCA1 и BRCA2 являются двумя основными генами предрасположенности к РМЖ и раку яичников, а вредные мутации в этих генах вносят вклад в патогенез этих форм рака [27]. Мутантный ген BRCA передается по наследству, детерминируя риск развития РМЖ у родственниц больных РМЖ. Мутации BRCA рассматриваются как молекулярно-генетические маркеры, имеющие прогностическое значение. В клинической онкологической практике эти маркеры используются для ранней диагностики злокачественных новообразований и, в частности, РМЖ. Большинство лабораторий используют цельную кровь в качестве основного источника образцов для генетических тестов BRCA. Однако слюна стала более удобным альтернативным источником геномной ДНК для генетического тестирования [28;29]. Важное преимущество, связанное со слюной как источником геномной ДНК - ее стабильность при хранении и транспортировке. Сравнительные исследования, проведенные на образцах слюны и крови от доноров, констатировали более чем 97% совпадении результатов генотипирования [29;30]. Были выполнены сравнение эффективности слюны и крови как источников ДНК для выявления наследственных мутаций BRCA, а также оценка пригодности слюны в качестве альтернативного источника геномной ДНК для идентификации мутаций в генах BRCA1 / 2 [31]. Данные, полученные из образцов слюны, были в высокой степени согласованы с образцами крови (среднее значение  $98 \pm 0,02\%$ ), подтверждая использование слюны в качестве подходящего источника геномной ДНК, что позволило рекомендовать использование слюны в качестве альтернативы для обнаружения мутации в генах BRCA1 / 2.

Группой американских исследователей была обнаружена чрезвычайно важная, функция белка BRCA1. Методами молекулярно-генетического анализа было показано, что белок BRCA1 способен защищать клетки от оксидативного стресса посредством множественной активации экспрессии генов, ответственных за цитопротекторный антиоксидантный ответ [32]. В их числе - гены, кодирующие ферменты глутатионтрансферазу и оксидредуктазу. Было установлено, что гиперэкспрессия гена/ белка BRCA1 приводит к повышению устойчивости клеток к действию оксидативных факторов, а его дефицит, наоборот, усиливает чувствительность к их воздействию. Более того, оказалось, что при оксидативном стрессе ген/белок BRCA1 значительно влияет на окислительно-восстановительный внутриклеточный статус, повышая соотношение восстановленной и окисленной форм глу-

татиона. Из белков, гиперэкспрессированных в высокометастатических линиях РМЖ, интерес представляет супероксиддисмутаза - фермент, регулирующий баланс активных форм кислорода и перекисных радикалов в клетке. Супероксиддисмутаза играет ключевую роль в антиоксидантной защите организма, а нарушение функции гена супероксиддисмутазы связано с высоким риском развития РМЖ [33].

Нарушения окислительно-восстановительного баланса и тяжелые окислительные повреждения наблюдались как в сыворотке / плазме, так и в опухолях у больных РМЖ [34] (Rajneesh S.P. et al., 2008. Sawczuk V. et al., (2019) Продемонстрировано [35], что слюна больных РМЖ с мутацией BRCA1 характеризуется повышенной антиоксидантной способностью и более высокой степенью окислительного повреждения белков и липидов и такие изменения не наблюдались у больных раком без мутации BRCA1. Авторы показали, что слюнная пероксидаза, конечные продукты позднего гликирования, общий антиоксидантный статус и малоновый диальдегид могут иметь особое клиническое значение в неинвазивной диагностике РМЖ [35].

Исследована возможность использования профиля свободных аминокислот (SFAA) в слюне для ранней диагностики РМЖ [36]. Показано, что существуют значительные различия в концентрации 15 SFAA в слюне между пациентками с РМЖ на ранней стадии заболевания (стадии I и II), больными РМЖ на поздней стадии (стадии III и IV) и здоровыми людьми из контрольной группы. Оценивали диагностическую эффективность каждого аминокислотного биомаркера или индекса профиля SFAA для скрининга РМЖ. Значения площади под кривой (AUC) в контрольной группе по сравнению с РМЖ I-II на основе одного аминокислотного биомаркера составляли от 0,695 до 0,866. AUC для комбинированного индекса профиля SFAA включающего пролин (Pro), треонин (Thr) и гистидин (His), Pro, Thr, His составила 0,916 (чувствительность 88, 2%, специфичность 85,7%) при различении контрольной группы от РМЖ I-II стадии. Таким образом диагностические возможности 15 SFAA в качестве ранних диагностических биомаркеров РМЖ были подтверждены, и диагностическая точность была улучшена при использовании индекса профиля SFAA [36].

Самая большая проблема саливадиагностики состоит в том, что анализы в слюне находятся в значительно более низких концентрациях, чем в крови. По этой причине для поиска биомаркеров РМЖ целесообразно тестирование в слюне РНК, поскольку системы обнаружения РНК, такие как ПЦР, могут амплифицировать очень

небольшие количества РНК [37]. Недавно было обнаружено, что РНК попадает в слюну из различных тканей организма через наноразмерные мембранные везикулы экзосомы [38], высвобождаемые различными типами клеток. Экзосомы сохраняют свое цитоплазматическое содержимое и, таким образом, транспортируют белки, мРНК и микроРНК, характерные для клетки, из которой они произошли. При РМЖ содержимое в виде миРНК и белков, обнаруженных в опухолевых экзосомах, выделенных из жидкостей организма пациентов, играет важную роль в развитии и прогрессировании рака [39] Эти особенности делают экзосомы потенциальными источниками биомаркеров при РМЖ. Экзосомы в цельной слюне человека были впервые описаны [40]. Благодаря своей доступности слюна стала потенциальным источником экзосомальных биомаркеров для диагностической и прогностической оценки [41]. Использование экзосом слюны может быть многообещающим для выявления предраковых поражений и ранних стадий рака. У пациентов с РМЖ уровни СЕА и СА15 - 3 в циркулирующих экзосомах связаны с прогрессированием рака [42].

Биомаркерный потенциал экзосом открывает большие возможности для диагностики и лечения РМЖ. Циркулирующие микроРНК, инкапсулированные в экзосомы, представленные как ранний идеальный биомаркер РМЖ, и характер экспрессии экзосомальных miРНК также коррелируют со степенью злокачественности опухоли и прогнозом [43]. Сообщалось, что aberrации в экспрессии miРНК участвуют в онкогенезе и развитии рака [44]. Было обнаружено, что более 133 miРНК представляют аномальные уровни экспрессии в тканях РМЖ. На сегодняшний день исследования сосредоточены на профилировании экспрессии микроРНК при РМЖ [45]. Продемонстрировано, что miРНК стабильны в жидкостях организма, таких как слюна, и имеют большой потенциал стать неинвазивными инструментами скрининга для выявления рака [46; 47].

Наиболее перспективным направлением поиска эффективных возможностей ранней диагностики РМЖ является использование панели биомаркеров. В исследовании, объединяющем транскриптомный и протеомный подходы [48] определили профили транскриптома и протеома слюны у больных РМЖ. Было проанализировано 113 образцов слюны, чтобы предоставить биомаркеры для выявления РМЖ. Существенные различия наблюдались в транскриптомном и протеомном профилях слюны между пациентами с РМЖ и контрольной группой. Четыре белка (карбоангидраза VI (CA6), псориазин,

транстиретин и циклофилин А) были подвергнуты проверке с использованием иммуно-блоттинга на обнаруженном наборе образцов. Уровни СА6 и псориазина между раковыми и контрольными образцами показали значительные различия ( $p=0,012$  и  $0,014$  соответственно) [48]. Уровень СА6 слюны показал значительную разницу между РМЖ и здоровой контрольной группой ( $P=0,0017$ ). Интересно, что СА6, который был подтвержден в цитируемом исследовании, также был обнаружен в предыдущем исследовании протеомного профилирования с использованием образцов слюны от пациентов с неинвазивным РМЖ [19], что указывает на потенциал этого биомаркера для раннего выявления РМЖ. Показано, что комбинация восьми транскриптомных биомаркеров - мРНК (CSTA, TPT1, IGF2BP1, GRM1, GRIK1, H6PD, MDM4 и S100A8) и одного протеомного биомаркера (СА6) может быть использована для обнаружения и идентификации РМЖ с высокой точностью (92%), чувствительностью 83% и специфичностью 97% [48]. Результаты цитируемого исследования демонстрируют значительные различия в транскриптомных и протеомных профилях слюны между пациентами с РМЖ и контрольной группой. Представленные авторами результаты подтверждают, что транскриптомные и протеомные сигнатуры в слюне могут служить биомаркерами для неинвазивного выявления рака молочной железы.

Исследования биомаркеров слюны у пациентов с РМЖ были предприняты не только на протеомном и транскриптомном, но и на метаболомном уровне [49], которые позволили идентифицировать 28 метаболитов в слюне пациентов с РМЖ. Хотя значительные различия были обнаружены в нескольких метаболитах среди пациентов и здоровых людей из контрольной группы, ни одно из них не было специфичным для РМЖ. В другом метаболомном исследовании [50] анализировали присутствие полиаминов в слюне пациентов с РМЖ и здоровых людей из контрольной группы. Многочисленные полиамины (SPM, Ac-SPM, N8-Ac-SPD, DA-Ac-SPM, N1-Ac-SPD, DA-Ac-SPD, CAD и Ac-PUT) присутствовали в значительно более высоких концентрациях в группе больных раком по сравнению с контрольной группой, тогда как два полиамины (ORN и PUT) присутствовали в более высоких концентрациях в контрольной группе [50]. Было получено диагностическое уравнение для различения пациентов с РМЖ от пациентов без рака со степенью согласованности 88% в проверочном наборе. Кроме того, авторы определили послеоперационную концентрацию полиаминов в группе рака и разработали дискриминантный

анализ, образованный шестью полиаминами (N8-Ac-SPD, N1-Ac-SPD, CAD, DA-Ac-SPD, PUT, и Ac-PUT) со степенью соответствия 70% между до- и послеоперационными измерениями. Действительно, исчерпывающий анализ показал снижение N1-Ac-SPD и увеличение N8-Ac-SPD. Соотношение N8-Ac-SPD / (N1-Ac-SPD + N8-Ac-SPD) показало почти 80% чувствительность и специфичность, что свидетельствует о его потенциале в качестве показателя состояния здоровья после хирургического лечения [50].

Уровни сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), эпидермального фактора роста (EGF) и карциноэмбрионального антигена (CEA) в слюне больных РМЖ измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) [51]. Авторы установили, что уровни исследуемых веществ ротовой жидкости были значительно повышены у больных РМЖ. Модель логистической регрессии показала, что наилучшей прогностической комбинацией были VEGF и EGF слюны с чувствительностью 83% и специфичностью 74% ( $AUC = 0,84$ ) [51]. Эти результаты позволили сделать вывод, что тестирование слюны - это новое направление для исследования онкомаркеров и заслуживает дальнейших исследований, а такие белковые факторы, как фактор роста эндотелия сосудов, эпидермальный фактор роста и карциноэмбриональный антиген, которые были повышены у пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми субъектами, могут являться возможными биомаркерами для саливадиагностики РМЖ [51].

В недавнем исследовании [52] представили каталог белков слюны, концентрация которых изменилась в результате наличия протоковой карциномы груди. Использование профилей белков слюны может быть использовано в качестве дополнительной модели *in vivo* для изучения прогрессирования РМЖ. Результаты протеомного анализа выявили 233 белка, которые были либо повышены, либо понижены вторично по отношению к наличию карциномы груди. Из 233 белков 142 были активированы, а 91 - подавлены. Было обнаружено, что десять белков слюны, связанных с целостностью генома, являются вариантными (сверхэкспрессированными) при наличии карциномы груди. Восемь из десяти белков были гистонами, а оставшиеся два белка были связаны с поддержанием генома [52]. Из двух вышеупомянутых белков онкоген TLS поддерживает геномную целостность и процессинг мРНК / микроРНК, в то время как другой белок, ядерный антиген пролиферирующих клеток, участвует в репарации ДНК. Оба белка участвуют в прогрессировании РМЖ [53]. Гистон 3.2 присутствует в слюне в профиле

белков и связан с инвазивной карциномой протоковых клеток [54]. Авторы [52] установили, что метаболические белки представляют собой наибольшую из девяти категорий белков слюны, которые изменились в результате наличия РМЖ. Показано, что 56 метаболических белков включают 20 ферментов, 10 ингибиторов ферментов, 10 транспортных белков, 4 белков детоксикации и окислительно-восстановительных белков и 14 белков различных метаболических функций.

В недавнем исследовании [55] оценили концентрацию СА15-3, СЕА, эстрадиола, васпина и обестатина в сыворотке и слюне у женщин с РМЖ и здоровых женщин в качестве сопоставимой контрольной группы. Концентрация эстрадиола в сыворотке и слюне была значительно выше у пациентов с РМЖ, чем у здоровых женщин ( $P < 0,05$ ). Кроме того, сывороточные концентрации СЕА и обестатина в слюне были значительно выше у пациентов с РМЖ, чем в контрольной группе ( $P < 0,05$ ). Выявлена положительная корреляция между концентрациями СА15-3 в сыворотке и слюне, а также отрицательная корреляция между концентрациями васпина и обестатина в сыворотке и слюне [55]. Результаты этого исследования показали, что концентрации СЕА и эстрадиола в сыворотке крови, обестатина в сыворотке и слюне и эстрадиола в слюне значительно различались у женщин с РМЖ и здоровых женщин.

Раннее обнаружение РМЖ может облегчить лечение и улучшить выживаемость пациентов. Обычный скрининг (физикальное обследование и маммография) имеет недостаточную чувствительность и специфичность [5]. Актуальной задачей является поиск высокочувствительных и специфичных биомаркеров РМЖ для скрининга, диагностики доклинических форм заболевания, оценки эффективности проводимой терапии, уменьшения риска возникновения рецидивов и метастазов. Использование единственного биомаркера для диагностики, прогноза или лечения рака, несомненно, упрощает процедуру, однако часто недостаточно информативно. Одно из возможных решений – одновременное использование пула биомаркеров для достижения желаемой цели. По нашему мнению, перспективным и актуальным направлением в онкологии представляется поиск новых констелляций биомаркеров РМЖ путем параллельного исследования крови и слюны и разработке на этой основе эффективных тактик скрининговых и ранних диагностических исследований. Следовательно, изучение и описание особенностей констелляций исследуемых биохимических и генетических показателей крови и слюны при РМЖ представляет не только научную, но и практическую

ценность для совершенствования лабораторных методов диагностики этого заболевания. Полагают, что исследование слюны на опухолевые маркеры не заменит стандартный скрининговый физикальный осмотр и маммографию. Тем не менее новый подход с использованием саливадиагностики может потенциально улучшить способность выявлять РМЖ на ранней стадии, когда он еще излечим [56]. Саливадиагностика РМЖ находится на начальном этапе своего становления и поэтому необходимы дополнительные исследования и дополнительные усилия для преодоления множества препятствий на этом пути. Тем не менее, перспективность этого подхода в онкомаммологии очевидна. Многие фундаментальные и клинические исследования дополняют существующие представления о возможностях скрининга и диагностики РМЖ и одновременно создают дополнительную диагностическую платформу, которая будет включать информативную констелляцию лабораторных методов тестирования слюны и крови для более точного, безболезненного и экономичного выявления этого опасного и очень распространенного заболевания по сравнению с лучшими современными диагностическими подходами.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Narod, S., Iqbal, J. and Miller A. B. Why Have Breast Cancer Mortality Rates Declined? *Journal of Cancer Policy*, 2015;5:8-17. doi: 10.1016/j.jcpo.2015.03.002.
3. Arellano M., Jiang J., Zhou X., Zhang L., Ye H., Wong D. T. and Hu S: Current advances in identification of cancer biomarkers in Saliva. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2009;1:296–303.
4. Giuliano A. E., Connolly J. L., Edge S. B., Mittendorf E.A., Rugo H. S., Solin L. J., Weaver D. L., Winchester D. J., Hortobagyi G. N. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jul 8;67(4):290-303. doi:10.3322/caac.21393.
5. Berg W. A., Gutierrez L, NessAiver M. S., Carter W. B., Bhargavan M., Lewis R. S., Ioffe O. B. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging



- in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology*. 2004 Dec;233(3):830-49. doi: 10.1148/radiol.2333031484.
6. Zhang Y. J., Wei L., Li J., Zheng Y. Q., Li X. R. Status quo and development trend of breast biopsy technology. *Gland Surg*. 2013;2(1):15-24. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2013.02.01.
7. Sturgeon C. M., Duffy M. J., Stenman U. H., Lilja H., Brünner N., Chan D. W. National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem*. 2008;54(12):e11-79. doi: 10.1373/clinchem.2008.105601.
8. Rapado-González Ó., Majem B., Muínelo-Romay L., López-López R., Suarez-Cunqueiro M. M. Cancer Salivary Biomarkers for Tumours Distant to the Oral Cavity. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 12;17(9):1531. doi:10.3390/ijms17091531.
9. Kaczor-Urbanowicz K. E., Wei F., Rao S. L., Kim J., Shin H., Cheng J., Tu M., Wong D.T.W., Kim Y. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Aug;1872(1):49-59. doi:10.1016/j.bbcan.2019.05.007.
10. Navarro M. A., Mesía R., Díez-Gibert O., Rueda A., Ojeda B., Alonso M. C. Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast cancer patients in follow-up compared with healthy women. *Breast Cancer Res Treat*. 1997 Jan;42(1):83-6. doi:10.1023/a:1005755928831.
11. Streckfus C., Bigler L, Dellinger T., Pfeifer M., Rose A., Thigpen J. T. CA 15-3 и c-erbB-2 присутствуют в слюне женщин. *Clin Oral Investig*. 1999;3(3):138-43. doi:10.1007 / s007840050092.
12. Gam L.-H. Breast cancer and protein biomarkers. *World J. Exp. Med*. 2012;2:86–91. doi: 10.5493/wjem.v2.i5.86.
13. Kabel A. M. Tumor markers of breast cancer: New prospectives. *J. Oncol. Sci*. 2017;3:5–11. doi:10.1016/j.jons.2017.01.001.
14. Herbst R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 Suppl):21-6. doi: 10.1016/j.ijrobp.2003.11.041.
15. Kjaer I. M., Bechmann T., Brandslund I., Madsen J. S. Prognostic and predictive value of EGFR and EGFR-ligands in blood of breast cancer patients: a systematic review. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Apr 25;56(5):688-701. doi:10.1515/cclm-2017-0592.
16. Ludovini V., Gori S., Colozza M., Pistola L., Rulli E., Floriani I., Pacifico E., Tofanetti F.R., Sidoni A., Basurto C., et al. Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: Correlation with clinicopathological parameters and survival. *Ann. Oncol*. 2008;19:883–890. doi:10.1093/annonc/mdm585.
17. Streckfus C., Bigler L., Tucci M., Thigpen J. T. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Invest*. 2000;18(2):101-9. doi:10.3109/07357900009038240.
18. Bigler LR, Streckfus CF, Copeland L, Burns R, Dai X, Kuhn M, Martin P, Bigler SA. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2002 Aug;31(7):421-31. doi:10.1034/j.1600-0714.2002.00123.x.
19. Streckfus CF, Mayorga-Wark O, Arreola D, Edwards C, Bigler L, Dubinsky WP. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Invest*. 2008 Mar;26(2):159-67. doi: 10.1080/07357900701783883.
20. Streckfus C. F., Storthz K. A., Bigler L., Dubinsky W. P. A Comparison of the Proteomic Expression in Pooled Saliva Specimens from Individuals Diagnosed with Ductal Carcinoma of the Breast with and without Lymph Node Involvement. *J Oncol*. 2009;2009:737619. doi:10.1155/2009/737619.
21. Streckfus C. F., Arreola D., Edwards C., Bigler L. Salivary Protein Profiles among HER2/neu-Receptor-Positive and -Negative Breast Cancer Patients: Support for Using Salivary Protein Profiles for Modeling Breast Cancer Progression. *J Oncol*. 2012;2012:413256. doi: 10.1155/2012/413256.
22. Agha-Hosseini F., Mirzaii-Dizgah I., Rahimi A. Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Oct 1;14(10):e521-4. doi:10.4317/medoral.14.e521.
23. Laidi F, Bouziane A, Lakhdar A, Khabouze S, Amrani M, Rhrab B, Zaoui F. Significant correlation between salivary and serum Ca 15-3 in healthy women and breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4659-62. doi:10.7314/apjcp.2014.15.11.4659.
24. Streckfus C. F., Bigler L., Edwards C., Guajardo-Streckfus C., Bigler S.A. (2015) Using Saliva Secretions to Model Disease Progression. In: Streckfus C. (eds) *Advances in Salivary Diagnostics*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-45399-5\_9
25. Assad D. X., Mascarenhas E. C., Normando A. C., Chardin H., Barra, G. B., Pratesi, R. ... Guerra, E. N. (2020). Correlation between salivary and serum CA15 3 concentrations in patients with breast cancer. *Molecular and Clinical Oncology*. 2020;13:155-161. doi.org/10.3892/mco.2020.2062.

26. Assad D. X., Mascarenhas E.C.P., de Lima, C. L. Salivary metabolites to detect patients with cancer: a systematic review. *Int J Clin Oncol*. 2020;25:1016–1036. doi.org/10.1007/s10147-020-01660-7.
27. van der Groep P., van der Wall E., van Diest P. J. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Apr;34(2):71-88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.
28. Rylander-Rudqvist T., Håkansson N., Tybring G., Wolk A. Quality and quantity of saliva DNA obtained from the self-administrated oragene method--a pilot study on the cohort of Swedish men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(9):1742-5. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0706.
29. Abraham J. E., Maranian M. J., Spiteri I., Russell R., Ingle S., Luccarini C., Earl H. M., Pharoah P. P., Dunning A. M., Caldas C. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Med Genomics*. 2012 May 30;5:19. doi:10.1186/1755-8794-5-19.
30. Hu Y., Ehli E. A., Nelson K., Bohlen K., Lynch C., Huizenga P., Kittlesrud J., Soundy T. J., Davies G. E. Genotyping performance between saliva and blood-derived genomic DNAs on the DMET array: a comparison. *PLoS One*. 2012;7(3):e33968. doi: 10.1371/journal.pone.0033968.
31. Meghnani V., Mohammed N., Giauque C., Nahire R., David T. Performance Characterization and Validation of Saliva as an Alternative Specimen Source for Detecting Hereditary Breast Cancer Mutations by Next Generation Sequencing. *Int J Genomics*. 2016;2016:2059041. doi:10.1155/2016/2059041.
32. Bae I., Fan S., Meng Q., Rih J. K., Kim H. J., Kang H. J., Xu J., Goldberg I. D., Jaiswal A. K., Rosen E. M. BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. *Cancer Res*. 2004;64(21):7893-909. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1119.
33. Zelko I. N., Mariani T. J., Folz R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337-49. doi:10.1016/s0891-5849(02)00905-x.
34. Rajneesh C. P., Manimaran A., Sasikala K. R., Adaikappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J*. 2008 Aug;49(8):640-3.
35. Sawczuk B., Maciejczyk, M., Sawczuk-Siemieniuk M., Posmyk R., Zalewska A., Car H. Salivary Gland Function, Antioxidant Defence and Oxidative Damage in the Saliva of Patients with Breast Cancer: Does the BRCA1 Mutation Disturb the Salivary Redox Profile? *Cancers* 2019;11:1501.
36. Cheng F., Wang Z., Huang Y., Duan Y., Wang X. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2015 Jul 20;447:23-31. doi: 10.1016/j.cca.2015.05.008.
37. Bentata M., Morgenstern G., Nevo Y., Kay G., Granit Mizrahi A., Temper M., Maimon O., Monas L., Basheer R., Ben-Hur A., Peretz T., Salton M. Splicing Factor Transcript Abundance in Saliva as a Diagnostic Tool for Breast Cancer. *Genes (Basel)*. 2020 Aug 3;11(8):880. doi:10.3390/genes11080880.
38. Han Y., Jia L., Zheng Y., Li W. Salivary Exosomes: Emerging Roles in Systemic Disease. *Int. J. Biol. Sci*. 2018;14:633–643. doi: 10.7150/ijbs.25018.
39. Kahlert C., Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(4):431-7. doi:10.1007/s00109-013-1020-6.
40. Ogawa Y., Kanai-Azuma M., Akimoto Y., Kawakami H., Yanoshita R. Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull*. 2008 Jun;31(6):1059-62. doi:10.1248/bpb.31.1059.
41. Lau C., Kim Y., Chia D., Spielmann N., Eibl G., Elashoff D., Wei F., Lin Y. L., Moro A., Grogan T., Chiang S., Feinstein E., Schafer C., Farrell J., Wong D. T. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. *J Biol Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26888-97. doi:10.1074/jbc.M113.452458.
42. Dreyer F., Baur A. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol*. 2016;1448:201-16. doi:10.1007/978-1-4939-3753-0\_15.
43. Joyce D. P., Kerin M. J., Dwyer R. M. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2016 Oct 1;139(7):1443-8. doi: 10.1002/ijc.30179.
44. He L., Thomson J. M., Hemann M. T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S. W., Hannon G. J., Hammond S. M. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):828-33. doi: 10.1038/nature03552.
45. Schrijver W. A., van Diest P. J. Dutch Distant Breast Cancer Metastases Consortium, Moelans CB. Unravelling site-specific breast cancer metastasis: a microRNA expression profiling study. *Oncotarget*. 2017 Jan 10;8(2):3111-3123. doi:10.18632/oncotarget.13623.
46. Igaz I., Igaz P. Diagnostic Relevance of microRNAs in Other Body Fluids Including Urine,

УДК 616.006.6:615.37

DOI: 10.37279/2224-6444-2021-11-2-115-122

**GENOMIC SCIENCE-BASED PERSONALIZED TREATMENT FOR CANCER****Varghese Jeffy Vianneys<sup>1</sup>, Sorokina L. E.<sup>2</sup>, Rebik A. A.<sup>2</sup>, Regan O. V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of General and Clinical Pathophysiology, <sup>2</sup>Central Research Laboratory, Medical Academy named after S. I. Georgievsky of V. I. Vernadsky Crimean Federal University (Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU), 295051, 5/7, Lenin Avenue, Simferopol, Russia

**For correspondence:** Sorokina L.E., Central Research Laboratory of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: leya.sorokina@mail.ru

**Для корреспонденции:** Сорокина Л. Е., Центральная научно-исследовательская лаборатория, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: leya.sorokina@mail.ru

**Information about authors:**

**Varghese Jeffy Vianneys**, <http://orcid.org/0000-0002-2197-8230>

**Sorokina L. E.**, <http://orcid.org/0000-0002-1862-6816>

**Rebik A. A.**, <https://orcid.org/0000-0001-5346-3998>

**Regan O. V.**, <https://orcid.org/0000-0001-9839-0761>

**SUMMARY**

At present, cancer is a rising dreadful issue all around the world, as it is among one of the main leading causes for mortality globally. Recent improvements in genetic engineering called genome sequencing provides a different approach in the treatment of cancer. Genome sequencing is a technique used for determining the complete composition of the DNA sequence of a genome. The cancer genomic project and the cancer genome atlas are initiatives taken by different countries to analyze and store the genomic sequence variations of different tumor cells from a diverse population. Sequencing malignant cells have pointed the unique abnormalities like mutations in the genes, which shows the exact cause for the uncontrolled cell division in many types of malignancies. We discuss the recent effective method called next-generation sequencing which has the ability to sequence DNA molecules in thousands, simultaneously, rapidly, and cost-effectively. NGS can detect all types of mutations and chromosomal abnormalities. This information provides a detailed and improved understanding of different types and subtypes of cancer from their molecular basis. The process includes sequencing of both tumor and normal genome from the same individual, and then are examined and verified. This data is used to provide a personalized treatment routine for that specific patient which can improve their prognosis. The various challenges and limitations of NGS which are hindering the advancement and the probability of using it in clinical oncology are also discussed which include ethical problems and abundant data generated causing an issue in data analysis. We outline the recent promising developments in implementing genomic science in the personal and targeted treatment of cancer for better prognosis and plausible cure for malignancy in the near future.

**Key words:** genome sequencing; cancer; personalized treatment; next-generation sequencing.

**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ РАКА – ДОСТИЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ****Варгхесе Джеффи Вианнейс<sup>1</sup>, Сорокина Л. Е.<sup>2</sup>, Ребик А. А.<sup>2</sup>, Реган О. В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Кафедра общей и клинической патофизиологии, <sup>2</sup>Центральная научно-исследовательская лаборатория, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Россия

**РЕЗЮМЕ**

В настоящее время злокачественные новообразования являются одной из основных причин смертности во всем мире, причем в последние годы наблюдается тенденция к росту заболеваемости, что представляет собой серьезную проблему. Современные достижения генной инженерии, такие как секвенирование генома, обеспечивают инновационный подход к лечению рака и представляют значительный практический и научный интерес. Секвенирование – метод, используемый для определения полного состава последовательности ДНК генома. Проекты «Cancer genomic project» и «Cancer genome atlas» – инициативы, предпринятые странами для анализа и хранения вариаций геномных последовательностей различных опухолевых клеток из разных популяций. Секвенирование злокачественных клеток выявило уникальные аномалии, которые позволили установить точную причину неконтролируемого деления клеток при многих типах злокачественных новообразований. В статье обсуждается современный эффективный диагностический метод, называемый секвенированием следующего поколения (next-generation sequencing – NGS), который позволяет упорядочивать тысячи молекул ДНК одновременно, выполнять анализ быстро и экономично. NGS может обнаруживать все типы мутаций и хромосомных аномалий, а эта информация обеспечивает подробное и улучшенное понимание патогенеза различных типов и подтипов рака на их молекулярной основе. NGS включает в себя секвенирование как опухолевого, так и нормального генома пациента, а затем анализ и сопоставление полученных данных. Результаты используются для составления персонализированного плана лечения конкретного пациента, который может улучшить прогноз. В статье представлены недавние многообещающие разработки в области применения NGS в таргетной терапии рака, обеспечивающие лучший прогноз при злокачественных новообразованиях.

**Ключевые слова:** секвенирование генома; рак; персонализированная таргетная терапия; секвенирование нового поколения.

Cancer is always considered to be a disease without a satisfactory prognosis due to the various peculiarities among different types and also individually. The GLOBOCAN 2020's report on the incidence of 36 types of cancer in 185 countries worldwide, estimated 19.3 million new cases of cancer. The international agency for research on cancer, produced a report on the mortality due to cancer globally in 2020 with almost 10 million deaths due to the mentioned [1].

It is also established that the new cases of cancer are most likely to increase in the upcoming decades mainly due to new mutations, smoking, and an unhealthy diet.

The major developed countries seem to be having high rates of new cancer cases like prostate and breast cancer in men and women respectively and lung cancer plays an important part in increasing the mortality rate. An observatory study in the United States of America concluded the transition from cardiovascular diseases to cancer as the leading cause of death in 41% of countries in 2015, which increased from 21% of countries in 2003 [2]. This shift from heart pathology to cancer is increased mostly in high-income countries.

The major complication of type 2 diabetes leading to death mostly directs to cardiovascular complications and stroke, but the following research says different. The Ayrshire Diabetes follow-up cohort study conducted a population-based study among the Scottish type-2 diabetes patients to determine the primary reason for their mortality between the years 2009 and 2014. The results illustrated cancer, accounting for almost 27.8% of it, making cancer the most common cause of mortality, then only followed by heart diseases at 24.1% [3].

A recent study estimated a significant increase in cancer incidence among adolescents and young adults, and also that it would increase in the upcoming years according to its survey [4].

Proper understanding of any specific cancer about its exact etiology and pathogenesis will give a clear picture and a path for a better prognosis. It can be achieved by the technique called genome sequencing, which is the process involved in determining the entire DNA sequence of a genome. Particularly the recent most reliable platform under genome sequencing known as next-generation sequencing (NGS), which can even sequence in a day the entire genome of a human being [5]. It provides a promising platform in genetic engineering to produce specific personalized treatment regimen for the exact needs of cancer patients which will improve the prognosis and lead to a better life.

#### **Genome sequencing**

Genome is the part of DNA that contains the genetic information needed for survival, and

the whole genome sequencing goes through all the necessary sections of the person's genetic information. Whereas the exome is the part of the genome, exactly where the sections of genome contain instructions for protein synthesis.

Exome sequencing test is a more focused technique to find the genetic variations that cause the disease. Genome sequencing is used for many reasons, some of them being, diagnostics- to confirm whether the pathology is caused due to a genetic condition; predictive- to find the probability of chances to inherit a specific genetic disorder in a fetus with the disorder running in the family; carrier screening- to check for the presence of any mutations causing them to be a heterogenous carrier of a dominant disease, which may be a risk factor for passing the disorder to the child; or maybe just to find and understand the ancestry and common traits, mainly used in paternal or maternal identification. The variations found in the genome sequencing are the alterations in the DNA sequence which differ from the nucleotide sequence of most people, which may or may not indicate any previously discovered genetic disorder. But in most cases, the mutations or variations are unspecific and do not direct to a particular disorder, in this case, these data are stored in a common system which will have much information like this sort of data from different patients and they could be matched to find similar mutations or variations in the DNA sequence and lead to the accurate finding of a new genetic linked pathology.

Genetic variations even under a particular subtype of malignancy could be displayed in a vast variety of either point mutation, deletion, inversion, insertion or even translocation in different patients' presentation of the disease. Acute promyelocytic leukemia is proven in a study to be presented in different variety of mutations which has also been presented with a similar morphological presentation, clinical manifestations and course. In the study APL was seen to be associated with diverse PML-RARA splice variants, absurdly unusual translocations, insertions, multiple RARA fusion partners, and also a RARG fusion partner [6].

From the above study, it is quite evident that the same type of cancer could be presented and as well caused by a totally different genomic modification at the molecular level, even with the same or mostly similar clinical course and presentation of the disease among the diseased. This example is ample to require a call for more personalized therapy requirement, as treating different diseases having different etiology and genetic patterns the same drug will obviously not help much in the improvement of the disease. So, detailed analysis and understanding of the DNA variation will help to

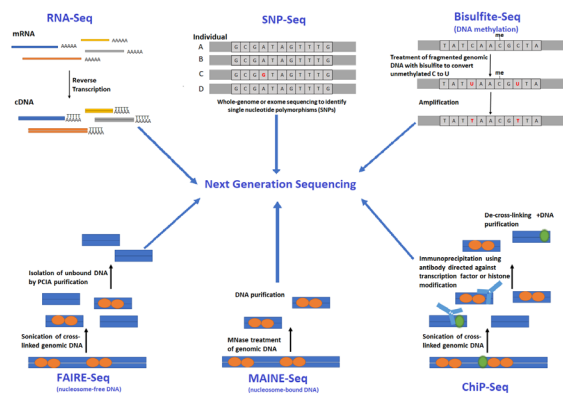
conduct proper drug interaction clinical trials which specifically target the faulty gene.

### Evolution of Genome Sequencing

DNA sequencing was first introduced around 1970 by Sanger and his team workers called as Sanger sequencing [7]. It could easily be called as a beginning of an era in the genetic field as this method paved the way for all the then future next-generation sequencing techniques which all overcome the various limitations of Sanger sequencing by being more time-saving and cost-effective than the previous versions. This old method of sequencing used Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) radiographically to detect the terminated sequences. Since then the genome sequencing has evolved to a better stage by replacing many steps and techniques, some being radiographical sequence method been replaced with using separate fluorescence for different nucleotide.

### Next-Generation Sequencing

Many different companies and laboratories around the world use different methods for sequencing. Here we review about one of the best technologies used by many researchers, doctors, and institutes worldwide, which is the Illumina. They use the technology which was developed by Solexa and Lynx Therapeutics in the beginning called as bridge amplification [8; 9].

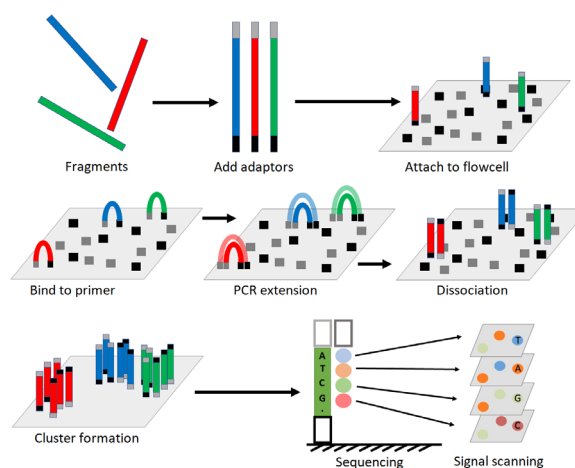


**Figure 1.** Comparison between Sanger sequencing and next-generation sequencing (NGS) technologies. Sanger sequencing is limited to determining the order of one fragment of DNA per reaction, up to a maximum length of ~700 bases. NGS platforms can sequence millions of DNA fragments in parallel in one reaction, yielding enormous amounts of data [8].

### Illumina Sequencing Technology

Massive parallel sequencing with Sequencing by synthesis (SBS) chemistry, is now adapted over wide regions as they detect each single base as they are incorporated into the new strands of DNA as they lengthen gradually.

Method: The Illumina sequencing with SBS is done in 4 steps, namely, sample preparation, cluster generation, sequencing and data analysis. The sample preparation could be done by various different methods. Reduced cycle amplification is widely used, through which additional sites are introduced like the sequencing binding sites and regions which are complementary to those strands are added. During cluster generation, each fragment of the molecule is isothermally amplified and placed in a flow slide which consists of several lanes with two types of oligos. The first fragment of oligo is hybridized and then a polymerase enzyme is used to create the complementary strand of the hybridized fragment. The complementary strand is amplified by the process of 'bridge amplification'. The same procedure is then repeated several times from the thousands and thousands of fragments and they are done in many clusters. The 3' end of the fragment is blocked to avoid any other binding of primers to it. The nucleotides attach and bind to their respective complementary base pairs by competitive binding. After binding, the strand is activated or excited by a fluorescence signal which is emitted. This particular process is known as a sequence by synthesis, where many clusters of the DNA fragments are sequenced in a massively parallel fashion. At last, the data analysis is when all the sequences are read and aligned and it is put together for identification of any abnormalities in the nucleotide sequence like mutations or other disorientations. They use a base space sequence hub to store, analyze and process these data for future use and researches [10].



**Figure 2.** Outline of Illumina genome analyzer sequencing process. (1) Adaptors are annealed to the ends of sequence fragments. (2) Fragments bind to primer-loaded flow cell and bridge PCR reactions amplify each bound fragment to produce clusters of fragments. (3) During each sequencing cycle, one fluorophore attached nucleotide is added to

the growing strands. Laser excites the fluorophores in all the fragments that are being sequenced and an optic scanner collects the signals from each fragment cluster. Then the sequencing terminator is removed and the next sequencing cycle starts [10].

### NSG in the field of oncology for a Personalized treatment regimen

Nearly for the past decade, NSG has been used in oncology mainly to determine the cancer mutations which lead to the unstoppable rapid cellular replication.

Specifically, many new mutations were identified which caused cancer and this information will help to prepare a personalized treatment regimen for the patient. These novel oncogenic mutations were found in a wide spectrum of cancer, which includes lung cancer [11] - small cell carcinoma [12] and large cell carcinoma differentiation [11]; metastatic small-cell gallbladder neuroendocrine carcinoma [13], clear cell renal cell carcinoma [14], prostate cancer [15], breast cancer [16], transitional cell carcinoma of the bladder [17] and also in various types of leukemia [18; 19; 20].

Various studies have shown the specific associations of a particular mutant gene with one or many malignancies. Mutations occurring in the tumor suppressor genes, which due to loss of function leads to increase cancer risk and both the alleles of a tumor suppressor gene must be lost for the expression of disease. Some of the well-known associations of mutant tumor suppressor genes include APC gene mutation with colorectal cancer [21; 22]; BRCA1 and BRCA2 gene mutation with breast cancer [23], ovarian cancer [24] and pancreatic cancer [25]; CDKN2A mutation blocks transmission from G1 to S phase and it is associated with melanoma [26] and

pancreatic cancer [27]; DCC mutation is associated with colon cancer [28]; SMAD4 (DPC4) mutation with pancreatic cancer [29]; MEN1 mutation with multiple endocrine neoplasia type 1 [30]; mutant NF1 is connected with neurofibromatosis type 1 [31]; mutant NF2 associated with neurofibromatosis type 2 [32]; PTEN mutation which is the gene of negative regulator of PI3k/AKT pathway, associated with prostate cancer [33], breast cancer [34] and endometrial cancer [35]; Rb mutation inhibits E2F and blocks transition from G1 to S1 phase, connected to malignancies like retinoblastoma [36] and osteosarcoma [37]; mutation on TP53 can cause a wide range of cancers [38], mostly all the human cancer types could be developed, but particularly Li-Fraumeni syndrome- multiple malignancies at an early age (SBLA cancer syndrome: sarcoma, breast cancer, leukemia, adrenal gland cancer) [39]; mutant TSC1 and TSC2 producing hamartin protein and tuberlin protein respectively causes tuberous sclerosis [40]; mutant VHL gene which normally inhibits hypoxia-inducible factor 1a is associated with von Hippel-Lindau disease [41]; WT1 mutation is associated with Wilms tumor (neuroblastoma) [42]

The data obtained by sequencing the DNA of different tumors can serve as a basis for the creation of new molecular-oriented drugs. When a common mutation is identified and its significance for tumor progression is proven, it is possible to create, synthetically or biotechnologically, a drug that interacts with the corresponding mutated protein and blocks its action. Table 1 shows some of the targets set up in this way and the molecular-oriented drugs designed to target these targets, already approved for use or in clinical trials.

Table 1

### Targets for the creation of new molecular-associated drugs, selected based on DNA sequencing

Targets	Drugs
FGFR (fibroblast growth factor receptor)	Erdafinitib
CDK4 / 6 (cyclin dependent kinases 4 and 6)	Palbocinib, ribociclib, abemacyclib
CD19 and CD3 (antigens of the surface membranes of B-lymphocytes and T-cells)	Blinatumemab
DLL3 (small cell lung cancer cell antigens)	Zovalpituzumab tesirin
CCR2 (C-C chemokine receptor 2)	CCX 272

The introduction of the concept of precision tumor therapy into clinical practice may result in a transition to the so-called tumor-type agnostic therapy, in which, when prescribing a drug, one is guided not by anatomical localization or histological type of tumor, but by the presence in it of a drug-specific and common for different tumors biomarker, revealed as a result of genomic research of a tumor of an individual patient. In other words,

within the framework of this concept, it is assumed that indications for the use of the drug will indicate not the type of tumor (for example, NSCLC), but the presence of a certain biomarker, which allows the drug to be used in any tumor if the expression of this marker is detected in it [43].

In the past year, this new concept of cancer drug therapy has come to fruition with FDA approval for new indications for previously approved drugs.

The immunotherapy drug pembrolizumab, originally approved for the treatment of melanoma and NSCLC patients, has been accelerated by the FDA for the treatment of any tumors that exhibit high levels of microsatellite instability (MCH) or a defect in the mismatch repair (MMR) system responsible for the recognition and removal of mismatched bases formed as a result of errors in the process of DNA replication [43]. The operation of this system is regulated by the expression of 6 genes (MSH2, MLH1, PMS2, MSH3, MSH6, and MLH3), mutations of which lead to a defect in MMR (dMMR), the appearance of a large number of mutations, and the synthesis of non-functional proteins. Breakdowns in the repair system are characterized by the accumulation of large amounts of microsatellites in DNA, which are short nucleotide sequences of 1–5 bases, repeating up to several tens of times.

Microsatellites are also found in normal conditions, but at dMMR their number increases tens to hundreds of times. Tumors with a high MCH are characterized by lymphoid infiltration, a large number of somatic mutations, and increased formation of neoantigens, which can serve as targets for the immune system and enhance the immune response [44].

The classical method for determining MCH is PCR, which amplifies microsatellite repeats in DNA, and the level of genome instability is determined by comparing their length between tumor and normal cells. To diagnose dMMR, an immunohistochemical study is used, when the expression of proteins MSH2, MLH1, PMS2, MSH6 is studied in the tumor. If at least one protein is not stained, deficiency of MMR. In recent years, it has become possible to determine the MCH and dMMR using NGS.

When examining 32 types of tumors with NGS 12019, dMMR was detected in 24 types of tumors, while a dMMR frequency > 2% was recorded in 11 types of tumors (endometrial cancer, cervix, stomach, small intestine, prostate and thyroid gland, bile duct, liver, CRC, uterine sarcoma, neuroendocrine tumors). It was noted that in these tumors dMMR was observed twice as often in stage I – III tumors as compared with stage IV tumors. It is estimated that 60,000 patients are diagnosed with dMMR tumors each year in the United States. It is believed that in these patients, checkpoint inhibitors can be used with effect, including in cases refractory to other therapy [45].

The role of high MCH in the efficacy of pembrolizumab was discovered by chance. In a clinical trial of pembrolizumab, out of 19 patients with CRC, the effect was recorded in only one patient - a complete regression lasting more than

3 years. In a retrospective study of the genome of this tumor, it was found that it has a high level of MCH due to dMMR.

It was hypothesized that since dMMR leads to an increase in somatic mutations, a large number of tumor neoantigens appear in the tumor, which are a target for cytotoxic T lymphocytes, which should lead to the induction of an immune antitumor response. However, in tumors with a high MCH, there is an overexpression of PD-1 and PD-L1, which prevents this. Therefore, the blockade of checkpoint immune points should enhance the efficiency of the immune response to the tumor [44; 46].

This hypothesis was confirmed in a comparative clinical study, which recorded a high efficacy of pembrolizumab in colorectal cancer patients with dMMR, while almost completely ineffective with preserved MMR. Full exome sequencing of DNA revealed 1782 mutations in tumors with dMMR, and 73 in tumors with preserved MMR [46].

D. Le et al. used pembrolizumab in 86 previously treated patients with 12 types of dMMR tumors. An objective effect was registered in 46% of cases, including a complete regression in 21% with a median 2-year survival rate of 53%, while the effectiveness of the drug was practically the same in all types of tumors [45].

In several clinical studies of KET-NOTE, which included a total of 415 previously treated patients with 15 types of different common tumors in 149 immunochemically or and a high MCH or dMMR was detected by PCR. The use of pembrolizumab in these patients resulted in complete or partial regression in 39.6% of patients (complete regression in 7.4%). In 78% of cases, remissions lasted more than 6 months. These studies also show that the frequency of the objective effect was practically the same in tumors of different types [43; 44].

The results of these studies have served as the basis for the approval of the use of pembrolizumab in any solid tumor (both adults and children) with a high MCH or dMMR. For the first time in history, the indication for the use of the drug was not a tumor of a certain localization, but the presence of a biomarker. Moreover, this is the first time that a drug has been approved for use without data from randomized clinical trials, including in children [43; 47].

Somewhat later, the use of another immunotherapeutic drug, nivolumab, was approved for the treatment of colorectal cancer when these markers are registered in the tumor. The use of nivolumab in patients with CRC with high MCH or dMMR and progression after previous chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin, irinotecan was effective in 28% of cases. The results

of this study allowed the FDA to authorize the use of nivolumab in the progression of colorectal cancer when these markers are found in tumors [43].

The results of various studies have given grounds to consider MCH and dMMR as reliable predictors of the effectiveness of checkpoint inhibitors [46]. It is believed that the use of the concept of tumor type-agnostic therapy will provide an opportunity for effective treatment in patients with rare tumors.

It should be noted, however, that the frequency of dMMR varies greatly in different types of tumors. MCH is found in more than 10% of cases in thyroid cancer, endometrial cancer, stomach cancer, colorectal cancer, hepatocellular cancer, melanoma. In other tumors, MSI is much less common (for example, in renal cell carcinoma and head-neck cancer in 2-3%, in breast cancer, in lung cancer even less often). There is evidence that the level of MCH and dMMR in the tissue of metastases is lower than in the primary tumor [44; 46].

The tumor type-agnostic concept began to be applied not only to change indications for already existing drugs, but also in the clinical study of new targeted drugs. An example is the drug larotrectinib (LOXO-1), which has a fusion protein (NTRK) as a target, which is formed by fusion of the tropomyosin receptor kinase (Trk) gene with other genes (ETV6, LMNA, TPM3). It was found that this protein induces cell proliferation by activating signaling pathways. Such a genetic disorder develops in 0.5–1% of the most common malignant neoplasms, but is typical for some rare oncopathologies: salivary gland cancer, childhood fibrosarcoma, and juvenile breast cancer [47].

Interest in the drug appeared after the report on the results of the use of larotrectinib in 41-year-olds D.B. Cormanher patient with metastases of soft tissue sarcoma in the lungs. Oral administration of larotrectinib led to a rapid complete tumor regression (a decrease in tumor size was recorded after the 1st cycle of taking the drug, complete regression after the 4th cycle).

At the ASCO Congress in 2017, the first results of a clinical study of larotrectinib were reported in patients with various tumors, in which the presence of the NTRK fusion protein was proven by different methods. The study included 55 patients (aged 4 months - 76 years) with 17 types of tumors. An objective effect was observed in 76% of cases in 12 types of tumors [43, 45]. In October 2018, the FDA approved the use of the drug for any tumors in the presence of the Trk / ETV6 fusion gene, LMNA, TPM3, or NTRK fusion protein in the tumor.

Another example is studies that investigated the efficacy of fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitors in various tumors with FGFR2 / 3 confluent protein. A positive effect was recorded in

various tumors - cholangiocellular cancer, bladder cancer and gliomas [48].

## CONCLUSION

Personalized therapy will be more valuable and effective to patients battling cancer, as it is a pathology that presents with a vast variability among different individuals. Gene sequencing technique allows researchers and physicians to initiate bench to bedside implementations to diagnose, for prognosis, and treat cancer more effectively compared to the standard methods [49]. Every research dedicated to the improvisation of cancer treatment takes us one step forward to a cure in the near future.

**Conflict of interest.** The authors have no conflict of interests to declare.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № ФЗЭГ-2020-0060 в области научных исследований по теме «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с использованием клеточно-генетических технологий». и частично поддержан VI Программа развития Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского на 2015 - 2024 гг.

**Funding.** This work was financially supported by state task No FZEG-2020-0060 of the Russian Ministry of Science in the field of scientific research on the topic “Algorithms for molecular genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies” and partially supported by the V.I. Vernadsky Crimean Federal University Development Program for 2015 – 2024.

## REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M, Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
2. Hastings K. G., Boothroyd D. B., Kappahn K., Hu J., Rehkopf D. H., Cullen M. R., Palaniappan L. Socioeconomic Differences in the Epidemiologic Transition From Heart Disease to Cancer as the Leading Cause of Death in the United States, 2003 to 2015: An Observational Study. *Ann Intern Med.* 2018 Dec 18;169(12):836-844. doi:10.7326/M17-0796.



3. Collier A., Meney C., Hair M., Cameron L., Boyle J. G. Cancer has overtaken cardiovascular disease as the commonest cause of death in Scottish type 2 diabetes patients: A population-based study (The Ayrshire Diabetes Follow-up Cohort study). *J Diabetes Investig.* 2020;11(1):55-61. doi:10.1111/jdi.13067.
4. Gupta S., Harper A., Ruan Y., Barr R., Frazier A. L., Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Fidler-Benaoudia M. M. International Trends in the Incidence of Cancer Among Adolescents and Young Adults. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(11):1105-1117. doi:10.1093/jnci/djaa007.
5. Behjati S., Tarpey P. S. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8. doi:10.1136/archdischild-2013-304340.
6. Welch J. S., Westervelt P., Ding L. Use of Whole-Genome Sequencing to Diagnose a Cryptic Fusion Oncogene. *JAMA.* 2011;305(15):1577-1584. doi:10.1001/jama.2011.497
7. Tipu H. N., Shabbir A. Evolution of DNA sequencing. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2015 Mar;25(3):210-5.
8. Bunnik E. M., Le Roch K. G. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(9):490-498. doi:10.1089/wound.2012.0379.
9. Slatko B. E., Gardner A. F., Ausubel F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59. doi:10.1002/cpmb.59.
10. Lu Yn., Shen Y., Warren W., Walter R. Next Generation Sequencing in Aquatic Models. 2016. doi:10.5772/61657.
11. Rekhtman N., Pietanza M. C., Hellmann M. D., Naidoo J. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma-like and Non-Small Cell Carcinoma-like Subsets. *Clin Cancer Res.* 2016;22(14):3618-29. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15- 2946.
12. McFadden D. G., Papagiannakopoulos T., Taylor-Weiner A. Genetic and clonal dissection of murine small cell lung carcinoma progression by genome sequencing. *Cell.* 2014;156(6):1298-1311. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.031.
13. Li M., Liu F., Zhang Y., Wu X. Whole-genome sequencing reveals the mutational landscape of metastatic small-cell gallbladder neuroendocrine carcinoma (GB-SCNEC). *Cancer Lett.* 2017;391:20-27. doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.027.
14. Meng H., Jiang X., Cui J., Yin G., Shi B., Liu Q., Xuan H., Wang Y. Genomic Analysis Reveals Novel Specific Metastatic Mutations in Chinese Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2020;2020:2495157. doi: 10.1155/2020/2495157.
15. Liang C., Niu L., Xiao Z., Zheng C., Shen Y., Shi Y., Han X. Whole-genome sequencing of prostate cancer reveals novel mutation-driven processes and molecular subgroups. *Life Sci.* 2020;254:117218. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117218.
16. Chang Y. S., Chang C. M., Lin C. Y., Chao D. S., Huang H. Y., Chang J. G. Pathway Mutations in Breast Cancer Using Whole-Exome Sequencing. *Oncol Res.* 2020;28(2):107-116. doi: 10.3727/0965 04019X15698362825407.
17. Pan H., Xu X., Wu D., Qiu Q., Zhou S., He X., Zhou Y., Qu P., Hou J., He J., Zhou J. Novel somatic mutations identified by whole-exome sequencing in muscle- invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Lett.* 2016;11(2):1486-1492. doi: 10.3892/ol.2016.4094.
18. Kiel M. J., Velusamy T., Rolland D. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;124(9):1460-72. doi: 10.1182/blood-2014-03-559542.
19. Ding L., Ley T. J., Larson D. E. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506-10. doi: 10.1038/nature10738.
20. Mosquera Orgueira A., Rodríguez Antelo B., Díaz Arias J. Á., Díaz Varela N., Alonso Vence N., González Pérez M. S., Bello López J. L. Novel Mutation Hotspots within Non-Coding Regulatory Regions of the Chronic Lymphocytic Leukemia Genome. *Sci Rep.* 2020;10(1):2407. doi: 10.1038/s41598-020-59243-5.
21. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(7):867-71. doi: 10.1016/s0959-8049(02)00040-0.
22. Ying R., Wei Z., Mei Y., Chen S., Zhu L. APC gene 3'UTR SNPs and interactions with environmental factors are correlated with risk of colorectal cancer in Chinese Han population. *Biosci Rep.* 2020 Mar 27;40(3):BSR20192429. doi: 10.1042/BSR20192429.
23. Mahdavi M., Nassiri M., Kooshyar M. M., Vakili-Azghandi M., Avan A., Sandry R., Pillai S., Lam A. K., Gopalan V. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5741-5750. doi: 10.1002/jcp.27464.
24. Moschetta M., George A., Kaye S. B., Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1449-55. doi: 10.1093/annonc/mdw142.
25. Kowalewski A., Szyłberg Ł, Saganek M., Napiontek W., Antosik P., Grzanka D. Emerging strategies in BRCA-positive pancreatic cancer. *J*

- Cancer Res Clin Oncol. 2016;144(8):1503-1507. doi:10.1007/s00432-018-2666-9.
26. Leachman S. A., Lucero O. M., Sampson J. E., Cassidy P., Bruno W., Queirolo P., Ghiorzo P. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(1):77-90. doi: 10.1007/s10555-017-9661-5.
27. Zhen D. B., Rabe K. G., Gallinger S. BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study. *Genet Med.* 2015;17(7):569-77. doi: 10.1038/gim.2014.153.
28. Gotley D. C., Reeder J. A., Fawcett J., Walsh M. D., Bates P., Simmons D. L., Antalis T. M. The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene.* 1996;13(4):787-95. PMID: 8761300.
29. Wang F., Xia X., Yang C., Shen J., Mai J., Kim H. C., Kirui D., Kang Y., Fleming J. B., Koay E. J., Mitra S., Ferrari M., Shen H. SMAD4 Gene Mutation Renders Pancreatic Cancer Resistance to Radiotherapy through Promotion of Autophagy. *Clin Cancer Res.* 2018;24(13):3176-3185. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3435.
30. Carroll R. W. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Asia Pac J Clin Oncol.* 2013;9(4):297-309. doi: 10.1111/ajco.12046.
31. Kang E., Kim Y. M., Seo G. H. Phenotype categorization of neurofibromatosis type I and correlation to NF1 mutation types. *J Hum Genet.* 2020;65(2):79-89. doi: 10.1038/s10038-019-0695-0.
32. Asthagiri A. R., Parry D. M., Butman J. A., Kim H. J., Tsilou E. T., Zhuang Z., Lonser R. R. Neurofibromatosis type 2. *Lancet.* 2009;373(9679):1974-86. doi:10.1016/S0140-6736(09)60259-2.
33. Wise H. M., Hermida M. A., Leslie N. R. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(3):197-210. doi: 10.1042/CS20160026.
34. Ngeow J., Sesock K., Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165(1):1-8. doi: 10.1007/s10549-015-3665-z.
35. Bian X., Gao J., Luo F., Rui C., Zheng T., Wang D., Wang Y., Roberts T. M., Liu P., Zhao J. J., Cheng H. PTEN deficiency sensitizes endometrioid endometrial cancer to compound PARP-PI3K inhibition but not PARP inhibition as monotherapy. *Oncogene.* 2018;37(3):341-351. doi: 10.1038/onc.2017.326.
36. Mendoza P. R., Grossniklaus H. E. The Biology of Retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:503-16. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.012.
37. Czarnecka A. M., Synoradzki K., Firlej W., Bartnik E., Sobczuk P., Fiedorowicz M., Grieb P., Rutkowski P. Molecular Biology of Osteosarcoma. *Cancers (Basel).* 2020;12(8):2130. doi: 10.3390/cancers12082130.
38. Leroy B., Anderson M., Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat.* 2014;35(6):672-88. doi: 10.1002/humu.22552.
39. Guha T., Malkin D. Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(4):a026187. doi: 10.1101/cshperspect.a026187.
40. Salussolia C. L., Klonowska K., Kwiatkowski D. J., Sahin M. Genetic Etiologies, Diagnosis, and Treatment of Tuberous Sclerosis Complex. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019;20:217-240. doi: 10.1146/annurev-genom-083118-015354.
41. Lenglet M., Robriquet F., Schwarz K. Identification of a new VHL exon and complex splicing alterations in familial erythrocytosis or von Hippel-Lindau disease. *Blood.* 2018;132(5):469-483. doi: 10.1182/blood-2018-03-838235.
42. Valind A., Wessman S., Pal N., Karlsson J., Jonson T., Sandstedt B., Gisselsson D. Convergent evolution of 11p allelic loss in multifocal Wilms tumors arising in WT1 mutation carriers. *Pediatr Blood Cancer.* 2018 Nov;65(11):e27301. doi: 10.1002/pbc.27301.
43. Le D. T., Durham J. N., Smith K. N., Wang H., Barlett B., Aulakh L. K., Lu S., Kemberling H., Wilt C., Luber B. S., Wong F., Azaf N. S., Rucki A. A. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017; 357: 409-413.
44. Lemery S., Keegan P., Pazdur R. Feist FDA approval agnostic of cancer site – when a biomarker defines the indication. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(15): 1409-1412. doi: 10.1056/NEJMp1709960.
45. Garber K. In a major shift, cancer drugs go «tissue-agnostic». *Science.* 2017; 356(6343): 1111-1112. doi: 10.1126/science.356.6343.1111.
46. Dudley J. C., Lin M. T., Le D. T., Escherman R. Microsatellite instability as biomarker for PD-1 blockade. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(4): 813-820. doi: 10.1156/1078-0432.ccr-15-1678.
47. Berger S., Nartens U. M., Bochum S. Larotrectinib (LOXO-101). *Rec. Res. Cancer Res.* 2018; 211: 141-151.
48. Hyman D. M., Taylor B. S., Baselga J. Implementing genomic-driven oncology. *Cell.* 2017; 168(2): 584-599. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.015.
49. Hamis S., Powathil G. G., Chaplain M. A. J. Blackboard to Bedside: A Mathematical Modeling Bottom-Up Approach Toward Personalized Cancer Treatments. *JCO Clin Cancer Inform.* 2019;3:1-11. doi: 10.1200/CCI.18.00068.