



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ВИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ И МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

клиническая практика

2023

Том 14 №1

ISSN 2618-8627 (Online)
ISSN 2220-3095 (Print)

ЖУРНАЛ ВКЛЮЧЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК



JOURNAL OF CLINICAL PRACTICE
Volume 14 Issue 1

<https://journals.eco-vector.com/clinpractice>

клиническая практика

ISSN 2618-8627 (Online)
ISSN 2220-3095 (Print)

2023, Том 14, № 1

мультидисциплинарный рецензируемый журнал для врачей

Издаётся с 2009 г. Выходит четыре раза в год

Главный редактор: Троицкий А.В., д.м.н., профессор (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-2143-8696

Зам. главного редактора, научный редактор: Баклаушев В.П., д.м.н., доцент (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-1039-4245

Редакционная коллегия:

Аверьянов А.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-1031-6933

Агзамов Д.С., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-1714-0635

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-4228-9044

Алтынник Н.А., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

Scopus Author ID: 57192084869

Ахпашев А.А., к.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-2938-5173

Белопасов В.В., д.м.н., проф. (Астрахань, Россия)

ORCID: 0000-0003-0458-0703

Белоусов В.В., д.б.н., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-6637-8098

Бойко А.Н., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-2975-4151

Войтенков В.Б., к.м.н. (Санкт-Петербург, Россия)

ORCID: 0000-0003-0448-7402

Гурина О.И., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-1066-5423

Даминов В.Д., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-7141-6052

Девиченский В.М., д.б.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-4642-2295

Дундуа Д.П., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-7345-0385

Екушева Е.В., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-3638-6094

Забозлаев Ф.Г., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-7445-8319

Затейщиков Д.А., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-7065-2045

Зотов А.С., к.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-2385-7456

Зыков К.А., д.м.н., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-3385-2632

Иванов Ю.В., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-6209-4194

Иванова Г.Е., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-3180-5525

Ищенко Р.В., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-7999-8955

Кедрова А.Г., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-1031-9376

Клыпа Т.В., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-2732-967X

Конопляников М.А., к.б.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-1180-2343

Копецкий И.С., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-4723-6067

Кочубей А.В., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-7438-7477

Лазко Ф.Л., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-5292-7930

Лесняк В.Н., к.м.н., доцент (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-2739-0649

Луцкий Д.Л., д.м.н., доцент (Астрахань, Россия)

ORCID: 0000-0002-1412-3322

Мамошин А.В., д.м.н., проф. (Орел, Россия)

ORCID: 0000-0002-1799-6778

Мартынов М.Ю., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-2797-7877

Медведев М.В., д.м.н. (Москва, Россия)

Scopus Author ID: 57192084583

Олесов Е.Е., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-9165-2554

Олесова В.Н., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-3461-9317

Орехов П.Ю., к.м.н. (Москва, Россия)

Scopus Author ID: 400834

Павлова Г.В., д.б.н., проф. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-6885-6601

Панченков Д.Н., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-8539-4392

Писарев В.М., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-5729-9846

Полунина Е.Г., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-8551-0661

Решетов И.В., д.м.н., проф., академик РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-0909-6278

Савина М.И., д.б.н., проф. (Москва, Россия)

Scopus Author ID: 0000000000049

Скворцов Д.В., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-2794-4912

Соодаева С.К., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-6453-0017

Трубилин В.Н., д.м.н. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-9123-909X

Туруспекова С.Т., д.м.н. (Алматы, Казахстан)

ORCID: 0000-0002-4593-3053

Хабазов Р.И., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-6801-6568

Хаитов М.Р., д.м.н., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0003-4961-9640

Чернова А.А., д.м.н., доцент (Красноярск, Россия)

ORCID: 0000-0003-2977-1792

Чупин А.В., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0002-5216-9970

Ширшова Е.В., д.м.н., проф. (Москва, Россия)

ORCID: 0000-0001-9193-0534

Mally Ju., Dr. Habilis, PhD, Professor (Шопрон, Венгрия)

ORCID: 0000-0001-7299-2692

Wang Guowen, PhD, MD (Тяньжин, Китай)

ORCID: 0000-0001-6549-1144

Xin Wang, PhD (Тяньжин, Китай)

ORCID: 0000-0001-9325-3194

Zhang Chao, PhD, MD (Тяньжин, Китай)

ORCID: 0000-0001-7096-8488

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-38032 от 11 ноября 2009 г.

Журнал включен в перечень ВАК. Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов. Точка зрения автора может не совпадать с мнением редакции.

Авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC BY-NC-SA 4.0), которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылки на ав-

торов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

Учредитель — ФНKC специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России.

Адрес: 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28.
<https://journals.eco-vector.com/clinpractice>

Издатель ООО «Эко-Вектор»

Адрес: 191186, г. Санкт-Петербург, Аптекарский переулок, д. 3, литера А, 1Н
E-mail: info@eco-vector.com; WEB: <https://eco-vector.com>

Подписка

Подписка на печатную версию через интернет:

• www.journals.eco-vector.com

• www.akc.ru

Сдано в набор 13.03.2023.

Подписано в печать 03.04.2023.

Тираж 1300 экз. Заказ № 3-2441-IV.

Цена свободная.

Отпечатано в ООО «Типография Фурсова».

196105, Санкт-Петербург, ул. Благодатная, 69.

Тел.: (812) 646-33-77

Фото на обложке: сотрудники Центра технологий и микрофабрикации ФГБУ ФНKC физико-химической медицины имени акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России.

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- И.В. Горончаровская, А.К. Евсеев, Е.В. Клычникова, Е.В. Тазина, А.С. Богданова, А.К. Шабанов, С.С. Петриков**
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ. 6
- Я.Д. Шанский, А.В. Господарик, А.В. Комарова, С.С. Есиев, Л.А. Улаханова, А.С. Серкина, Л.В. Плотникова, Ю.А. Беспярых**
КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНТИТЕЛ К SARS-CoV-2: ОТ QR-КОДА К РЕАЛЬНОСТИ 12
- А.А. Каниболоцкий, О.В. Зайратьянц**
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОРАЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ТЯЖЕЛОМ ТЕЧЕНИИ COVID-19. 21
- Д.В. Скворцов, С.Н. Кауркин, Г.Е. Иванова, А.Ю. Суворов**
ЦЕЛЕВАЯ ТРЕНИРОВКА ФУНКЦИИ ХОДЬБЫ ПО ПАРАМЕТРАМ ПЕРИОДА ОПОРЫ И ОДИНОЧНОЙ ОПОРЫ У БОЛЬНЫХ В РАННЕМ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА 31
- Р.И. Шакуров, Я.Д. Шанский, К.А. Прусаков, С.В. Сизова, С.П. Дудик, Л.В. Плотникова, В.А. Манувер, Д.В. Клинов, В.Н. Лазарев, Ю.А. Беспярых, Д.В. Басманов**
РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G K SARS-CoV-2. 44
- Д.Л. Луцкий, А.М. Луцкая, Р.М. Махмудов, Е.В. Палкина, А.И. Полуни**
КОРРЕЛЯЦИЯ УРОВНЯ ЦИНКА В СПЕРМОПЛАЗМЕ С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ФЕРТИЛЬНОСТИ ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА 54
- Е.В. Смолякова, Ю.С. Скоблов, Н.А. Скоблова, А.В. Рвачева, О.В. Бондарец, А.В. Еременко, И.А. Келехсаев, И.Е. Чазова, К.А. Зыков**
ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОСВЯЗИ ИЗМЕНЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК β 1- И β 2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ β 2-АГОНИСТОВ С КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМИ ПАРАМЕТРАМИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ 66
- С.Е. Транковский, В.Г. Процко, А.А. Ахпашев**
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПЛОСКОВАЛЬГУСНОЙ ДЕФОРМАЦИИ СТОП У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ 77
- А.В. Козлов, А.А. Поликарпов, П.Г. Таразов, А.В. Моисеенко, М.В. Юткин, С.В. Шаповал, А.С. Турлак, Д.А. Гранов**
ВНУТРИПРОТОКОВАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ЕЕ КОМБИНАЦИЯ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ХИМИОИНФУЗИЕЙ В ЛЕЧЕНИИ НЕОПЕРАБЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЮ КЛАЦКИНА. 84

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

- А.А. Солх Мохаммед, В.В. Белопасов**
ПОСТОПЕРАЦИОННАЯ БОЛЬ В РАННЕМ И ПОЗДНЕМ ПЕРИОДЕ ПРИ ОПЕРАТИВНОМ ВМЕШАТЕЛЬСТВЕ НА ШЕЙНОМ И ПОЯСНИЧНО-КРЕСТЦОВОМ ОТДЕЛЕ ПОЗВОНОЧНИКА 95
- И.А. Булавина, И.А. Хамнагадаев, И.И. Хамнагадаев, М.Л. Коков, А.В. Троицкий, А.С. Зотов, Л.С. Коков, М.А. Школьников**
АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ИНТЕРВЕНЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ТИПИЧНОГО ТРЕПЕТАНИЯ ПРЕДСЕРДИЙ 101
- А.К. Аксаментов, Н.В. Мельникова, Е.В. Мошнина, Н.А. Колышкина, О.В. Кучерова, В.П. Баклаушев**
ВОЗМОЖНОСТИ АДАПТАЦИИ ПРОТОКОЛА ПОВТОРНОЙ ОБРАБОТКИ В ПРАКТИКЕ ПАП-ТЕСТА THINPREP 108

КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ

- Ю.А. Беспярых, А.В. Господарик, Е.А. Журавель, Г.З. Серёгин, А.В. Комарова, С.С. Есиев, Г.О. Бронин, Я.Д. Шанский**
ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ АСТРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У РЕЦИПИЕНТА АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ. 115

journal of clinical practice

ISSN 2618-8627 (Online)

ISSN 2220-3095 (Print)

Vol 14, N 1 (2023)

multidisciplinary peer-review medical journal

Published since 2009. Issued quarterly

Editor-in-Chief: Troitsky A.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-2143-8696

Deputy Editor-in-Chief: Baklaushev V.P., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-1039-4245

Editorial Board:

Agzamov D.S., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-1714-0635

Akimkin V.G., Full member of Russian Academy of Sciences, M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-4228-9044

Akhpashev A.A., M.D., Ph.D. (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-2938-5173

Altynnik N.A., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

Scopus Author ID: 57192084869

Averyanov A.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding

Member of the RAS (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-1031-6933

Belopasov V.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Astrakhan, Russia)

ORCID: 0000-0003-0458-0703

Belousov V.V., Corresponding Member of the RAS, Ph.D., Dr. Sci. (Biol.),

Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-6637-8098

Boyko A.N., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-2975-4151

Chernova A.A., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Krasnoyarsk, Russia)

ORCID: 0000-0003-2977-1792

Chupin A.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-5216-9970

Daminov V.D., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-7141-6052

Devichenskiy V.M., Ph.D., Dr. Sci. (Biol.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-4642-2295

Dundua D.P., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-7345-0385

Ekusheva E.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-3638-6094

Gurina O.I., Corresponding Member of the RAS, Ph.D., Dr. Sci. (Med.),

Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-1066-5423

Ishchenko R.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-7999-8955

Ivanov Yu.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-6209-4194

Ivanova G.E., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-3180-5525

Kedrova A.G., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-1031-9376

Khabazov R.I., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-6801-6568

Khaitov M.R., Corresponding Member of the RAS, M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.)

(Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-4961-9640

Klypa T.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-2732-967X

Kochubey A.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-7438-7477

Konoplyannikov M.A., M.D., Ph.D. (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-1180-2343

Kopetskiy I.S., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-4723-6067

Lazko F.L., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-5292-7930

Lesnyak V.N., M.D., Ph.D. (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-2739-0649

Lutskiy D.L., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Astrakhan, Russia)

ORCID: 0000-0002-1412-3322

Mally Ju., Dr. Habilis, Ph.D., Professor (Sopron, Hungary)

ORCID: 0000-0001-7299-2692

Mamoshin A.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Orel, Russia)

ORCID: 0000-0002-1799-6778

Martynov M.Y., Corresponding Member of the RAS, M.D., Ph.D.,

Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-2797-7877

Medvedev M.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

Scopus Author ID: 57192084583

Olesov E.E., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-9165-2554

Olesova V.N., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-3461-9317

Orekhov P.Y., M.D., Ph.D. (Moscow, Russia)

Scopus Author ID 400834

Pavlova G.V., Ph.D., Dr. Sci. (Biol.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-6885-6601

Panchenkov D.N., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-8539-4392

Pisarev V.M., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-5729-9846

Polunina E.G., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-8551-0661

Reshetov I.V., Full member of Russian Academy of Sciences, M.D., Ph.D.,

Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-0909-6278

Savina M.I., Ph.D., Dr. Sci. (Biol.), Professor (Moscow, Russia)

Scopus Author ID: 0000000000049

Shirshova E.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-9193-0534

Skvortsov D.V., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-2794-4912

Soodaeva S.K., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-6453-0017

Trubilin V.N., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-9123-909X

Turuspekova S.T., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Almaty, Kazakhstan)

ORCID: 0000-0002-4593-3053

Voytenkov V.B., M.D., Ph.D. (Saint Petersburg, Russia)

ORCID: 0000-0003-0448-7402

Wang Guowen, Ph.D., M.D. (Tianjin, China)

ORCID: 0000-0001-6549-1144

Xin Wang, Ph.D. (Tianjin, China)

ORCID: 0000-0001-9325-3194

Zabozlaev F.G., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.) (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0002-7445-8319

Zateyshchikov D.A., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0001-7065-2045

Zhang Chao, Ph.D., M.D. (Tianjin, China)

ORCID: 0000-0001-7096-8488

Zotov A.S., M.D., Ph.D. (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-2385-7456

Zykov K.A., M.D., Ph.D., Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member

of the RAS (Moscow, Russia)

ORCID: 0000-0003-3385-2632

The journal is registered with Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media and Federal Service for Monitoring Compliance with Cultural Heritage Protection Law PI № FS77-38032 November, 11, 2009.

The Journal is included into the «List of leading scientific peer-reviewed journals, where principal data of applicants for scientific degree has to be published».

Publisher and founder Federal Research Clinical Center FMBA of Russia, 115682, 28 Orekhovy blvd, Moscow, Russia.

E-mail: info@fnkc-fmba.ru, WEB: https://fnkc-fmba.ru, Phone: +7 (495) 395-62-07

Circulation in print 1300 copies.

The editors are not responsible for the content of advertising materials. The point of view of the authors may not coincide with the opinion of the editors. Open Access, under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0).

CONTENTS

ORIGINAL STUDY ARTICLES

- I.V. Goroncharovskaya, A.K. Evseev, E.V. Klychnikova, E.V. Tazina, A.S. Bogdanova, A.K. Shabanov, S.S. Petrikov**
ELECTROCHEMICAL MEASUREMENTS OF THE LEVELS OF NITRIC OXIDE METABOLITES IN THE BLOOD SERUM 6
- Ya.D. Shanskiy, A.V. Gospodarik, A.V. Komarova, S.S. Esiev, L.A. Ulakhanova, A.S. Serkina, L.V. Plotnikova, J.A. Bespyatykh**
CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF ANTIBODIES TO SARS-CoV-2: FROM A QR CODE TO THE REALITY 12
- A.A. Kanibolotskiy, O.V. Zayratyants**
MORPHOLOGICAL FEATURES OF BRAIN DAMAGE IN SEVERE COVID-19 21
- D.V. Skvortsov, S.N. Kaurkin, G.E. Ivanova, A.Yu. Suvorov**
TARGETED TRAINING OF THE FUNCTION OF WALKING ACCORDING TO THE STANCE AND SINGLE SUPPORT PHASE IN PATIENTS IN THE EARLY RECOVERY PERIOD OF CEREBRAL STROKE 31
- R.I. Shakurov, Ya.D. Shansky, K.A. Prusakov, S.V. Sizova, S.P. Dudik, L.V. Plotnikova, V.A. Manuvera, D.V. Klinov, V.N. Lazarev, J.A. Bespyatykh, D.V. Basmanov**
A FLUORESCENT MICROSPHERES-BASED MICROFLUIDIC TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN G TO SARS-COV-2 44
- D.L. Lutsky, A.M. Lutskaya, R.M. Makhmudov, E.V. Palkina, A.I. Polunin**
CORRELATION OF THE ZINC LEVEL IN THE SPERMOPLASM WITH THE FERTILITY CHARACTERISTICS OF HUMAN EJACULATE 54
- E.V. Smolyakova, Y.S. Skoblov, N.A. Skoblova, A.V. Rvacheva, O.V. Bondarets, A.V. Eremenko, I.A. Kelekhsaev, I.E. Chazova, K.A. Zykov**
A PILOT STUDY TO DETERMINE THE RELATIONSHIP OF CHANGES IN THE CHARACTERISTICS OF β 1- AND β 2-ADRENORECEPTORS AGAINST THE BACKGROUND OF THE USE OF β 2-AGONISTS WITH CLINICALLY SIGNIFICANT PARAMETERS IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR PATHOLOGY 66
- S.E. Trankovskiy, V.G. Protsko, A.A. Akhpashev**
ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE SURGICAL TREATMENT OF PLANO-VALGUS FOOT DEFORMITY IN CHILDREN AND ADOLESCENT 77
- A.V. Kozlov, A.A. Polikarpov, P.G. Tarazov, A.V. Moiseenko, M.V. Jutkin, S.V. Shapoval, A.S. Turlak, D.A. Granov**
INTRADUCTAL PHOTODYNAMIC THERAPY AND ITS COMBINATION WITH INTRA-ARTERIAL CHEMOINFUSION IN THE TREATMENT OF INOPERABLE PATIENTS WITH KLATSKIN TUMOR 84

REVIEWS

- A.A. Solx Mohammed, V.V. Belopasov**
FOLLOWING A POSTOPERATIVE PAIN IN THE EARLY AND LATE PERIOD DURING SURGICAL INTERVENTION ON THE CERVICAL AND LUMBOSACRAL SPINE 95
- I.A. Bulavina, I.A. Khamnagadaev, I.I. Khamnagadaev, M.L. Kokov, A.V. Troitskiy, A.S. Zotov, L.S. Kokov, M.A. Shkolnikova**
ANTICOAGULATION AFTER TYPICAL ATRIAL FLUTTER ABLATION 101
- A.K. Aksamentov, N.V. Melnikova, E.V. Moshnina, N.A. Kolyshkina, O.V. Kucheroval, V.P. Baklaushev**
THE POSSIBILITIES OF ADAPTING THE RE-PROCESSING PROTOCOL IN THE PRACTICE OF THE THINPREP PAP TEST USAGE 108

CASE REPORTS

- J.A. Bespyatykh, A.V. Gospodarik, E.A. Zhuravel, G.Z. Seregin, A.V. Komarova, S.S. Esiev, G.O. Bronin, Ya.D. Shansky**
FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION IN THE TREATMENT OF ASTROVIRUS INFECTION IN A RECIPIENT OF AN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT: A CLINICAL CASE 115

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

И.В. Горончаровская, А.К. Евсеев, Е.В. Клычникова, Е.В. Тазина, А.С. Богданова, А.К. Шабанов, С.С. Петриков

Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Сепсис — критическое состояние, вызванное патологическим иммунным ответом на инфекцию, в результате которого возникает полиорганная недостаточность. В патогенезе сепсиса и особенно септического шока большое значение уделяется эндотелиальному маркеру сосудистой регуляции — оксиду азота (NO). При септическом шоке нарушение регуляции тонуса сосудов играет ключевую роль в развитии гипотонии. Именно поэтому контроль уровня оксида азота и его стабильных метаболитов у пациентов, находящихся в критическом состоянии, является весьма важной задачей. **Цель исследования** — изучить возможности электрохимического определения нитрита в сыворотке крови пациентов в критическом состоянии. **Методы.** Уровень стабильных метаболитов оксида азота электрохимически исследован с помощью композитного электрода и спектрофотометрически с помощью реактива Грисса в сыворотке крови практически здоровых добровольцев ($n=20$) и пациентов с диагнозом сепсиса ($n=25$). **Результаты.** Данные в группах здоровых людей и пациентов с сепсисом достоверно различаются ($p < 0,00001$) как при измерении электрохимическим, так и спектрофотометрическим методом. Медиана отклика тока у здоровых людей составила 0,41 мкА (0,33; 0,55), а суммарное содержание метаболитов оксида азота (NOx) — 26,8 мкмоль/л (20,8; 31,0), в то время как у пациентов с сепсисом — 0,79 мкА (0,61; 1,28) и 38,89 мкмоль/л (29,64; 57,45) соответственно. Другими словами, отклик тока, эквивалентный уровню нитрита, как и концентрация NOx в сыворотке крови, оказались значительно выше у пациентов с сепсисом, чем у практически здоровых людей. Выявлена отрицательная корреляция между данными, полученными указанными методами для практически здоровых людей ($r=-0,696$, $p=0,0007$). **Заключение.** Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности амперометрического метода с применением композитного электрода для определения нитрита в сыворотке крови.

Ключевые слова: амперометрия; метаболиты оксида азота; сепсис; спектрофотометрия.

Для цитирования: Горончаровская И.В., Евсеев А.К., Клычникова Е.В., Тазина Е.В., Богданова А.С., Шабанов А.К., Петриков С.С. Электрохимическое определение уровня стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая практика*. 2023;14(1):6–11. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract202788>

Поступила 08.02.2023

Принята 04.03.2023

Опубликована 31.03.2023

ОБОСНОВАНИЕ

Патогенез сепсиса сложен и представлен патогенетическими звеньями, затрагивающими практически все органно-функциональные системы организма, тем более когда речь идет о наиболее тяжелой форме генерализованной инфекции — септическом шоке, который сопровождается высокой смертностью пациентов [1, 2]. Главная мишень при сепсисиндуцированных нарушениях — эндотелий сосудов. В результате повреждения эндотелия развивается эндотелиальная дисфункция, одним из проявлений которой является чрезмерное об-

разование оксида азота. Увеличение содержания в организме оксида азота приводит к резкой вазодилатации и повышению проницаемости капилляров, что является причиной развития гиповолемии, а в дальнейшем гипотензии и гипоперфузии органов [3, 4]. Кроме того, оксид азота способен взаимодействовать с супероксид-радикалом, который также появляется при воспалительной реакции, с образованием пероксинитрита, оказывающего цитотоксическое действие [5]. Совокупность всех указанных событий способствует развитию полиорганной недостаточности.

ELECTROCHEMICAL MEASUREMENTS OF THE LEVELS OF NITRIC OXIDE METABOLITES IN THE BLOOD SERUM

I.V. Goroncharovskaya, A.K. Evseev, E.V. Klychnikova, E.V. Tazina, A.S. Bogdanova, A.K. Shabanov, S.S. Petrikov

N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation

Background: Sepsis is a serious clinical condition caused by a dysregulated immune response to infection resulting in multiple organ failure. In the pathogenesis of sepsis, especially that of septic shock, great importance is given to the endothelial marker of vascular regulation, nitric oxide (NO). In septic shock, dysregulation of the vascular tone plays a key role in the development of hypotension. Therefore, the control of the level of nitric oxide and its stable metabolites in critically ill patients is a very important task. **Aim:** the aim of this study was to evaluate the potential of the electrochemical nitrite detection in the patients' blood serum. **Methods:** The levels of nitric oxide stable metabolites in the blood serum of healthy individuals ($n=20$) and septic patients ($n=25$) were studied by the electrochemical method using a composite electrode and by the spectrophotometric method using the Griess reagent. **Results:** The data in the groups of healthy people and patients with sepsis differ significantly ($p < 0.00001$) both when measured using electrochemical and spectrophotometric methods. The median value of the current response in healthy people was $0.41 \mu A$ (0.33; 0.55), and the total content of nitric oxide metabolites (NOx) was $26.8 \mu mol/L$ (20.8; 31.0), while in patients with sepsis, these values were $0.79 \mu A$ (0.61; 1.28) and $38.89 \mu mol/L$ (29.64; 57.45), respectively. A negative correlation was found between the data obtained for practically healthy persons ($r=-0.696$, $p=0.0007$). **Conclusion:** The obtained results allow us to conclude that the nitrite measurement in the blood serum by amperometry using a composite electrode is promising as a diagnostic technique.

Keywords: amperometry; nitric oxide metabolites; sepsis; spectrophotometry.

For citation: Goroncharovskaya IV, Evseev AK, Klychnikova EV, Tazina EV, Bogdanova AS, Shabanov AK, Petrikov SS. Electrochemical Measurements of the Levels of Nitric Oxide Metabolites in the Blood Serum. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):6–11. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract202788>

Submitted 08.02.2023

Revised 04.03.2023

Published 31.03.2023

Исследования уровня оксида азота и его стабильных метаболитов в плазме крови лиц в критическом состоянии показали, что данный параметр коррелирует с тяжестью состояния пациентов, оцененной с помощью шкал SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) и APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) [6–8]. При сравнении случаев сепсиса с благоприятным и летальным исходом выявлено, что уровень метаболитов оксида азота был выше у пациентов с летальным исходом [9–11].

Таким образом, контроль уровня оксида азота и его стабильных метаболитов необходим при мониторинге пациентов, находящихся в критическом состоянии.

Уровень оксида азота может быть оценен как путем непосредственного его определения, так и через содержание его стабильных метаболитов — нитрита и нитрата (NOx) [12]. Однако прямое определение оксида азота не получило распро-

странения для измерений в биологических средах, поскольку молекула газа обладает коротким временем жизни. В клинической практике для определения метаболитов оксида азота используется спектрофотометрический метод с применением реактива Грисса [12]. Поскольку метод Грисса направлен на определение нитрит-ионов, то необходимо предварительное восстановление нитрат-ионов, что делает анализ более трудоемким и длительным. Именно поэтому разработка альтернативных методов определения метаболитов оксида азота до сих пор остается актуальной.

Так, в качестве альтернативы для определения нитрита могут выступать электрохимические методы анализа, поскольку они не требуют дополнительных реагентов, дорогостоящего оборудования, обладают хорошей чувствительностью и скоростью проведения измерений. Предварительные исследования возможностей композитного пастового электрода на основе многослойных углерод-

ных нанотрубок, покрытых полиметиленовым голубым для электрохимического определения нитрита в водных и биологических средах [13], показали, что данный композитный электрод может быть пригоден для измерений в биологических средах пациентов.

Цель исследования — изучить возможности электрохимического определения нитрита в сыворотке крови пациентов в критическом состоянии.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Пилотное одноцентровое исследование.

Критерии соответствия

Критерии включения: пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» любого пола и возраста (старше 18 лет) с диагностированным согласно критериям международных рекомендаций по лечению сепсиса и септического шока (Surviving Sepsis Campaign, SSC; 2016) сепсисом с нарушением тканевой перфузии и развитием полиорганной недостаточности.

Критерии включения в группу сравнения: практически здоровые доноры-добровольцы любого пола старше 18 лет.

Условия проведения

Исследование проведено на базе ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» в период с февраля по апрель 2022 года.

Описание медицинского вмешательства

В качестве объекта исследования использовали сыворотку крови практически здоровых добровольцев и пациентов, полученную из цельной крови путем центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин в центрифуге Allegra X-15R (Beckman Coulter, США). Исследование у пациентов проводили на 7–10-е сутки с момента их поступления в стационар.

Подготовка рабочего электрода. Рабочий композитный электрод был изготовлен путем нанесения на поверхность стеклоуглеродного электрода диаметром 3 мм суспензии многостенных углеродных нанотрубок (ООО «Глобал СО», Россия) в 1% растворе додецилсульфата натрия (5 мг/мл) объемом 1 мкл. После высыхания растворителя проводили электрохимическую полимеризацию метилового голубого согласно методике, описанной в работе [13]. После синтеза электрод тщательно промывали дистиллированной водой.

цию метилового голубого согласно методике, описанной в работе [13]. После синтеза электрод тщательно промывали дистиллированной водой.

Методика определения стабильных метаболитов оксида азота. Уровень нитрита в сыворотке крови определяли с помощью амперометрического метода. Фиксировали отклик тока при величине потенциала поляризации +810 мВ в момент добавления 0,5 мл сыворотки крови к 9,5 мл натрий-фосфатного буферного раствора (pH 7,4) при постоянном перемешивании. В измерениях в качестве электрода сравнения использовали насыщенный Ag/AgCl электрод, а в роли вспомогательного электрода — сетку из платинированного титана.

Суммарное содержание метаболитов оксида азота (NOx) в сыворотке крови определяли с помощью спектрофотометрического метода с использованием реактива Грисса [14].

Этическая экспертиза

Данное исследование проводилось согласно принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (2013 г.) и Правилам клинической практики в Российской Федерации (от 19.06.2003 № 266). На проведение данного исследования получено согласие этического комитета ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения количественных признаков осуществляли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде медианы и процентилей (25% и 75%). Для сравнения двух независимых групп применяли U-критерий Манна–Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

Для исследования возможностей применения композитного электрода с целью оценки содержания нитрита в биологических средах обследованы две группы лиц. Первую группу, контрольную, составили 20 практически здоровых доноров, из них 11 мужчин и 9 женщин, медиана возраста

37 (31; 43,5) лет. Вторая группа — 25 пациентов с диагнозом сепсиса, находящихся на лечении в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, из них 17 мужчин и 8 женщин. Медиана возраста 59 (46; 64) лет. Медианный балл тяжести состояния пациентов по шкале SOFA составил 8,5 (5,75; 12). Причиной развития сепсиса явились распространенный фибринозно-гнойный перитонит, острый гнойный медиастинит, гнойные осложнения у больных с тяжелой сочетанной травмой, тяжелый острый панкреатит в фазе гнойно-септических осложнений.

Основные результаты исследования

Поскольку ранее нами было показано [13] с помощью вольтамперометрического метода, что окисление в плазме крови с добавлением нитрита протекает при тех же потенциалах, что и в водных растворах, то разность значений тока до и после введения образца сыворотки при потенциале +810 мВ можно отнести к процессу окисления нитрита. На рис. 1 приведены хроноамперограммы, снятые в растворе натрий-фосфатного буфера с добавлением сыворотки крови практически здорового донора (см. рис. 1, кривая 1) и пациента с диагнозом сепсиса (см. рис. 1, кривая 2), при этом установлены значительные отличия у здоровых людей и пациентов с воспалительной реакцией.

Аналитический отклик, наблюдаемый при добавлении сыворотки крови пациента, заметно выше, чем у практически здорового донора. Это можно объяснить тем, что при синдроме системной воспалительной реакции отмечается гиперпродукция оксида азота, что, следовательно, приводит к значительному росту уровня нитрита в организме [15].

Данные, полученные с помощью амперометрического и спектрофотометрического методов, достоверно различаются ($p < 0,00001$) в группе здоровых людей и пациентов с сепсисом: отклик тока, эквивалентный уровню нитрита, как и концентрация NOx в сыворотке крови пациентов с сепсисом, оказались выше, чем у практически здоровых людей (табл. 1).

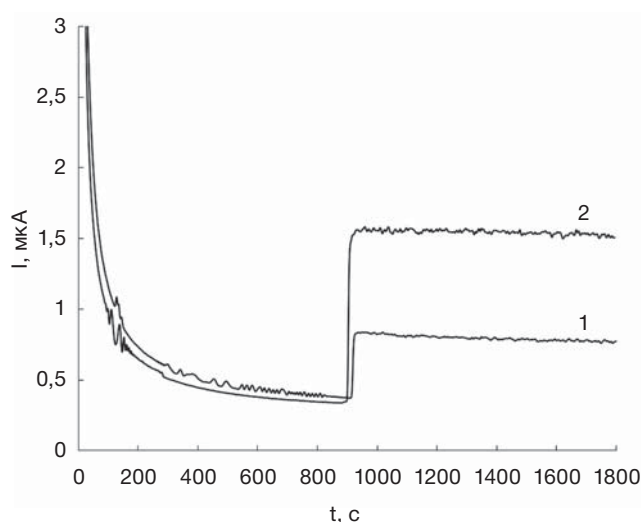


Рис. 1. Хроноамперограммы композитного электрода при добавлении к раствору натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) сыворотки донора (1) и сыворотки пациента с сепсисом (2).

Fig. 1. Chronoamperograms of a composite electrode when the blood serum of a donor (1) and of a septic patient (2) are added to a solution of sodium phosphate buffered saline (pH 7.4).

Выявлена также отрицательная корреляция между данными, полученными двумя методами измерения для практически здоровых людей: коэффициент корреляции Спирмена (r) составил $-0,696$, $p=0,0007$. Обратный характер зависимости тока окисления нитрита в сыворотке крови от суммарного содержания метаболитов оксида азота (NOx), измеренного спектрофотометрическим методом, вероятно, может быть обусловлен изменением соотношения в сыворотке крови $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. Так, например, в исследованиях [16, 17] показано, что при стимулировании или подавлении активности эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS синтазы) происходило существенное изменение уровня NO_2^- , в то время как показатели NOx и NO_3^- оставались практически неизменными. Можно предположить, что данное соотношение варьирует и при изменении активности индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS синтазы).

Таблица 1 / Table 1

Содержание стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови / Levels of nitric oxide stable metabolites in the blood serum

Показатель	Доноры, $n=20$	Пациенты с сепсисом, $n=25$	p
ΔI , мкА	0,41 (0,33; 0,55)	0,79 (0,61; 1,28)	0,000002
NOx, мкмоль/л	26,8 (20,8; 31,0)	38,89 (29,64; 57,45)	0,00793

ОБСУЖДЕНИЕ

Преимуществом электрохимического определения метаболитов оксида азота является более быстрый анализ по сравнению со спектрофотометрическим методом, который требует предварительного восстановления всех форм метаболитов оксида азота до нитрита [12]. В качестве восстановителя используют гранулы кадмия [10], либо конверсию проводят с помощью нитратредуктазы [7]. В случае применения кадмия время инкубации пробы составляет несколько часов, что делает анализ недостаточно экспрессным, а в случае нитратредуктазы — присутствует вероятность влияния ферментов на течение реакции Грисса.

Несмотря на преимущества электрохимического метода, в литературе описано применение подобных композитных электродов только для определения нитрита в водных растворах [18, 19], однако отсутствуют данные об аналогичных измерениях в биологических средах.

Научно-практической перспективой является более детальное исследование на большей выборке как практически здоровых людей, так и пациентов с различными патологическими состояниями с целью установления взаимосвязи между показателями, полученными электрохимическим и спектрофотометрическим методами.

Представленное исследование позволило выявить диагностические возможности электрохимического метода определения нитрита в биологических средах в качестве экспресс-анализа состояния пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Амперометрический метод может быть применен для определения нитрита в сыворотке крови. Дальнейшие исследования в направлении электрохимического анализа для оценки уровня стабильных метаболитов оксида азота являются весьма перспективными.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. И.В. Горончаровская — анализ литературы, написание статьи, набор данных; А.К. Евсеев — анализ и интерпретация данных, написание статьи, разработка концепции; Е.В. Клычкова — разработка концепции, написание статьи, анализ и интерпретация данных; Е.В. Тазина — набор данных, написание статьи; А.С. Богданова — лабораторная диагностика, набор данных, написа-

ние статьи; А.К. Шабанов — анализ данных, редактирование рукописи; С.С. Петриков — разработка концепции, обсуждение результатов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Authors' contribution. I.V. Goroncharovskaya — literature analysis, manuscript writing, data collection; A.K. Evseev — data analysis and interpretation, manuscript writing, conceptualization; E.V. Klychnikova — conceptualization, manuscript writing, data analysis and interpretation; E.V. Tazina — data collection, manuscript writing; A.S. Bogdanova — data collection, laboratory analysis; A.K. Shabanov — data analysis, manuscript editing; S.S. Petrikov — conceptualization, results analysis. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Funding source. The study had no sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that there is no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287
2. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: Pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353:i1585. doi: 10.1136/bmj.i1585
3. Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013; 11(2):150–160.
4. Loughran PA, Lei Z, Xu L, et al. Nitric oxide in sepsis and hemorrhagic shock: Beneficial or detrimental? In: Ignarro L.G., ed. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. 3rd ed. New York; 2017. P. 289–300.
5. Yadav S, Verma T, Pathak S, Nandi D. Understanding the roles of nitric oxide during sepsis, an inflammatory disorder. In: Morbidelli L., ed. *Therapeutic application of nitric oxide in cancer and inflammatory disorders*. New York; 2019. P. 243–276.
6. Kothari N, Bogra J, Kohli M, et al. Role of active nitrogen molecules in progression of septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56(3):307–315. doi: 10.1111/j.1399-6576.2011.02607.x

7. Ho JT, Chapman MJ, O'Connor S, et al. Characteristics of plasma NOx levels in severe sepsis: High interindividual variability and correlation with illness severity, but lack of correlation with cortisol levels. *Clin Endocrinol.* 2010;73(3): 413–420. doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03817.x
8. Mitaka C, Hirata Y, Yokoyama K, et al. Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. *Shock.* 2003;19(4):305–309. doi: 10.1097/00024382-200304000-00002
9. Lorente L, Gómez-Bernal F, Martín MM, et al. High serum nitrites levels in non-survivor COVID-19 patients. *Med Intensiva.* 2022;46(3):132–139. doi: 10.1016/j.medine.2020.10.007
10. Клычникова Е.В., Тазина Е.В., Рей С.И., и др. Оценка прогностической значимости биохимических маркеров окислительного стресса, эндогенной интоксикации и сосудистой регуляции в развитии неблагоприятных исходов у больных с сепсисом // *Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского.* 2016. № 2. С. 25–30. [Klychnikova EV, Tazina EV, Rei SI, et al. Evaluation of prognostic significance for biochemical markers of oxidative stress, endogenous intoxication and vascular regulation in the development of unfavorable outcomes in patients with sepsis. *Russian Sklifosovsky Journal Emergency Medical Care.* 2016;(2):25–30. (In Russ).]
11. Yu MH, Chen MH, Han F. Prognostic value of the biomarkers serum amyloid A and nitric oxide in patients with sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2018;62:287–292. doi: 10.1016/j.intimp.2018.07.024
12. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(5):645–657. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
13. Крюков А.Ю., Беспрозванная Р., Горончаровская И.В., и др. Возможности использования композитного электрода на основе углеродных нанотрубок для определения нитрита в водных и биологических средах // *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология.* 2021. Т. 64, № 7. С. 21–26. [Kryukov AY, Bezprozvannaya R, Goroncharovskaya IV, et al. Possibilities of using composite electrode based on carbon nanotubes for determination of nitrite in aqueous and biological media. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya.* 2021;64(7):21–26. (In Russ).] doi: 10.6060/ivkkt.20216406.6381
14. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрата/нитрита (NOx) в сыворотке крови // *Биомедицинская химия.* 2004. Т. 50, № 1. С. 79–85. [Golikov PP, Nikolayeva NYu. Method of the measurement of nitrite/nitrate (NOx) in serum. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2004;50(1):79–85. (In Russ).]
15. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. Москва: Медпрактика-М, 2004. 179 с. [Golikov PP. Nitric oxide in the clinic of urgent diseases. Moscow: Medpraktika-M; 2004. 179 p. (In Russ).]
16. Lauer T, Preik M, Rassaf T, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(22):12814–12819. doi: 10.1073/pnas.221381098
17. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(7):790–796. doi: 10.1016/s0891-5849(03)00406-4
18. Dai J, Deng D, Yuan Y, et al. Amperometric nitrite sensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and poly (toluidine blue). *Microchimica Acta.* 2016;183(5):1553–1561. doi: 10.1007/s00604-016-1773-z
19. Xu GR, Xu G, Xu ML, et al. Amperometric determination of nitrite at poly(methylene blue)-modified glassy carbon electrode. *Bull Korean Chem Soc.* 2012;33(2):415–419. doi: 10.5012/bkcs.2012.33.2.415

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Горончаровская Ирина Викторовна, к.х.н.;

адрес: Россия, 129090, Москва,

Большая Сухаревская пл., д. 3;

e-mail: goririna22@gmail.com; eLibrary SPIN: 3526-6514;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0113-306X>

Соавторы:

Евсеев Анатолий Константинович, д.х.н.;

e-mail: anatolevseev@gmail.com; eLibrary SPIN: 1380-7224;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0832-3272>

Клычникова Елена Валерьевна, к.м.н.;

e-mail: klychnikovaev@mail.ru; eLibrary SPIN: 6311-6795;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3349-0451>

Тазина Елизавета Владимировна, к.фарм.н.;

e-mail: TazinaEV@sklif.mos.ru; eLibrary SPIN: 1994-3086;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6079-1228>

Богданова Алина Сергеевна;

e-mail: BogdanovaAS@sklif.mos.ru;

eLibrary SPIN: 8908-1035;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6608-8493>

Шабанов Аслан Курбанович, д.м.н., доцент;

e-mail: ShabanovAK@sklif.mos.ru;

eLibrary SPIN: 8501-3735;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3417-2682>

Петриков Сергей Сергеевич, д.м.н.,

чл.-корр. РАН;

e-mail: PetrikovSS@sklif.mos.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3292-8789>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Irina V. Goroncharovskaya, PhD;

address: 3 Bolshaya Sukharevskaya square,

129090 Moscow, Russia;

e-mail: goririna22@gmail.com; eLibrary SPIN: 3526-6514;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0113-306X>

Co-authors:

Anatoly K. Evseev, Dr. Sci (Chem.), PhD;

e-mail: anatolevseev@gmail.com; eLibrary SPIN: 1380-7224;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0832-3272>

Elena V. Klychnikova, MD, PhD;

e-mail: klychnikovaev@mail.ru; eLibrary SPIN: 6311-6795;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3349-0451>

Elizaveta V. Tazina, PhD;

e-mail: TazinaEV@sklif.mos.ru; eLibrary SPIN: 1994-3086;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6079-1228>

Alina S. Bogdanova;

e-mail: BogdanovaAS@sklif.mos.ru;

eLibrary SPIN: 8908-1035;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6608-8493>

Aslan K. Shabanov, MD, PhD, Assistant Professor;

e-mail: ShabanovAK@sklif.mos.ru;

eLibrary SPIN: 8501-3735;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3417-2682>

Sergey S. Petrikov, MD, PhD, Corresponding Member

of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: PetrikovSS@sklif.mos.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3292-8789>

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНТИТЕЛ К SARS-COV-2: ОТ QR-КОДА К РЕАЛЬНОСТИ

Я.Д. Шанский¹, А.В. Господарик¹, А.В. Комарова^{1, 2}, С.С. Есиев¹, Л.А. Улаханова¹,
А.С. Серкина¹, Л.В. Плотникова^{1, 2}, Ю.А. Беспятых^{1, 2, 3}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, Российская Федерация

² Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация

³ Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Иммунный ответ на попадание вируса SARS-CoV-2 в организм включает выработку специфических иммуноглобулинов к антигенам коронавируса. В зависимости от типа и уровня содержания иммуноглобулинов можно сделать вывод о стадии заболевания и оценить эффективность вакцинопрофилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19. Основным подходом к определению иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 является иммуноферментный анализ (ИФА), данные которого используются, в частности, для выдачи электронного сертификата COVID-19 с QR-кодом. Однако качественный и количественный состав иммуноглобулинов для выдачи QR-кода официально не регламентирован. **Цель исследования** — определить уровни иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови добровольцев с различными типами иммунитета к SARS-CoV-2 для выбора наиболее информативных показателей защитного иммунитета. **Методы.** От мужчин и женщин в возрасте 18–50 лет получено 76 образцов сыворотки крови. Обнаружение IgA, IgM, IgG (суммарные к SARS-CoV-2, S-белку и его RBD-фрагменту), оценку avidности IgG и уровня N-антигена SARS-CoV-2 проводили методом ИФА с использованием коммерчески доступных наборов реагентов. **Результаты.** Показатели уровня антител (защитных IgG и IgA начальной фазы инфекции) в наибольшей степени выражены у вакцинированных и перенесших COVID-19, в наименьшей — у невакцинированных. У переболевших невакцинированных лиц уровень общих защитных антител и IgG к S-белку, включая RBD-фрагмент, наиболее низкий; avidность IgG ниже, чем в остальных группах. Avidность иммуноглобулинов у вакцинированных выше, чем у переболевших. Для переболевших COVID-19 и вакцинированных лиц не отмечалось различий в уровне суммарных IgG к коронавирусу, его S-белку и RBD-фрагменту S-белка. **Заключение.** Анализ иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 свидетельствует о разном профиле гуморального иммунного ответа при вакцинации и перенесенной инфекции COVID-19. Для быстрой оценки иммунного ответа на перенесенную и текущую инфекцию COVID-19 и выявления поствакцинального иммунитета целесообразно использовать общий уровень IgG к SARS-CoV-2. Для более глубокой оценки профилактического иммунитета и выработки защитных антител целесообразно оценивать количественное содержание IgG к S-белку и его RBD-фрагменту. Формирование электронного сертификата COVID-19 лишь по одному из показателей без учета остальных нерационально.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; иммуноглобулины; диагностика COVID-19.

Для цитирования: Шанский Я.Д., Господарик А.В., Комарова А.В., Есиев С.С., Улаханова Л.А., Серкина А.С., Плотникова Л.В., Беспятых Ю.А. Клиническая лабораторная диагностика антител к SARS-CoV-2: от QR-кода к реальности. *Клиническая практика*. 2023;14(1):12–20. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract163553>

Поступила 01.02.2023

Принята 21.02.2023

Опубликована 31.03.2023

ОБОСНОВАНИЕ

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызываемая выделенным в 2019 году серотипом РНК-содержащего коронавируса SARS-CoV-2, характеризуется высокой контагиозностью и большой частотой поражения дыхательной и ряда других систем человеческого организма. Иммун-

ный ответ на попадание SARS-CoV-2 в организм человека включает выработку специфических иммуноглобулинов (Ig) — IgA, IgM и IgG — к структурному белку нуклеокапсида (N-белок), гликопротеину, отвечающему за проникновение в клетку (S-белок), и другим антигенам [1, 2]. В зависимости от типа и уровня содержания имму-

CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF ANTIBODIES TO SARS-COV-2: FROM A QR CODE TO THE REALITY

Ya.D. Shanskiy¹, A.V. Gospodarik¹, A.V. Komarova^{1,2}, S.S. Esiev¹, L.A. Ulakhanova¹, A.S. Serkina¹, L.V. Plotnikova^{1,2}, J.A. Bespyatykh^{1,2,3}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

² Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

³ N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation

Background: The immune response to SARS-CoV-2 includes the production of specific immunoglobulins to protein antigens of SARS-CoV-2. Depending on the type and level of immunoglobulins, it is possible to assess the stage of the disease and evaluate the effectiveness of vaccination. The main approach to the determination of immunoglobulins to SARS-CoV-2 in human biological fluids is enzyme-linked sorbent immunoassay. Its data, in particular, are used to issue an electronic COVID-19 certificate with a QR code. However, the qualitative and quantitative composition of immunoglobulins for a QR code is not officially regulated. **Aim:** measuring the immunoglobulins' level in the human blood serum with different types of immunity to the new coronavirus infection (COVID-19) to select the most informative indicators of protective immunity. **Methods:** The study included 76 blood serum samples from male and female volunteers (age, 18 to 50 y.o.) in compliance with the ethical standards. The detection of IgA, IgM, IgG (total to different regions of SARS-CoV-2, S-protein IgG and RBD-fragment IgG), IgG avidity, and the level of the SARS-CoV-2 N-antigen was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available reagent kits. **Results:** The indicators of the level of antibodies (both "protective" IgG and IgA of the initial phase of infection) are most pronounced in persons who have been vaccinated and have had COVID-19, and least pronounced in unvaccinated people. For recovered unvaccinated individuals, the level of total "protective" antibodies and IgG to the S-protein, including the RBD fragment, is the lowest; the avidity of IgG is lower than that in the other groups, too. The IgG avidity in vaccinated patients is higher than that in recovered ones. It should be noted that there were no differences in the level of both total IgG to SARS-CoV-2, to the S-protein and to the RBD-fragment of the S-protein for recovered and vaccinated individuals. **Conclusion:** The analysis of COVID-19 immunoglobulins indicates a different profile of the humoral immune response following vaccination and previous infection with COVID-19. To quickly assess the immune response to previous and current COVID-19 infection, as well as to detect the post-vaccination immunity, it is advisable to use the total level of IgG to SARS-CoV-2. For deeper assessment of protective immunity and production of protective antibodies, it is better to evaluate the quantitative content of IgG to the S protein and its RBD fragment. The equal level of IgA in the experimental groups indicates an ongoing interaction with SARS CoV-2 in the population. Thus, the electronic COVID-19 certificate is of little use when it is formed by only one of the indicators without taking into account the rest.

Keywords: ELISA; immunoglobulins; COVID-19 testing; SARS-CoV-2.

For citation: Shanskiy YaD, Gospodarik AV, Komarova AV, Esiev SS, Ulakhanova LA, Serkina AS, Plotnikova LV, Bespyatykh JA. Clinical Laboratory Diagnostics of Antibodies to SARS-CoV-2: from a QR Code to the Reality. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):12–20. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract163553>

Submitted 01.02.2023

Revised 21.02.2023

Published 31.03.2023

ноглобулинов можно сделать вывод о стадии заболевания (начальной, разгара заболевания, выздоровления). Кроме того, по уровню антител можно оценить эффективность вакцинопрофилактики, являющейся одним из основных способов профилактики COVID-19.

Основным подходом к определению иммуноглобулинов в биологических жидкостях человека является неконкурентный иммуноферментный

анализ (ИФА) [3]. В настоящий момент в России наличие у гражданина иммунитета к SARS-CoV-2 подтверждается официально по факту проведенной вакцинации и/или ревакцинации, при постановке в медучреждении официального диагноза COVID-19 с внесением сведений о выздоровлении в регистр больных COVID-19, при положительном результате теста на IgG к SARS-CoV-2 в сертифицированных лабораториях, а также в случае поло-

жительного теста полимеразной цепной реакции на SARS-CoV-2. На основании вышеперечисленного гражданину выдается электронный сертификат с QR-кодом, действующий в течение 6 месяцев. Возможность сформировать сертификат при обнаружении антител предусмотрена Приказом Минздрава от 04.02.2022 № 58-н [4], при этом не учитывается, был ли выполнен качественный или количественный анализ IgG. В то же время, согласно временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, для определения уровней иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 необходимо использовать наборы реагентов для количественного определения, а результаты исследований представлять с использованием условных единиц измерения — единиц связывающих антител (binding antibody units, BAU/мл) [5]. В нормативной документации не оговаривается, должны ли это быть IgG, вырабатываемые суммарно к N- и S-белкам SARS-CoV-2, либо к S-белку отдельно, либо к его рецепторсвязывающему домену — RBD-фрагменту (receptor-binding domain), и в каком количестве. Согласно данным последних исследований, в наибольшей степени «защитными» следует считать именно IgG к RBD-фрагменту S-белка [6], и в то же время компоненты иммунитета к COVID-19 не ограничиваются содержанием только IgG. Таким образом, на настоящий момент отсутствует унифицированный показатель гуморального иммунитета, и поиск такого показателя и/или комплекса показателей является актуальной задачей.

Цель исследования — определить уровни иммуноглобулинов в сыворотке крови добровольцев с различными типами иммунитета к новой коронавирусной инфекции (COVID-19) для выбора наиболее информативных показателей защитного иммунитета.

МЕТОДЫ

Критерии соответствия

Критерии включения в группу вакцинированных препаратами «Гам-Ковид-Вак» и «КовиВак»: мужской/женский пол; возраст от 18 до 50 лет; отсутствие антител (IgM и IgG) к вирусу SARS-CoV-2; отсутствие COVID-19 и вакцинации против COVID-19 в анамнезе.

Критерии включения в группу с подтвержденной перенесенной инфекцией COVID-19/вакцинированных препаратом «КовиВак» и подтвержденной перенесенной инфекцией COVID-19/вакцинированных препаратом «Гам-Ковид-Вак» и подтвержденной перенесенной инфекцией COVID-19: добровольцы,

которые перенесли новую коронавирусную инфекцию/добровольцы, которые вакцинированы от COVID-19 «Гам-Ковид-Вак» или «КовиВак» и перенесли новую коронавирусную инфекцию и имели в сыворотке крови антитела к SARS-CoV-2, подтвержденные методом ИФА.

Критерии не включения: ВИЧ, сифилис, гепатит в анамнезе/со слов добровольца; прием лекарственных средств из группы нейролептиков, антидепрессантов, транквилизаторов, антиконвульсантов, антидепрессантов, антибластных средств, а также средств, существенно влияющих на гемодинамику; радиотерапия в течение 3 последних лет; алкоголизм, наркомания, токсикомания в анамнезе; хронические заболевания сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной, кроветворной, иммунной систем, печени, почек; психические заболевания в стадии декомпенсации; ожирение II степени и выше (ИМТ $\geq$ 35); дефицит массы тела (ИМТ $<$ 16); гиперчувствительность к компонентам вакцин; иммунодефицитное состояние; тяжелые аллергические реакции в анамнезе; тяжелые реакции или осложнения на введение иммунобиологических препаратов в анамнезе; острые и хронические заболевания в стадии обострения в течение предшествующих 4 недель; системные воспалительные заболевания; онкологические заболевания в течение предшествующих 3 лет; вакцинация против других инфекционных агентов в течение 30 дней; жалобы на состояние здоровья.

Критерии исключения: новая коронавирусная инфекция, выявленная после проведенной вакцинации; неявка пациентов для проведения вакцинации; выявление параметров, указанных в критериях не включения, после начала исследования.

Условия проведения

Исследование проводили в клинической больнице № 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю.М. Лопухина ФМБА (Одинцово, Московская область, Российская Федерация).

Продолжительность исследования

Исследование проводилось с мая 2021 по май 2022 года.

Описание медицинского вмешательства

Материалы и реагенты. В образцах сыворотки крови 76 добровольцев методом ИФА с использованием коммерческих наборов определяли следующие показатели:

- качественное содержание IgG (наборы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Россия; «SARS-CoV-2 IgG-ИМБИАН-ИФА», ООО «Имбиан Лаб», Россия);
- количественное содержание IgG к коронавирусу (набор «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ», АО «Вектор-Бест», Россия);
- количественное содержание IgG к поверхностному гликопротеину S SARS-CoV-2 (набор «SARS-CoV-2 IgG Spike-количественный-ИМБИАН», ООО «Имбиан Лаб», Россия);
- количественное содержание IgG к RBD SARS-CoV-2 (наборы «SARS-CoV-2 IgG RBD-количественный», ООО «Имбиан Лаб», Россия; «SARS-CoV-2-IgG-ELISA-RBD-Q», ООО «Алель», Россия);
- индекс авидности IgG к RBD SARS-CoV-2 (набор «SARS-CoV-2 IgG RBD Авидность-ИМБИАН-ИФА», ООО «Имбиан Лаб», Россия);
- качественное содержание IgM (набор «SARS-CoV-2 IgM Screen», ООО «Имбиан Лаб», Россия);
- качественное содержание IgA к коронавирусу (набор «SARS-CoV-2 IgA», ООО «Имбиан Лаб», Россия);
- количественное содержание N-белка коронавируса (набор «SARS-CoV-2 Ag-количественный-ИМБИАН-ИФА», ООО «Имбиан Лаб», Россия).

Сбор и хранение образцов крови. У добровольцев, включенных в исследование, отбирали венозную кровь в вакутейнеры объемом 8 мл с активатором свертывания и разделительным гелем. Сыворотку отделяли центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин, аликвотировали и хранили при -80°C до дальнейшего использования.

Иммуноферментный анализ. Методом твердофазного ИФА на аналитическом анализаторе Lazurite (Dynex, США) в 82 образцах сыворотки крови в соответствии с инструкцией производителя определяли показатели, указанные в разделе «Материалы и реагенты». При интерпретации результатов считали, что иммуноглобулины к SARS-CoV-2 обнаружены, если коэффициент позитивности (КП) тестируемого образца $\geq 1,1$ или BAU ≥ 20 . При значении индекса авидности $< 30\%$ считали, что IgG к RBD антигену SARS-CoV-2 в анализируемом образце обладают низкой, при $30\text{--}50\%$ — средней, при $> 50\%$ — высокой авидностью.

Этическая экспертиза

Исследование одобрено ЛЭК ФГБУ ФНКЦ ФХМ им Ю.М. Лопухина ФМБА России № 2022/05/31 от 10.01.2021. Пациентами/добровольцами или их за-

конными представителями 10.01.2021 подписано добровольное информированное согласие на проведение исследования и публикацию его результатов.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2011, CA, США). Для оценки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро–Уилка. Так как распределение данных, вошедших в анализ, было отличным от нормального, то их представляли в виде медианы (Q_2) и минимального–максимального значений (Min–Max). Для графического отображения данных использовали медиану и межквартильный интервал ($Q_1\text{--}Q_3$). Для сравнения множественных несвязанных выборок применяли тест Краскела–Уоллиса. При наличии значимых различий между группами проводили попарные post-hoc сравнения с помощью критерия Тьюки–Крамера. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

В исследование включено 76 добровольцев, стратифицированных по следующим категориям:

- неболевшие и непривитые от SARS-CoV-2 (контроль; $n=10$);
- вакцинированные препаратом «КовиВак», 35-й день после введения первой дозы вакцины ($n=10$);
- вакцинированные препаратом «КовиВак», 172-й день после введения первой дозы вакцины ($n=10$);
- вакцинированные препаратом «Гам-Ковид-Вак» ($n=18$);
- с подтвержденной перенесенной инфекцией COVID-19 ($n=10$; из них с давностью перенесенного заболевания 2 недели — 1, 1 месяц — 3, 2 месяца — 1, 3 месяца — 1, 6 месяцев — 3, 7 месяцев — 1);
- вакцинированные препаратом «КовиВак» и перенесшие подтвержденную инфекцию COVID-19 ($n=10$; давность перенесенного заболевания: 1 месяц — 2, 2 месяца — 2, 4 месяца — 1, 5 месяцев — 1, 6 месяцев — 1, 7 месяцев — 2, 8 месяцев — 1);
- вакцинированные препаратом «Гам-Ковид-Вак» и перенесшие подтвержденную инфекцию COVID-19 ($n=8$; давность перенесенного заболевания: 6 месяцев — 1, 8 месяцев — 1; 1 год — 1, у 5 пациентов давность заболевания установить не удалось).

Основные результаты исследования

Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови. Анализ на наличие IgG является наиболее распространенным (суммарные результаты определения уровня IgG в исследуемых группах приведены на рис. 1).

По результатам ИФА с использованием набора «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» суммарный уровень IgG был выше во всех группах в сравнении с контрольной: медиана значения КП IgG составила 6,48 (Min–Max 0,29–14,85), 9,96 (3,52–14,86), 15,13 (3,60–18,61) для переболевших, вакцинированных, переболевших и вакцинированных и 0,08 (0,06–0,29) для контроля ($p=0,001$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно). Таким образом, наи-

более высокий уровень суммарных IgG у вакцинированных лиц, перенесших COVID-19 ($p=0,012$ и $p < 0,001$ в сравнении с перенесшими инфекцию и вакцинированными соответственно).

Несколько иные значения наблюдали при использовании набора «SARS-CoV-2 IgG-ИМБИАН-ИФА»: соответствующие показатели составили 0,03 (0,03–0,42), 1,72 (0,03–15,68), 1,40 (0,03–16,57), 14,04 (0,05–16,57). В данном случае вакцинированные лица, перенесшие COVID-19, имели также более высокий КП в сравнении с неболевшими, вне зависимости от статуса вакцинации ($p < 0,001$). При использовании наборов обоих производителей не найдено различий между группами переболевших и вакцинированных лиц ($p=0,967$, $p=0,894$).

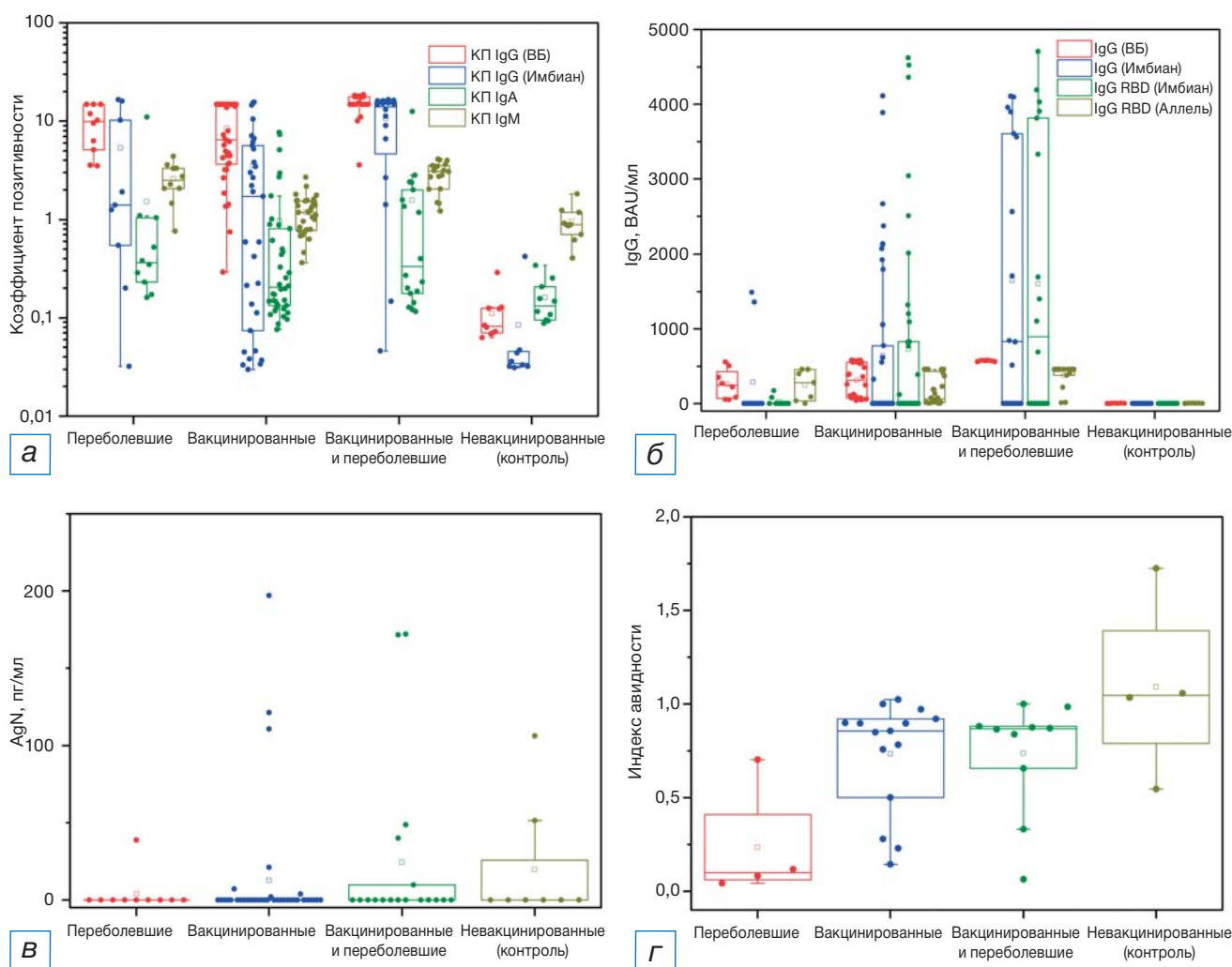


Рис. 1. Сравнительный анализ качественных и количественных показателей иммунного ответа в группах с различным иммунитетом к COVID-19: коэффициент позитивности IgA, IgM, IgG (а); количественное содержание общих IgG и IgG к RBD-домену S-белка (б); количественное содержание N-антигена (в), индекс avidности IgG (г).

Примечание. КП — коэффициент позитивности, ВБ — компания «Вектор БЕСТ»; RBD — рецепторсвязывающий домен.

Fig. 1. Comparison of the qualitative and quantitative indicators of the immune response in groups with different immunity to COVID-19: Ig A, M, G coefficient of positivity (a), total IgG level and RBD-S-protein IgG level (б), N-antigen level (в), IgG avidity index (г).

Note: КП — coefficient of positivity, ВБ — Vector BEST Company; RBD — receptor binding domain.

Аналогичная картина наблюдалась и для количественного уровня IgG (набор «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ»), медиана которого составила 3,35 (0,2–6,8), 310,1 (42,7–581,7), 246,5 (51,5–554,8), 573,5 (560,5–580,7) BAU/мл для переболевших, вакцинированных, переболевших в сочетании с вакцинацией и невакцинированных соответственно.

При использовании набора реагентов «SARS-CoV-2 IgG Spike-количественный-ИМБИАН-ИФА» были получены следующие значения: 0 (0–4110,3), 0 (0–1490,0), 834,1 (0–4106,0) и 0 (0–0) BAU/мл для тех же групп соответственно. Уровень IgG у вакцинированных переболевших значительно выше в сравнении с группой вакцинированных ($p=0,022$) или перенесших инфекцию ($p=0,026$) по отдельности, а также с контролем ($p=0,005$). Различий между группами невакцинированных и переболевших не обнаружено ($p=0,075$).

Различия между группами вакцинированных и невакцинированных лиц были значимыми при использовании набора «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» ($p=0,005$); при использовании набора «SARS-CoV-2 IgG Spike-количественный-ИМБИАН-ИФА» различий выявить не удалось ($p=0,441$). И вакцинированные, и переболевшие COVID-19 имели примерно равный уровень IgG ($p=0,829$, $p=0,711$ для наборов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» и «SARS-CoV-2 IgG Spike-количественный-ИМБИАН-ИФА»).

Уровень IgG к RBD-участку S-белка при использовании набора «SARS-CoV-2 IgG RBD-количественный» составил 0 (0–4621,0), 0 (0–171,6), 896,2 (0–4705,0) и 0 (0–0) для вакцинированных, переболевших, переболевших и вакцинированных и контрольной группы ($p=0,983$, $p=0,520$, $p=0,039$ в сравнении с контролем соответственно). Как и для наборов для качественного и количественного определения IgG, уровень исследованных антител был выше при сочетании вакцинации и перенесенной инфекции в сравнении с перенесенной инфекцией без вакцинации ($p=0,039$). При использовании набора «SARS-CoV-2-IgG-ELISA-RBD-Q» соответствующие значения составили 63,3 (4,3–457,8), 279,7 (2,8–457,5), 457,1 (11,5–457,7) и 4,185 (1,9–6,8) ($p=0,077$, $p=0,145$, $p<0,001$ в сравнении с контролем соответственно). При использовании обоих наборов различий между группами переболевших и вакцинированных лиц не найдено ($p=0,434$, $p=0,236$).

Значения индекса авидности составили 1,05 (0,54–1,73), 0,86 (0,14–1,02), 0,10 (0,04–0,70), 0,87

(0,065–1,00) для невакцинированных, вакцинированных, переболевших и вакцинированных переболевших соответственно. Индекс авидности IgG был наибольшим для невакцинированных и наименьшим для переболевших; для данных групп различия были статистически значимыми ($p=0,004$).

Медиана КП для IgM, выявленных методом захвата, составила 0,88 (Min–Max 0,41–1,82), 1,18 (0,36–2,70), 2,51 (0,77–4,39), 3,10 (1,22–4,12) для невакцинированных, вакцинированных, переболевших и вакцинированных переболевших соответственно. Уровень IgM у переболевших вакцинированных был значимо выше, чем в группах вакцинированных и невакцинированных ($p<0,001$). В то же время у вакцинированных лиц без COVID-19 в анамнезе не было различий в уровне IgM в сравнении с невакцинированными ($p=0,679$).

Величина КП IgA значимо не различалась между группами ($p=0,646$). КП IgA для всех групп варьировал в пределах 0,13–0,33, что указывает на отсутствие IgA в анализируемых образцах сыворотки крови.

ОБСУЖДЕНИЕ

За последние два года значительно увеличился объем знаний о формировании и поддержании иммунитета против SARS-CoV-2. В иммунном ответе участвует ряд факторов, среди которых важное место занимают антитела-иммуноглобулины. Оценка последних важна на разных этапах течения COVID-19, а также при оценке эффективности вакцинации. ИФА сохраняет свою актуальность в диагностике коронавирусной инфекции, в частности, в связи со своей относительно высокой скоростью проведения, что реализуется и в новых тест-системах для прикроватной диагностики (point-of-care), где также определяют IgM и IgG к SARS-CoV-2 [3, 7, 8]. Взаимодействие вируса SARS-CoV-2 с клеткой-мишенью человеческого организма опосредовано S-белком, в частности, его RBD-доменом [9–11]. В связи с этим анализ содержания защитных IgG, вырабатываемых к S-белку и его RBD-фрагменту, является наиболее актуальным на сегодняшний день [6, 11, 12].

В ходе работы проведена сравнительная оценка уровня гуморального иммунитета к COVID-19 с использованием общедоступных методов клинической лабораторной диагностики (рис. 2). Согласно полученным данным, показатели уровня антител (как защитных IgG, так и IgA начальной фазы инфекции) в наибольшей степени выражены у лиц, вакцинированных и перенесших COVID-19, в наименьшей — у невакцинированных (условно здоро-

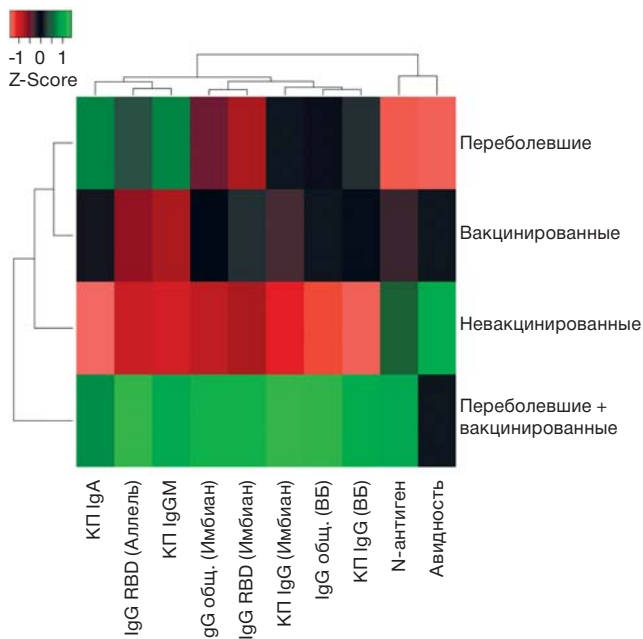


Рис. 2. Сравнение эффективности параметров гуморального иммунитета в изученных группах.

Примечание. ВБ — компания «Вектор БЕСТ»; КП — коэффициент позитивности.

Fig. 2. Comparison of the effectiveness of the humoral immunity parameters in the studied groups.

Note: ВБ — Vector BEST Company; КП — coefficient of positivity.

вые, не имевшие контактов с вирусом SARS-CoV-2). У переболевших отмечались высокий уровень IgM и отсутствие IgA, что может быть связано с особенностями кинетики их накопления. Пациенты перенесли COVID-19 за 0,5–7 месяцев до исследования (у 9 из 10 пациентов данный интервал составил от 1 месяца и более), при этом известно, что IgA после 3-й недели инфицирования постепенно снижаются [13], в то время как IgM могут циркулировать в крови до года [14]. В данном исследовании для групп переболевших (как вакцинированных, так и невакцинированных) не удалось установить наличия значимой корреляции между давностью перенесенного заболевания и уровнем иммуноглобулинов, что может быть связано с небольшим количеством пациентов по каждому из сроков давности COVID-19.

У переболевших невакцинированных лиц уровень общих защитных антител и IgG к S-белку, включая RBD-фрагмент, наиболее низкий; авидность IgG ниже, чем в остальных группах. Следует отметить, что авидность IgG у вакцинированных выше, чем у переболевших, что подтверждается данными более ранних исследований [15]. Можно предположить, что иммунная система пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию, более ак-

тивно использует собственные средства защиты, тем самым избегая контакта с вирусом, и у таких пациентов авидность антител, выработанных после болезни, снижается быстрее.

У невакцинированных был выявлен крайне низкий уровень IgG (КП~1,0), которые, вероятно, только начали вырабатываться в ответ на недавний контакт с вирусом, и такие антитела будут иметь высокую авидность.

У переболевших, привитых вакцинами «Ковивак» и «ГамКовидВак», наблюдается средняя тенденция к продукции антител: уровень IgG ниже, чем у вакцинированных, но перенесших инфекцию, и присутствует более низкий уровень IgM. Следует отметить, что для переболевших COVID-19 и вакцинированных лиц не отмечалось различий в уровне как суммарных IgG к коронавирусу, так и его S-белку и RBD-фрагменту S-белка.

Ограничения исследования

Представленные результаты измерения уровня иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека ограничены имеющимися образцами и требуют валидации на большей выборке для составления более точной характеристики эпидемиологической ситуации относительно COVID-19, что планируется выполнить в дальнейших исследованиях. Параметры уровней иммуноглобулинов могут варьировать в зависимости от ряда факторов, таких как наличие в анамнезе сопутствующих заболеваний, возрастных особенностей, курения, приема медикаментов. Вклад данных факторов не был изучен в представленной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования проведены измерения некоторых показателей гуморального иммунитета, доступных для исследования с помощью коммерчески доступных наборов реагентов для ИФА — IgA, IgM, IgG (суммарные к различным участкам SARS-CoV-2, S-белку и его RBD-фрагменту), авидности IgG и уровня N-антигена SARS-CoV-2. Исследование показало, что уровень суммарных IgG у вакцинированных лиц, перенесших COVID-19, выше, чем у перенесших инфекцию или вакцинированных по отдельности.

В целом, полученные нами данные по уровню иммуноглобулинов COVID-19 свидетельствуют о различном профиле гуморального ответа при вакцинации и перенесенной инфекции COVID-19, а также подтверждают полученные ранее данные

о совокупности факторов иммунитета, участвующих в иммунном ответе на SARS-CoV-2.

Выбор однозначного маркера иммунитета к COVID-19 затруднителен, поскольку будет определяться его видом (поствакцинальный или постинфекционный) и оценкой контакта с возбудителем (недавний или отдаленный). Для быстрой оценки иммунного ответа на перенесенную и текущую инфекцию COVID-19, а также для выявления поствакцинального иммунитета целесообразно использовать общий уровень IgG к SARS-CoV-2. Для более глубокой оценки профилактического иммунитета и выработки защитных антител целесообразно оценивать количественное содержание IgG к S-белку и его RBD-фрагменту.

Таким образом, формирование электронного сертификата COVID-19 лишь по одному из показателей без учета остальных нецелесообразно и зачастую не отображает реального состояния иммунитета.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. Я.Д. Шанский, А.В. Господарик — получение данных для анализа и их анализ, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; С.С. Есиев, Л.А. Улаханова — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; А.В. Комарова, А.С. Серкина, Л.В. Плотникова — получение данных для анализа, Ю.А. Беспятых — концепция исследования, финальное редактирование текста рукописи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. Ya.D. Shansky, A.V. Gospodarik — data acquisition and analysis, literature review, manuscript writing; S.S. Esiev, L.A. Ulahanova — literature review, manuscript writing; A.V. Komarova, A.S. Serkina, L.V. Plotnikova — data acquisition, J.A. Bespyatykh — study concept, final manuscript editing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Научное исследование проведено при поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант № МК-2988.2022.3).

Funding source. This work was supported by the grant of the President of Russian Federation (grant МК-2988.2022.3).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. Authors declare that they have no competing interests.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ООО «ИМБИАН ЛАБ» и ООО НПФ «Литех» и их сотрудникам за содействие в проведении исследования и предоставление коммерческих наборов.

Acknowledgments. The authors are grateful to IMBIAN LAB LLC and Litekh LLC as well as their employees for assistance in conducting the study and providing commercial kits.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Маянский Н.А., Бржозовская Е.А., Стоянова С.С., и др. Динамика концентрации антител к SARS-CoV-2 в течение 12 месяцев после перенесенной инфекции COVID-19 // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2022. № 1. С. 11–13. [Mayansky NA, Brzhozovskaya EA, Stoyanova SS, et al. Dynamic changes in the concentration of anti-SARS-CoV-2 antibodies within 12 months after recovery from COVID-19. *Bulletin of Russian state medical university*. 2022;(1):11–13. (In Russ).] doi: 10.24075/vrgmu.2022.007
2. Kim Y., Lee J.H., Ko G.Y., et al. Quantitative SARS-CoV-2 spike antibody response in COVID-19 patients using three fully automated immunoassays and a surrogate virus neutralization test. *Diagnostics*. 2021;11:1496. doi: 10.3390/diagnostics11081496
3. Yuan H, Chen P, Wan C, et al. Merging microfluidics with luminescence immunoassays for urgent point-of-care diagnostics of COVID-19. *TrAC Trends Anal Chem*. 2022;157: 116814. doi: 10.1016/J.TRAC.2022.116814
4. Drain PK, Ampajwala M, Chappel C, et al. A rapid, high-sensitivity SARS-CoV-2 nucleocapsid immunoassay to aid diagnosis of acute COVID-19 at the point of care: A clinical performance study. *Infect Dis Ther*. 2021;10:753–761. doi: 10.1007/S40121-021-00413-X/FIGURES/2
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 4 февраля 2022 г. N 58н «О внесении изменений в приложения N 3 и N 4 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12.11.2021 N 1053н «Об утверждении формы медицинской документации “Справка о проведенных профилактических прививках против новой коронавирусной инфекции (COVID-19) или наличии медицинских противопоказаний к вакцинации” и порядка ее выдачи, формы медицинской документации “Медицинский сертификат о профилактических прививках против новой коронавирусной инфекции (COVID-19) или медицинских противопоказаниях к вакцинации и (или) перенесенном заболевании, вызванном новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)” и порядка ее ведения, а также формы “Сертификат о профилактических прививках против новой коронавирусной инфекции (Covid-19) или медицинских противопоказаниях к вакцинации и (или) перенесенном заболевании, вызванном новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)”». [The order of the Ministry of Health of the Russian Federation “O vneseniy izmeneniy v prilozheniya N 3 i N 4 k prikazu Ministerstva zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii

- ot 12.11.2021 N 1053n "Ob utverzhdenii formy meditsinskoy dokumentatsii "Spravka o provedennykh profilakticheskikh privivkakh protiv novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19) ili nalichii meditsinskikh protivopokazaniy k vaksinatсии" i poryadka yeye vydachi, formy meditsinskoy dokumentatsii "Meditsinskiy sertifikat o profilakticheskikh privivkakh protiv novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19) ili meditsinskikh protivopokazaniyakh k vaksinatсии i (ili) perenesennom zaboлевanii, vyzvannom novoy koronavirusnoy infektsiyey (COVID-19)" i poryadka yeye vedeniya, a takzhe formy "Sertifikat o profilakticheskikh privivkakh protiv novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19) ili meditsinskikh protivopokazaniyakh k vaksinatсии i (ili) perenesennom zaboлевanii, vyzvannom novoy koronavirusnoy infektsiyey (COVID-19)". (In Russ.) Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202202080016>. Дата обращения: 18.01.2023.
6. Баклаушев В.П., Юсубалиева Г.М., Бычинин М.В., и др. Рациональная стратегия поддержания противовирусного иммунитета к новым вариантам SARS-CoV-2 // *Клиническая практика*. 2022. Т. 13, № 3. С. 43–55. [Baklaushev VP, Yusubalieva GM, Bychinin MV, et al. A rational strategy for the maintenance of antiviral immunity to new SARS-CoV-2 strains. *Journal of Clinical Practice*. 2022;13(3):43–55. (In Russ.)] doi: 10.17816/clinpract111120
 7. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утв. заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации А.Н. Плутницким). [Vremennyye metodicheskiye rekomendatsii «Profilaktika, diagnostika i lecheniye novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19). V. 17 (14.12.2022)» (utv. zamestitelem Ministra zdравookhraneniya Rossiiskoi Federatsii A.N. Plutnitskim). (In Russ.)] Режим доступа: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=438135>. Дата обращения: 18.01.2023.
 8. Zhou Y, Chen Y, Liu W, et al. Development of a rapid and sensitive quantum dot nanobead-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay and its clinical performance for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies. *Sensors Actuators B Chem*. 2021;343:130139. doi: 10.1016/J.SNB.2021.130139
 9. Hajazadeh F, Khanizadeh S, Khodadadi H, et al. SARS-COV-2 RBD (Receptor binding domain) mutations and variants (A sectional-analytical study). *Microb Pathog*. 2022;168:105595. doi: 10.1016/J.MICPATH.2022.105595
 10. Heggstad JT, Kinnammon DS, Olson LB, et al. Multiplexed, quantitative serological profiling of COVID-19 from blood by a point-of-care test. *Sci Adv*. 2021;7:4901–4926. doi: 10.1126/SCIADV.ABG4901
 11. Gan HH, Zinno J, Piano F, Gunsalus KC. Omicron spike protein has a positive electrostatic surface that promotes ACE2 recognition and antibody escape. *Front Virol*. 2022;2:43. doi: 10.3389/FVIRO.2022.894531
 12. Zhuo R, Charlton C, Plitt S, et al. Comparison of SARS-CoV-2 spike antibody quantitative titer reporting using the World Health Organization International Standard Units by four commercial assays. *Journal of Clinical Virology*. 2022;(156):105292. doi: 10.1016/j.jcv.2022.105292
 13. Liao B, Chen Z, Zheng P, et al. Detection of anti-SARS-CoV-2-S2 IgG is more sensitive than anti-RBD IgG in identifying asymptomatic COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2021;12:724763. doi: 10.3389/fimmu.2021.724763
 14. Xiao K, Yang H, Liu B, et al. Antibodies can last for more than 1 year after SARS-CoV-2 infection: A follow-up study from survivors of COVID-19. *Front Med*. 2021;8:967. doi: 10.3389/fmed.2021.684864
 15. Генералова Л.В., Григорьев И.В., Васина Д.В., и др. Свойства антител к RBD у переболевших COVID-19 и вакцинированных препаратом «Спутник V» // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2022. № 1. С. 15–22. [Generalova LV, Grigor'yev IV, Vasina DV, et al. Properties of RBD specific IgG from COVID-19 patients and Sputnik V vaccinated individuals. *Bulletin of Russian state medical university*. 2022;(1):15–22. (In Russ.)] doi: 10.24075/vrgmu.2022.005

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Шанский Ярослав Дмитриевич, к.б.н., н.с.;

адрес: Россия, 119435, Москва,

ул. Малая Пироговская, д. 1А;

e-mail: yar.shansky@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 7640-5940;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>

Соавторы:

Господарик Алина Владимировна, к.б.н., н.с.;

e-mail: alina.gospodaryk@rcpcm.org

Комарова Анастасия Валерьевна, м.н.с.;

e-mail: komaanasta@yandex.ru; eLibrary SPIN: 3694-1084

Есиев Сулейман Сергеевич;

e-mail: kap20081@gmail.com; eLibrary SPIN: 9593-2893

Улаханова Людмила Алексеевна, м.н.с.;

e-mail: ulahanova@mail.ru; eLibrary SPIN: 6284-8699

Серкина Анна Сергеевна;

e-mail: anny.serkina@yandex.ru

Плотникова Людмила Владимировна;

e-mail: ntmdfs@gmail.com

Беспярых Юлия Андреевна, к.б.н., доцент;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 6003-9246;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Yaroslav D. Shansky, PhD, Research Associate;

address: 1A Malaya Pirogovskaya street,

119435 Moscow, Russia;

e-mail: yar.shansky@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 7640-5940;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>

Co-authors:

Alina V. Gospodarik, PhD, Research Associate;

e-mail: alina.gospodaryk@rcpcm.org

Anastacia V. Komarova, Junior Research Associate;

e-mail: komaanasta@yandex.ru; eLibrary SPIN: 3694-1084

Sulejman S. Esiev;

e-mail: kap20081@gmail.com; eLibrary SPIN: 9593-2893

Ludmila A. Ulakhanova, Junior Research Associate;

e-mail: ulahanova@mail.ru; eLibrary SPIN: 6284-8699

Anna S. Serkina;

e-mail: anny.serkina@yandex.ru

Lyudmila V. Plotnikova;

e-mail: ntmdfs@gmail.com

Julia A. Bespyatykh, PhD, Assistant Professor;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 6003-9246;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОРАЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ТЯЖЕЛОМ ТЕЧЕНИИ COVID-19

А.А. Каниболоцкий^{1, 2}, О.В. Зайратьянц³

¹ Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента, Москва, Российская Федерация

³ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Поражение нервной системы при COVID-19 отражает системный характер инфекции. Вопрос прямой нейротропности SARS-CoV-2 остается открытым. Описаны неиммунологические, иммунологические и цитопатические механизмы действия вируса на центральную нервную систему, реализуемые за счет коагулопатии, ассоциированной с гипоксически-ишемическим повреждением головного мозга, нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера и эндотелиальной дисфункцией и возможной вирусной нейроинвазией с развитием нейроиммунного ответа. Несмотря на большое число публикаций, посвященных COVID-19, до сих пор нет четкого понимания патогенетических механизмов, лежащих в основе морфологических изменений центральной нервной системы, вызванных SARS-CoV-2. **Цель исследования** — охарактеризовать морфологические и иммуногистохимические изменения различных отделов головного мозга при тяжелом течении COVID-19. **Методы.** Проведен анализ морфологических изменений головного мозга на аутопсийном материале, полученном от 25 больных, страдавших тяжелым течением COVID-19. Смерть наступила в первые 30 дней от начала заболевания (средний срок заболевания составил 3 недели). Головной мозг фиксировали в течение 4 недель в 10% растворе забуференного нейтрального формалина. Разрезы головного мозга проводили по методу Фишера, забирали фрагменты из разных отделов головного мозга; полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону и Нисслию; проводили иммуногистохимическое исследование с антителами к S-белку SARS-CoV-2, макрофагам (CD68) и цитотоксическим Т-лимфоцитам (CD8). **Результаты.** При микроскопическом исследовании в разных отделах головного мозга и его оболочках обнаружены признаки нарушения кровообращения: полнокровие артериол, венул и капилляров, стазы эритроцитов и тромбозы, мелкие периваскулярные кровоизлияния; признаки периваскулярного и перинейронального отека, пикнотические изменения цитоплазмы и ядер нервных клеток, спонгиозные изменения в зоне коры и субэпендимальных отделах, дистрофические и некротические изменения нервных клеток; слабая и умеренная пролиферация глии по ходу нервных волокон, периваскулярный астроцитоз, перинейрональный сателлитоз. В 10 наблюдениях в нейронах и астроцитах выявлена положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к спайк-белку SARS-CoV-2. Воспалительная реакция, оцениваемая по количеству CD8 и CD68-позитивных клеток, была слабой. Выявлены многочисленные крахмалистые (амилоидоподобные) тельца в коре и белом веществе в области боковых желудочков, центральной части обонятельного анализатора и в стволе мозга. **Заключение.** Выявлены две группы диффузных морфологических изменений вещества головного мозга при тяжелом течении COVID-19: к первой группе относятся нарушения кровообращения, отек, дистрофически-некротические изменения нейронов, пролиферация глии; ко второй — воспалительно-дегенеративные изменения, такие как инвазия вируса в клеточные элементы вещества мозга, слабая воспалительная реакция и крахмалистые (амилоидоподобные) тельца, которые наряду с гибелью нейронов и глиозом служат четкими признаками нейродегенерации. С изменениями второй группы связано возможное развитие тяжелых неврологических осложнений COVID-19, в частности, описанных в литературе энцефалитов, а также дегенеративных и аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы у реконвалесцентов. Выявленные при морфологическом исследовании сосудистые, нейродегенеративные и провоспалительные изменения головного мозга при тяжелом течении COVID-19 следует учитывать при наблюдении и лечении пациентов в период реконвалесценции.

Ключевые слова: тяжелое течение COVID-19; поражение головного мозга; пути проникновения; нейротропность SARS-CoV-2; спайк-белок; проницаемость гематоэнцефалического барьера; эндотелиальная дисфункция.

Для цитирования: Каниболоцкий А.А., Зайратьянц О.В. Морфологические особенности поражения головного мозга при тяжелом течении COVID-19. *Клиническая практика*. 2023;14(1):21–30. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract176827>

Поступила 01.02.2023

Принята 14.03.2023

Опубликована 31.03.2023

MORPHOLOGICAL FEATURES OF BRAIN DAMAGE IN SEVERE COVID-19

A.A. Kanibolotskiy^{1,2}, O.V. Zayratyants³

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation

² Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management, Moscow, Russian Federation

³ Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russian Federation

Background: The damage to the nervous system in COVID-19 reflects the systemic nature of the infection. The question of the neuroinvasive potential of SARS-CoV-2 remains open, the role of "pseudovirions" in the development of the endothelial dysfunction, as well as of the S1 subunit in the TLR activation, and the importance of the blood-brain barrier are discussed. The immunological, non-immunological, and cytopathic mechanisms of the virus's action are described; there is no clear understanding of the genesis of neuropathological changes caused by SARS-CoV-2. In this tragic pandemic, the lessons of the dead should help save lives and health. **Aim:** to study and explain the features of brain damage in COVID-19. **Methods:** Brain fragments from 20 patients who died due to severe COVID-19 were studied, the sections were stained with hematoxylin and eosin, according to van Gieson and Nissl, IHC reactions were performed with antibodies to the S-protein, CD68 and CD8, the changes were compared with those related to the lethal outcomes of pancreatic necrosis and ruptured aortic aneurysm. **Results:** The following changes in the olfactory analyzer were revealed: sharp edema, dystrophic changes in neurons, gliosis, accumulations of starchy bodies, which explains the neuronal pathway of SARS-CoV-2 invasion; vascular plethora, erythrocytosis and thrombosis, perivascular hemorrhages, diffuse edema, macroglia proliferation, perivascular astrocytosis and satellite. A positive reaction with the antibodies to the S1 and S2 subunits of the spike protein was detected, while the result of the reaction with antibodies to the N-protein of the virus, confirming the active replication of the virus, was doubtful. The S-protein expression in individual endothelial cells makes the transendothelial route of the virus entry unlikely, in contrast to the hematogenous and neuronal pathways. The viral DNA was not detected by PCR. A weak inflammatory reaction was revealed in the form of perivascular accumulations of lymphocytes, scattered T-lymphocytes. **Conclusions:** 2 groups of changes were identified, the first group included circulatory disorders with a tendency to thrombosis, edema, dystrophic-necrotic changes in neurons, glial proliferation, the second group included inflammatory-degenerative changes, a weak inflammatory reaction and amyloid-like bodies. Further morphometric and statistical studies are needed to obtain the reliable conclusions.

Keywords: severe covid-19; brain damage; penetration; neurotropic SARS-CoV-2; spike-beam; permeability of the hematoencephalic barrier; endothelial dysfunction.

For citation: Kanibolotskiy AA, Zayratyants OV. Morphological Features of Brain Damage in Severe COVID-19. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):21–30. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract176827>

Submitted 01.02.2023

Revised 14.03.2023

Published 31.03.2023

ОБОСНОВАНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнений системный характер новой коронавирусной инфекции, так как при COVID-19 поражаются многие системы организма, в том числе центральная нервная (ЦНС). По данным литературы, частота выявления симптомов поражения ЦНС, таких как головная боль, головокружение, слабость, расстройства обоняния, вкусового и зрительного анализаторов, у больных COVID-19 достигает 88%. Симптомы наблюдаются как в остром периоде, так и после перенесенного заболевания, при этом ряд авторов указывает на повышение частоты их выявления с течением времени [1–5], что может быть обусловлено длительной персистенцией SARS-CoV-2 в головном мозге, подтвержденной методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6].

По данным патологоанатомических вскрытий в Москве, при COVID-19 выявляется следующая патология головного мозга: геморрагический синдром, тромботическая микроангиопатия, васкулит, менингит, тромбоз синусов твердой мозговой оболочки; ишемические инфаркты, кровоизлияния, гипоксическая и метаболическая энцефалопатия, тромботическая микроангиопатия, энцефалит [7, 8].

Вопрос о прямой нейротропности SARS-CoV-2 остается открытым. Обсуждается роль «псевдовиреонов» — белков, кодируемых геном SARS-CoV-2, таких как nsр2, nsр5, с145а, nsр7, которые повышают уровень фактора Виллебранда, экспрессию интерлейкина 6, воздействуют на белки эндотелиальных клеток, белки плотных контактов, вызывая эндотелиальную дисфункцию с повышением проницаемости сосудистой стенки [9]. Важная роль придается субъединице S1 спайк-белка SARS-CoV-2, которая рассматривается в качестве патогенассоциированного молекулярного паттерна (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), вызывающего нейровоспалительные процессы независимо от вирусной инфекции путем активации TLR2 и TLR4 рецепторов [10]. Показаны механизмы неблагоприятного воздействия SARS-CoV-2 на гематоэнцефалический барьер, изменения проницаемости которого развиваются вследствие нарушения плотных контактов эндотелиальных клеток, их прямого повреждения вирусом, нарушения транспортных путей и их рецепторного аппарата, активации астроцитов и микроглии, а также миграции периферических иммунных клеток в ЦНС [11, 12].

Описаны неиммунологические, иммунологические и цитопатические механизмы действия ви-

руса на ЦНС, реализуемые за счет коагулопатии, ассоциированной с гипоксическим и ишемическим повреждением головного мозга, нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера и эндотелиальной дисфункцией, с возможным проникновением вируса в мозг и развитием нейроиммунного ответа [13–18].

Несмотря на большое число публикаций, посвященных COVID-19, до сих пор нет четкого понимания патогенетических механизмов, лежащих в основе морфологических изменений ЦНС под влиянием SARS-CoV-2. После объявления Всемирной организацией здравоохранения пандемии COVID-19 для всех медицинских работников, включая патологоанатомов, оптимизация работы в целях оказания любой помощи в борьбе с пандемией является приоритетной задачей. В резолюции прошедшего в июне 2022 года в Новосибирске съезда Российского общества патологоанатомов одобрена и признана приоритетной разработка вопросов патогенеза и патологической анатомии новой коронавирусной инфекции COVID-19 и ее последствий с использованием всего арсенала современных высокотехнологичных методов исследования.

Учитывая особенности ЦНС и трудности при сборе образцов, вскрытие головного мозга остается золотым стандартом для изучения морфологических изменений головного мозга при COVID-19 [19–21].

Цель исследования — охарактеризовать морфологические и иммуногистохимические изменения различных отделов головного мозга при тяжелом течении COVID-19.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Неэкспериментальное (обсервационное) аналитическое ретроспективное рандомизированное неинтервенционное продольное исследование.

В данном исследовании проведен детальный анализ морфологических изменений головного мозга в 25 летальных исходах больных с тяжелым течением COVID-19, проходивших лечение в ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения Москвы (далее — Институт) в период с 2020 по 2022 г.

Критерии соответствия

Критерии включения: положительный результат ПЦР-исследования мазка изо рта и зева на наличие SARS-CoV-2.

Критерии исключения: острая постгипоксическая энцефалопатия/смерть мозга; острое нарушение мозгового кровообращения; наличие в анамнезе болезни Паркинсона, Альцгеймера, других демиелинизирующих заболеваний нервной системы; возраст старше 75 лет.

Описание вмешательства

Головной мозг фиксировали в течение 4 недель в 10% растворе забуференного нейтрального формалина, после чего промывали проточной водой и проводили макроскопическое исследование. Разрезы головного мозга проводили по модифицированному методу Фишера, т.е. фронтальными разрезами через каждые 1–1,5 см с использованием макротомы, позволяющего получать серийные срезы головного мозга [22, 23].

Проводили забор фрагментов головного мозга из его различных отделов: блуждающие нервы, обонятельные луковицы и тракты, глазные нервы, префронтальная кора, моторная кора, базальные ядра (скорлупа, бледный шар, тело хвостатого ядра со стенкой центральной части бокового желудочка мозга), обонятельные треугольники, крючки гиппокампа, кора островков, миндалевидные ядра и периамигдаллярная кора, задний отдел гипоталамуса с сосцевидными телами, чувствительная кора, вентральные 2/3 таламусов со стенками III желудочка мозга, аммоновы рога с гиппокампальными извилинами, кора верхних и нижних теменных долей слева, центральная часть среднего мозга на уровне нижних бугорков четверохолмия, половины моста на уровне полного раскрытия IV желудочка мозга, участок моста мозга в области корешка левого тройничного нерва, кора полушарий мозжечка в области хорошо выраженных зубчатых ядер, зубчатые ядра, участок моста мозга в области корешков слуховых и лицевых нервов, сегмент шейного отдела спинного мозга, продолговатый мозг на уровне пирамид, продолговатый мозг на уровне нижних олив, поясные извилины лобных долей. Кроме этого, оценивали сонные артерии и артерии виллизиева круга (их также забирали для дальнейшего исследования). Таким образом, оценку морфологических изменений вещества головного мозга проводили на большом объеме материала.

Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методам ван Гизона и Ниссля. Проводили иммуногистохимические реакции с антителами к S1 и S2 субъединицам спайк-белка и N-белку SARS-CoV-2, CD68 для оценки выражен-

ности активации микроглии и CD8 для выявления цитотоксических Т-лимфоцитов.

Этическая экспертиза

Дизайн и особенности настоящего исследования рассмотрены на заседании Комитета по биомедицинской этике Института (ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы) 15.06.2021.

Статистический анализ

Результаты патологоанатомических исследований представлены в предварительном виде, так как набор и исследование материала продолжаются. Статистическая обработка будет выполнена позднее.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты исследования

Большинство пациентов (23 из 25) умерли в первые 30 дней заболевания (средний срок заболевания составил 3 недели), 1 пациентка умерла через 5 недель, еще 1 — через 61 день от начала заболевания. Средний срок пребывания пациентов в клинике составил 10 дней.

Среди умерших пациентов было 15 женщин в возрасте от 34 лет до 81 года (средний возраст 65,3 года) и 10 мужчин в возрасте от 26 лет до 71 года (средний возраст 55,3 года), соотношение женщин и мужчин — 1,5:1.

У 4 (16%) пациентов из 25 во время обследования были выявлены симптомы дисциркуляторной энцефалопатии, когнитивные нарушения, выраженные интеллектуально-мнестические расстройства, снижение памяти. По анамнестическим данным, расстройств ЦНС, предшествующих COVID-19, не зафиксировано. У 1 (4%) пациента во время пребывания в клинике отмечены клаустрофобия и панические атаки; у 1 (4%) пациентки течение COVID-19 осложнилось кровоизлиянием в головной мозг, развившимся на фоне гипертонической болезни и ожирения.

Течение COVID-19 у всех пациентов было тяжелым, сопровождалось развитием вирусно-бактериальной пневмонии с дыхательной недостаточностью, потребовавшей искусственной вентиляции легких у 23 (92%) пациентов, у 12 (48%) — трахеостомии, у 3 (12%) — подключения системы экстракорпоральной мембранной оксигенации.

Непосредственной причиной смерти, по результатам патологоанатомических вскрытий, у 18 (72%)

умерших явился острый респираторный дистресс-синдром, обусловленный вирусной или вирусно-бактериальной пневмонией. У 3 (12%) умерших пациентов непосредственной причиной смерти была легочно-сердечная недостаточность, у 2 (8%) — массивная тромбоэмболия легочной артерии, у 1 (4%) — сепсис, еще у 1 (4%) — инфаркт миокарда с разрывом и гемотампонадой полости перикарда.

Необходимо отметить, что у всех умерших пациентов по клинико-анамнестическим данным и результатам патологоанатомических вскрытий выявлена коморбидная патология в виде гипертонической болезни (у 17/25; 68%), ожирения (у 11; 44%), постинфарктного кардиосклероза и ишемической кардиомиопатии (у 10; 40%), сахарного диабета (у 5; 20%), цирроза печени (у 2; 8%), хронической обструктивной болезни легких (у 1; 4%). У 19 (76%) пациентов выявлено сочетание нескольких коморбидных с COVID-19 заболеваний. Известно, что коморбидность является predisposing фактором развития неблагоприятных исходов при заражении SARS-CoV-2 [24, 25].

Во всех наблюдениях диагноз новой коронавирусной инфекции подтвержден анамнестическими, клиническими, рентгенологическими и морфологическими данными, положительной прижизненной и посмертной ПЦР-диагностикой SARS-CoV-2.

Основные результаты исследования

При микроскопическом исследовании в разных отделах головного мозга обнаружены признаки нарушения кровообращения: полнокровие артериол, венул и капилляров; стазы эритроцитов (рис. 1) и тромбозы; мелкие периваскулярные кровоизлияния. Выявленные изменения обнаружены в веществе головного мозга и его оболочках.

У всех умерших во всех исследованных областях головного мозга обнаружены признаки периваскулярного и перинейронального отека с пикнотическими изменениями цитоплазмы и ядер нервных клеток. В зоне коры, а также в субэпендимальных отделах белого вещества больших полушарий выявлены более выраженные явления отека в виде спонгиозных изменений (рис. 2).

В разных отделах головного мозга обнаружены более тяжелые дистрофические изменения нервных клеток в виде гидропической трансформации с вакуолизацией цитоплазмы и ядер, а также признаки некроза и цитолиза по типу изменений в результате ишемического повреждения нейронов (рис. 3).

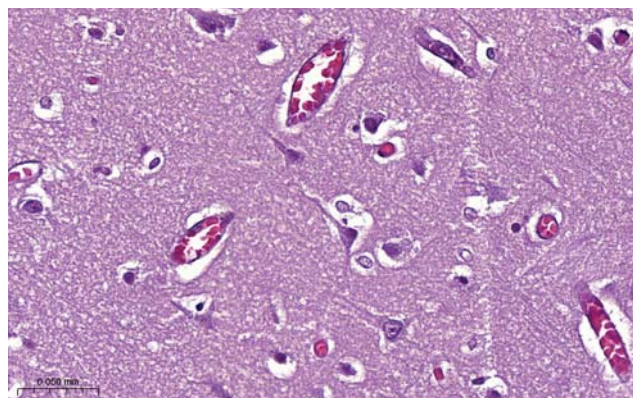


Рис. 1. Головной мозг: полнокровие, стазы эритроцитов в капиллярах. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

Fig. 1. Brain, hematoxylin and eosin stained section shows hyperemia, erythrocyte stasis in capillary vessels, scale bar 50 μ m.

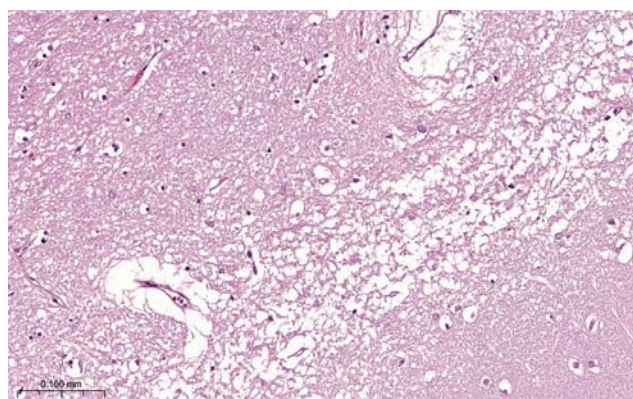


Рис. 2. Головной мозг: явления отека в виде спонгиозных изменений. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

Fig. 2. Brain, edema with spongy changes. Hematoxylin and eosin staining, scale bar 100 μ m.

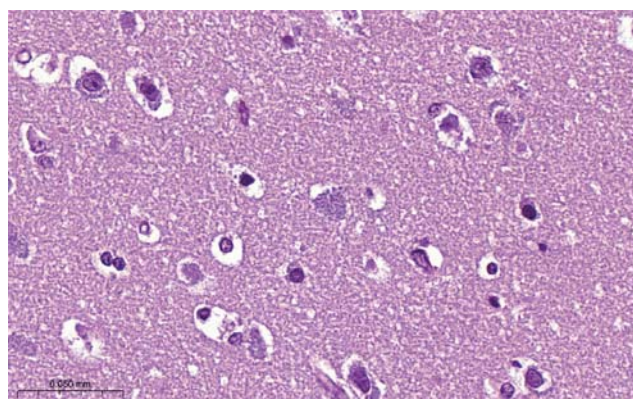


Рис. 3. Головной мозг: признаки некроза и цитолиза по типу изменений в результате ишемического повреждения нейронов. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

Fig. 3. Brain, ischemic damage like signs of necrosis and cytolysis of neurons. Hematoxylin and eosin staining, scale bar 50 μ m.

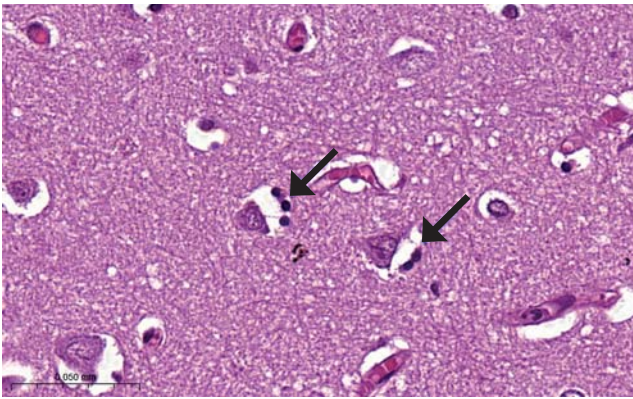


Рис. 4. Головной мозг: перинейрональный сателлитоз (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

Fig. 4. Brain, perineuronal satellitosis (arrows). Hematoxylin and eosin staining, scale bar 50 μ m.

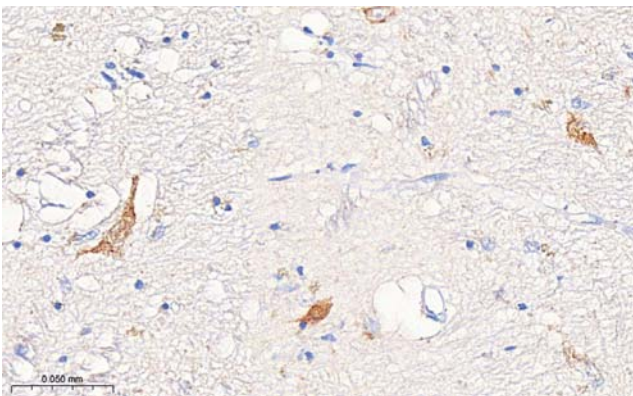


Рис. 5. Головной мозг: положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к S1-субъединице спайк-белка SARS-CoV-2 в нейронах и астроцитах. Масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

Fig. 5. Brain, positive immunohistochemical reaction with antibodies to the S1 subunit of the SARS-CoV-2 spike protein in neurons and astrocytes. Scale bar 50 μ m.

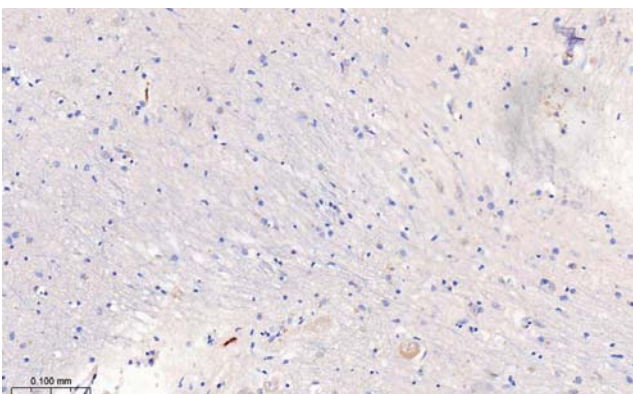


Рис. 6. Головной мозг: положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к CD68. Масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

Fig. 6. Brain, positive immunohistochemical reaction with antibodies to CD68. Hematoxylin and eosin staining, scale bar 50 μ m.

Наряду с изменениями в коре и субэпендимальных отделах больших полушарий головного мозга, спонгиозные и дистрофические изменения выявлены и в различных отделах центральной части обонятельного анализатора: в обонятельных трактах, луковцах и треугольниках, продолговатом мозге, что может служить объяснением описанного в работах различных авторов нейронального пути проникновения SARS-CoV-2 в ЦНС [16, 18, 26].

Во всех наблюдениях выявлена глиальная реакция в виде слабой и умеренной пролиферации глии по ходу нервных волокон, периваскулярного астроцитоза, а также перинейронального сателлитоза, т.е. скоплений глиальных клеток вокруг нейронов, главным образом в коре разных отделов полушарий мозга, что подтверждает данные литературы [15] (рис. 4).

В 10 наблюдениях в различных отделах обонятельного анализатора и продолговатом мозге, а также в нейронах и астроцитах других отделов головного мозга выявлена положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к S1 и S2 субъединицам спайк-белка SARS-CoV-2 (рис. 5). Именно инфицированию SARS-CoV-2 астроцитов через NRP1-рецепторы (нейропилин 1) придается в настоящее время важная роль в понимании поражения нейронов при COVID-19. По данным исследователей из Бразилии, SARS-CoV-2, инфицируя астроциты, нарушает в них процессы метаболизма, поскольку цель метаболических процессов в астроцитах — поддержание жизнеспособности нейронов, их изменения влияют на морфофункциональное состояние нейронов. В одной из публикаций описано критическое для поддержания жизнеспособности нейронов при новой коронавирусной инфекции снижение уровня пирувата и лактата (энергетического субстрата для нейронов) в астроцитах [27].

Результат слабоположительной иммуногистохимической реакции с антителами к N-белку SARS-CoV-2 в единичных нейронах расценен нами как сомнительный, достоверного подтверждения активной репликации SARS-CoV-2 в веществе головного мозга методом иммуногистохимического исследования не получено, как и в подобных исследованиях других авторов [28, 29].

Экспрессия S-белка SARS-CoV-2 выявлена лишь в единичных эндотелиоцитах.

Несмотря на наличие структурных элементов SARS-CoV-2, воспалительная реакция в тканях головного мозга в виде лимфоцитарной инфильтрации и активации микроглии, оцениваемая по количеству CD68-позитивных клеток, была слабой (рис. 6).

Выявлены немногочисленные диффузно расположенные, преимущественно цитотоксические CD8-позитивные Т-лимфоциты, а также их небольшие периваскулярные скопления в белом веществе полушарий большого мозга и мозжечка и в стволе мозга (рис. 7).

Особое внимание обращает на себя наличие многочисленных крахмалистых (амилоидоподобных) телец вокруг микрососудов под оболочками разных отделов головного мозга и белом веществе области боковых желудочков, во всех исследованных отделах центральной части обонятельного анализатора (обонятельных луковицах, трактах и треугольниках), в крючках гиппокампа, стволе мозга, что нередко сочеталось с выраженными спонгиозными изменениями, обусловленными отеком (рис. 8). Крахмалистые (амилоидоподобные) тельца — это сферические базофильные включения, обнаруживаемые в отростках астроцитов и иногда в аксонах, количество которых увеличивается с возрастом преимущественно в субпиальных и субэпендимальных областях вокруг мелких сосудов [30].

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленные при исследовании признаки нарушения кровообращения при COVID-19 в других органах, прежде всего в легких, подтверждают системный характер поражения при данном заболевании.

Признаки периваскулярного и перинейронального отека, тяжелые дистрофические изменения нервных клеток в виде гидропической трансформации с вакуолизацией цитоплазмы и ядер, признаками некроза и цитолиза объясняются ишемическим повреждением нейронов вследствие нарушения гемодинамики в сочетании с выраженной эндогенной интоксикацией при тяжелом течении заболевания, относящихся к описываемым в литературе неиммунологическим механизмам действия SARS-CoV-2.

С начала пандемии в литературе были описаны три вероятных пути проникновения SARS-CoV-2 в головной мозг: гематогенный, связанный с нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера; трансэндотелиальный; нейрональный, или путь ретроградного аксонального транспорта. Выявленная в нашем исследовании экспрессия S-белка SARS-CoV-2 лишь в единичных эндотелиоцитах ставит под сомнение трансэндотелиальный путь проникновения вируса в головной мозг. В ра-

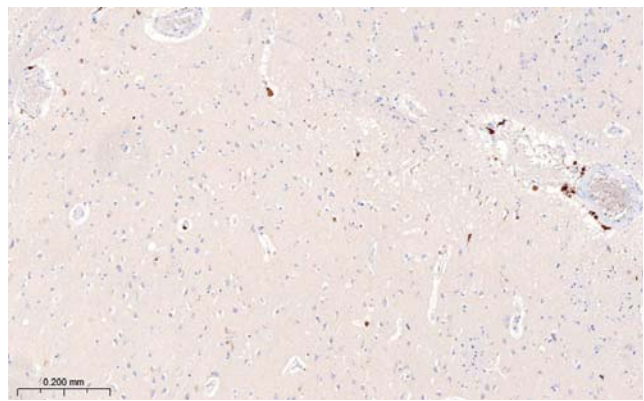


Рис. 7. Головной мозг: положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к CD8. Масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

Fig. 7. Brain, positive immunohistochemical reaction with antibodies to CD8. Hematoxylin and eosin staining, scale bar 50 μm.

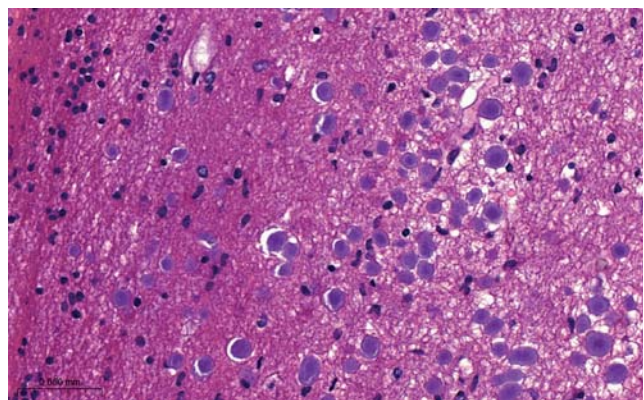


Рис. 8. Головной мозг: многочисленные крахмалистые (амилоидные) тельца. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

Fig. 8. Brain, numerous corpora amylacea. Hematoxylin and eosin staining, scale bar 100 μm.

боте обнаружены признаки, подтверждающие описываемый другими авторами нейрональный путь проникновения SARS-CoV-2 в ЦНС. Трансэпителиальный (трансназальный) путь подтверждается выявлением в 10 наблюдениях в различных отделах обонятельного анализатора и продолговатом мозге положительной иммуногистохимической реакции с антителами к S1 и S2 субъединицам спайк-белка SARS-CoV-2.

В исследовании подтверждены также описываемые в литературных источниках иммунологические механизмы воздействия вируса SARS-CoV-2. Во всех наблюдениях определялась глиальная реакция. Воспалительная реакция на наличие белков SARS-CoV-2 в веществе головного мозга во всех наблюдениях была слабой.

Признаков активной репликации SARS-CoV-2 в веществе головного мозга нами не выявлено, что может объясняться длительностью заболевания на момент наступления летального исхода.

Выявление многочисленных крахмалистых (амилоидоподобных) телец в различных отделах обонятельного анализатора у умерших от COVID-19 пациентов могут объяснить длительно существующие расстройства обоняния у пациентов, перенесших COVID-19, однако данная гипотеза требует дополнительного подтверждения в связи с преимущественно пожилым возрастом умерших пациентов исследуемой группы.

Выявленные нами на аутопсийном материале диффузные морфологические изменения вещества головного мозга при тяжелом течении COVID-19 по механизму образования можно разделить на две группы.

К первой группе относятся:

- нарушения кровообращения с полнокровием артериол, венул и капилляров, стазами эритроцитов и тромбозом сосудов, периваскулярными кровоизлияниями;
- признаки периваскулярного и перинейронального отека с пикнотическими изменениями цитоплазмы и ядер нервных клеток, а в зоне коры и в субэпендимальных отделах белого вещества больших полушарий — спонгиозными изменениями;
- более тяжелые дистрофические изменения нервных клеток в виде гидропической трансформации с вакуолизацией цитоплазмы и ядер, признаками некроза и цитолиза по типу изменений в результате ишемического повреждения нейронов;
- глиальная реакция в виде слабой и умеренной пролиферации глии по ходу нервных волокон, периваскулярного астроцитоза, а также перинейронального сателлитоза.

Эти изменения обусловлены главным образом пневмонией, коагулопатией и другими проявлениями инфекции, сопровождающимися гипоксией и ишемией головного мозга. Изменения сосудистой системы могут обуславливать нарушения мозгового кровообращения и прогрессирование дисциркуляторной энцефалопатии и сосудистой деменции у пациентов пожилого и старческого возраста с COVID-19.

Ко второй группе относятся:

- воспалительно-дегенеративные изменения с положительной иммуногистохимической реакцией

с антителами к S1 и S2 субъединицам спайк-белка SARS-CoV-2 в нейронах и астроцитах;

- слабая воспалительная реакция в тканях головного мозга в виде лимфоцитарной инфильтрации и активации микроглии, оцениваемая по количеству CD68-позитивных клеток, а также немногочисленным диффузно расположенным преимущественно цитотоксическим CD8-позитивным Т-лимфоцитам с их мелкими периваскулярными скоплениями в белом веществе полушарий большого мозга и мозжечка и в стволе мозга;
- наличие многочисленных крахмалистых (амилоидоподобных) телец в области микрососудов в поверхностных участках разных отделов головного мозга и белом веществе в области боковых желудочков и центральной части обонятельного анализатора.

С изменениями второй группы связано возможное развитие тяжелых неврологических осложнений COVID-19, в частности, описанных в литературе энцефалитов, а также дегенеративных и аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы у реконвалесцентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного нами исследования частично подтверждают опубликованные в отечественных и зарубежных работах данные по основным путям проникновения SARS-CoV-2 в ЦНС, патогенетическим механизмам влияния COVID-19 на головной мозг, включая иммунологические и неиммунологические механизмы. Вместе с тем нами высказано сомнение по поводу важной роли транс-эндотелиального пути проникновения вируса в головной мозг, который опровергается выявленной экспрессией S-белка SARS-CoV-2 лишь в единичных эндотелиоцитах в исследованных препаратах головного мозга.

Вопрос нейроинвазивного нейротропного потенциала SARS-CoV-2 остается открытым и требует проведения дальнейших исследований. По нашим данным, SARS-CoV-2 обнаруживается в ЦНС, однако признаков его активной репликации нами не выявлено. Результаты проведенных исследований могут свидетельствовать в пользу системного характера поражения при COVID-19, в том числе ЦНС.

Выявленные особенности летальных исходов пациентов при тяжелом течении COVID-19 с учетом возраста, пола, наличия коморбидной патологии, а также обнаруженные при морфологическом

исследовании сосудистые, нейродегенеративные и провоспалительные изменения головного мозга следует учитывать при наблюдении и лечении пациентов в период реконвалесценции.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Authors' contribution. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Funding source. The study had no sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that there is no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Каниболоцкий А.А., Рачин А.П. Постковидный синдром: от морфологии до медицинской реабилитации // Постпандемия: новые векторы развития здравоохранения и здоровья: сборник докладов III Научно-методического форума организаторов здравоохранения, Москва, 07–09 декабря 2021 года. Москва: Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы, 2021. С. 174–183. [Kanibolotsky AA, Rachin AP. Postcovid syndrome: from morphology to medical rehabilitation. In: Postpandemia: New vectors of healthcare and health development: Collection of reports of the III Scientific and Methodological Forum of Healthcare Organizers, Moscow, December 07–09, 2021. Moscow: Scientific Research Institute of Healthcare Organization and Medical Management of the Department of Healthcare of the City of Moscow; 2021. P. 174–183. (In Russ).]
- Abboud H, Abboud FZ, Kharbouch H, et al. COVID-19 and SARS-CoV-2 infection: Pathophysiology and clinical effects on the nervous system. *World Neurosurg.* 2020;(140):49–53. doi: 10.1016/j.wneu.2020.05.193
- Koralnik IJ, Tyler KL. COVID-19: A global threat to the nervous system. *Ann Neurol.* 2020;88(1):1–11. doi: 10.1002/ana.25807
- Premraj L, Kannapadi NV, Briggs J, et al. Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. *J Neurol Sci.* 2022;(434):120162. doi: 10.1016/j.jns.2022.120162
- Белопасов В.В., Журавлева Е.Н., Нугманова Н.П., Абдраштова А.Т. Постковидные неврологические синдромы // *Клиническая практика.* 2021. Т. 12, № 2. С. 69–82. [Belopasov VV, Zhuravleva EN, Nugmanova NP, Abdrashitova TA. Postcovid neurological syndromes. *Clin Practice.* 2021;12(2):69–82. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract71137
- Петриков С.С., Годков М.А., Каниболоцкий А.А., и др. Результаты ПЦР-тестирования на наличие SARS-CoV материала из различных органов пациентов, умерших в постковидный период от причин, непосредственно не связанных с COVID-19 // *Инфекционные болезни.* 2022. Т. 20, № 1. С. 5–15. [Petrikov SS, Godkov MA, Kanibolotsky AA, et al. Results of PCR testing for the presence of SARS-CoV material from various organs of patients who died in the postcovid period from causes not directly related to COVID-19. *Infectious Dis.* 2022;20(1):5–15. (In Russ).] doi: 10.20953/1729-9225-2022-1-5-15
- Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Михалева Л.М., и др. Патологическая анатомия COVID-19: Атлас / под общей ред. О.В. Зайратьянца. Москва, 2020. 140 с. [Zairatyants OV, Samsonova MV, Mikhaleva LM, et al. Pathological anatomy of COVID-19: Atlas. Ed. by O.V. Zairatyants. Moscow; 2020. 140 p. (In Russ).]
- Зайратьянц О.В., Каниболоцкий А.А., Михалева Л.М., и др. Новая коронавирусная инфекция (Covid-19), организация работы московской патологоанатомической службы: методические рекомендации. Москва, 2022. 49 с. [Zairatyants OV, Kanibolotsky AA, Mikhaleva LM, et al. New coronavirus infection (Covid-19), organization of work of the Moscow pathology service: methodological recommendations. Moscow; 2022. 49 p. (In Russ).]
- Rauti R, Shahoha M, Leichtmann-Bardoogo Y, et al. Effect of SARS-CoV-2 proteins on vascular permeability. *Elife.* 2021; 10:e69314. doi: 10.7554/eLife.69314
- Frank MG, Nguyen KH, Ball JB, et al. SARS-CoV-2 spike S1 subunit induces neuroinflammatory, microglial and behavioral sickness responses: Evidence of PAMP-like properties. *Brain Behav Immun.* 2022;(100):267–277. doi: 10.1016/j.bbi.2021.12.007
- Erickson MA, Rhea EM, Knopp RC, Banks WA. Interactions of SARS-CoV-2 with the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2681. doi: 10.3390/ijms22052681
- Huang X, Hussain B, Chang J. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: Effects and mechanisms. *CNS Neurosci Ther.* 2021;27(1):36–47. doi: 10.1111/cns.13569
- Jha NK, Ojha S, Jha SK, et al. Evidence of coronavirus (CoV) pathogenesis and emerging pathogen SARS-CoV-2 in the nervous system: A review on neurological impairments and manifestations. *J Mol Neurosci.* 2021;71(11):2192–2209. doi: 10.1007/s12031-020-01767-6
- Balcom EF, Nath A, Power C. Acute and chronic neurological disorders in COVID-19: Potential mechanisms of disease. *Brain.* 2021;144(12):3576–3588. doi: 10.1093/brain/awab302
- Kleinschmidt-De Masters BK, Pekmezci M, Rodriguez F, Tihan T. Diagnostic pathology: Neuropathology, 3rd ed. Elsevier; 2022. P. 803–808.
- Евдокименко А.Н., Ануфриев П.Л., Каниболоцкий А.А., Келли Е.И. Инвазия и персистенция SARS-CoV-2 в центральной нервной системе: взгляд нейроморфолога // *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений.* 2022. № 2. С. 49–55. [Evdokimenko AN, Anufriev PL, Kanibolotsky AA, Kelly EI. Invasion and persistence of SARS-CoV-2 in the central nervous system: A neuromorphologist's view. *Bulletin National Soc Study Parkinson's Dis Movement Disorders.* 2022;(2):49–55. (In Russ).]
- Рамазанов Г.Р., Шарифов Р.А., Ахматханова Л.Х., и др. Вирусассоциированная некротизирующая диссеминированная острая лейкоэнцефалопатия // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2022. Т. 21, № 4. С. 35–43. [Ramazanov GR, Sharifov RA, Akhmatkhanova LH, et al. Virus-associated necrotizing disseminated acute leukoencephalopathy. *Bulletin Smolensk State Med Academy.* 2022; 21(4):35–43. (In Russ).]

18. Белопасов В.В., Яшу Я., Самойлова Е.М., Баклаушев В.П. Поражение нервной системы при COVID-19 // *Клиническая практика*. 2020. Т. 11, № 2. С. 60–80. [Belopasov VV, Yashu Y, Samoylova EM, Baklaushev VP. Lesion of the nervous system in COVID-19. *J Clin Pract*. 2020;11(2):60–80. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract34851
19. Mukerji SS, Solomon IH. What can we learn from brain autopsies in COVID-19? *Neurosci Lett*. 2021;(742):135528. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135528
20. Vasquez-Bonilla WO, Orozco R, Argueta V, et al. A review of the main histopathological findings in Coronavirus Disease 2019. *Hum Pathol*. 2020;(105):74–83. doi: 10.1016/j.humpath.2020.07.023
21. Fisicaro F, Di Napoli M, Liberto A, et al. Neurological sequelae in patients with COVID-19: A histopathological perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(4):1415. doi: 10.3390/ijerph18041415
22. Науменко В.Г., Грехов В.В. Методика исследования головного мозга при черепно-мозговой травме // *Судебно-медицинская экспертиза*. 1964. № 3. С. 51–57. [Naumenko VG, Grekhov VV. Methods of brain research in traumatic brain injury. *Forensic Med Examination*. 1964;(3):51–57. (In Russ).]
23. Добровольский Г.Ф. Методологические основы топографической нейроморфологии и нейропатоморфологии головного мозга, черепа и шейного отдела позвоночника. Часть 1. Москва: Эдем, 2023. 148 с. [Dobrovolsky GF. Methodological foundations of topographic neuromorphology and neuropathomorphology of the brain, skull and cervical spine. Part 1. Moscow: Edem; 2023. 148 p. (In Russ).]
24. Зайратьянц О.В., Поляню Н.И., Каниболоцкий А.А. Коморбидные заболевания (в том числе у умерших от коронавирусной инфекции) // *Труды научно-исследовательского института организации здравоохранения и медицинского менеджмента: сборник научных трудов*. Москва, 2020. С. 137–141. [Zairatyants OV, Polyanko NI, Kanibolotsky AA. Comorbid diseases (including those who died from coronavirus infection. In: Proceedings of the Research Institute of Health Organization and Medical Management. Collection of scientific papers. Moscow; 2020. P. 137–141. (In Russ).]
25. Петриков С.С., Абучина В.М., Алиджанова Х.Г., и др. Диагностика и интенсивная терапия больных COVID-19: руководство для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 432 с. [Petrkov SS, Abuchina VM, Alidzhanova HG, et al. Diagnosis and intensive care of COVID-19 patients: A guide for doctors. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. 432 p. (In Russ).] doi: 10.33029/9704-6340-6-DIT-2021-1-432
26. Sieracka J, Sieracki P, Kozera G, et al. COVID-19--neuropathological point of view, pathobiology, and dilemmas after the first year of the pandemic struggle. *Folia Neuropathol*. 2021;59(1):1–16. doi: 10.5114/fn.2021.105128
27. Crunfli F, Carregari VC, Veras FP, et al. Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(35):e2200960119. doi: 10.1073/pnas.2200960119
28. Cascarina SM, Ross ED. Phase separation by the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: Consensus and open questions. *J Biol Chem*. 2022;298(3):101677. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101677
29. Ramani A, Müller L, Ostermann PN, et al. SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J*. 2020; 39(20):e106230. doi: 10.15252/emboj.2020106230
30. Escourolle and poirier's manual of basic neuropathology, Six ed., edited by F. Gray, C. Duyckaerts, U. De Girolami. Oxford; 2019. 443 p.

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Каниболоцкий Александр Алексеевич;

адрес: Россия, 129090, Москва,

1-й Коптевский переулок, д. 5;

e-mail: dr.kaa@mail.ru; eLibrary SPIN: 3976-1662

Соавторы:

Олег Вадимович Зайратьянц, д.м.н., профессор;

e-mail: ovzair@mail.ru; eLibrary SPIN: 4817-1084;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Aleksander A. Kanibolotskiy;

address: 5 1st Koptelsky Lane, Moscow,

129090, Russia;

e-mail: dr.kaa@mail.ru; eLibrary SPIN: 3976-1662

Co-authors:

Oleg V. Zayratyants, MD, PhD, Professor;

e-mail: ovzair@mail.ru; eLibrary SPIN: 4817-1084;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

ЦЕЛЕВАЯ ТРЕНИРОВКА ФУНКЦИИ ХОДЬБЫ ПО ПАРАМЕТРАМ ПЕРИОДА ОПОРЫ И ОДИНОЧНОЙ ОПОРЫ У БОЛЬНЫХ В РАННЕМ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА

Д.В. Скворцов^{1, 2, 3}, С.Н. Кауркин^{1, 2, 3}, Г.Е. Иванова^{1, 3}, А.Ю. Суворов^{1, 3}

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

² Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий, Москва, Российская Федерация

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Значимыми базовыми параметрами ходьбы являются периоды опоры и одиночной опоры на конечность (период опоры — это все время опоры конечности, а период одиночной опоры — когда только одна конечность на опоре). Оба периода могут быть использованы в качестве целевых для тренировки с биологической обратной связью. **Цель исследования** — изучить эффективность обеих целевых параметров для тренировки функции ходьбы с биологической обратной связью у больных в раннем восстановительном периоде церебрального инсульта. **Методы.** В исследовании участвовало 40 пациентов по 20 человек в каждой группе, которым был проведен курс тренировки по гармонизации ходьбы: в первой группе — по периоду опоры, во второй — по периоду одиночной опоры. В контрольную группу вошли 20 здоровых человек. Исследовали пространственно-временные параметры ходьбы в произвольном темпе в начале и по окончании курса тренировки, а также классические клинические шкалы. Тренировка на беговой дорожке состояла из 10 сессий. **Результаты.** Клинические и биомеханические параметры ходьбы продемонстрировали достоверное улучшение показателей, при этом биомеханические показатели второй группы свидетельствовали о более тяжелом функциональном состоянии до начала лечения при одинаковых клинических параметрах по шкалам Бартел, Ривермид, Рэнкин, реабилитационной маршрутизации и мануальному мышечному тестированию. В первой группе получены косвенные данные о возможном влиянии на тренировку целевого показателя и прямые — о его влиянии на функцию здоровой конечности, что также позволяет увеличить нагрузку на паретичную конечность. Во второй группе достоверных данных о влиянии тренировки с биологической обратной связью на функциональный результат не получено. **Заключение.** Согласно результатам исследования, классическая клиническая оценка состояния пациента может не соответствовать инструментальному функциональному исследованию ходьбы. При использовании целевого параметра тренировки «период опоры» получены косвенные свидетельства того, какая тренировка эффективна.

Ключевые слова: тренировка; биологическая обратная связь; ранний восстановительный период инсульта; биомеханика ходьбы.

Для цитирования: Скворцов Д.В., Кауркин С.Н., Иванова Г.Е., Суворов А.Ю. Целевая тренировка функции ходьбы по параметрам периода опоры и одиночной опоры у больных в раннем восстановительном периоде церебрального инсульта. *Клиническая практика*. 2023;14(1):31–43. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract112483>

Поступила 10.11.2022

Принята 07.12.2022

Опубликована 30.12.2022

ОБОСНОВАНИЕ

Биологическая обратная связь (БОС) как метод восстановления двигательной функции и функции ходьбы в частности стала использоваться относительно недавно. В имеющихся публикациях данный метод оценивается, прежде всего, в качестве пер-

спективного [1]. Эффективность, которая отмечается большинством авторов, тем не менее остается предметом дискуссии [1–3]. Это связано с тем, что еще относительно недавно не было технической возможности использовать биомеханические параметры ходьбы в качестве целевых параметров

TARGETED TRAINING OF THE FUNCTION OF WALKING ACCORDING TO THE STANCE AND SINGLE SUPPORT PHASE IN PATIENTS IN THE EARLY RECOVERY PERIOD OF CEREBRAL STROKE

D.V. Skvortsov^{1, 2, 3}, S.N. Kaurkin^{1, 2, 3}, G.E. Ivanova^{1, 3}, A.Yu. Suvorov^{1, 3}

¹ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

² Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

³ Federal Center for Brain research and neurotechnologies Neurotechnology, Moscow, Russian Federation

Background: The phases of support and single support on a limb are significant basic parameters of walking (phase of support means the whole limb support time, while the phase of single support is when only one limb is on the ground). Both can be used as targets for biofeedback training. **Aim:** to investigate the effectiveness of both target parameters for training the function of walking with biofeedback in patients in the early recovery period of cerebral stroke. **Methods:** The study involved 40 patients, 20 in each group, who underwent a training course to harmonize walking: the first group — for the period of support, and the second group — for the period of single support. The control group of healthy people also consisted of 20 people. We studied the spatiotemporal parameters of walking at an arbitrary pace at the beginning and after the end of the training course, as well as classical clinical scales. The treadmill training consisted of 10 sessions. **Results:** The clinical and biomechanical parameters of walking changed their values in the direction of a significant improvement in the performance. At the same time, the biomechanical parameters of the second group indicated a more severe functional state before the start of the treatment, with the same clinical parameters according to the Barthel scale, Rivermead Mobility Index, modified Rankin scale, rehabilitation routing scale, and manual muscle testing. In the first group, indirect data were obtained on the possible effect of the target indicator on the training and direct data on its effect on the function of a healthy limb, which also allows increasing the load on the paretic one. In the second group, there were no reliable data on the effect of biofeedback training on the functional outcome. **Conclusion:** The conducted study showed that the classical clinical assessment of the patient's condition may not correspond to the instrumental functional study of walking. When using the support period as the training target parameter, indirect evidence was obtained that such a training is effective.

Keywords: biofeedback; training early recovery; period of a stroke; gait analysis.

For citation: Skvortsov DV, Kaurkin SN, Ivanova GE, Suvorov AYu. Targeted training of the function of walking according to the stance and single support phase in patients in the early recovery period of cerebral stroke. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):31–43. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract112483>

Submitted 10.11.2022

Revised 07.12.2022

Published 30.12.2022

для тренировки. Данное обстоятельство связано с самой природой основных биомеханических параметров ходьбы, которые требуют специальных средств регистрации. Развитие технологий регистрации различных физиологических параметров, в том числе и биомеханических, дало техническую возможность применения именно биомеханических параметров ходьбы для тренировки с БОС. Такую тренировку стали применять при различной патологии функции движения, в том числе при церебральном инсульте.

Один из последних аналитических обзоров о применении целенаправленной тренировки с БОС по биомеханическим параметрам ходь-

бы при церебральном инсульте был выполнен J. Spencer и соавт. [1]. В работе отмечается, что предшествующие исследования демонстрируют смешанные результаты применения различных целевых параметров для тренировки ходьбы у больных после церебрального инсульта, однако такие тренировки определенно оказывают влияние на функцию ходьбы.

Одна из существенных технических трудностей осуществления БОС — это необходимость точной и быстрой регистрации параметров ходьбы в реальном режиме времени, чтобы их можно было использовать для БОС [2–5]. При этом применение портативных сенсоров для задач БОС-тренировок

может представлять определенное решение технических проблем [6]. Такие сенсоры также представляют интерес и для систем удаленной реабилитации [6].

J.J. Tate и С.Е. Milner [7] в своем исследовании определили четыре основных целевых параметра для БОС-тренировки ходьбы: по электромиограмме (целевым параметром является амплитуда активности мышцы); кинематическим параметрам (движения определенных сегментов или суставов в определенные фазы ходьбы); кинетическим параметрам (генерация определенных усилий в определенные фазы ходьбы); пространственно-временным характеристикам ходьбы.

Режимы обратной связи [1] предполагают использование визуальной, звуковой, тактильной обратной связи или их комбинации, при этом наиболее применимы визуальная и звуковая обратная связь. Тактильная обратная связь применяется чаще всего в виде носимых вибрационных устройств. Собственно, визуальная часть представляет собой виртуальную трехмерную среду, где пациент может осуществлять некоторые действия, близкие по характеру с реальными жизненными процессами [8]. При этом управляющими являются параметры функции ходьбы. Такие тренировки способны существенно увеличить скорость ходьбы по сравнению с обычной тренировкой на тредмиле [9]. В ряде исследований показано, что звуковая обратная связь для пациентов, перенесших церебральный инсульт, может давать результаты лучше, чем визуальная [10, 11]. Однако, если к основному целевому сигналу, осуществляющему БОС, прибавить дополнительный (в другой модальности), то это позволит улучшить результат БОС-воздействия [12].

По поводу использования различных типов параметров на сегодняшний день имеются следующие результаты. В обзоре [1] отмечается, что тренировки с БОС по электромиограмме не показали каких-либо существенных изменений. Вероятнее всего, потому, что имеющиеся случаи БОС в ходьбе по параметрам электромиограммы включали только воздействие на трехглавую мышцу голени, что нельзя признать достаточным. Кроме этого, сами протоколы использования электромиографии для БОС-тренировки имеют вариативность, что снижает возможность сравнения их эффективности.

БОС с использованием кинематических параметров (регистрирующий гониометр на коленном суставе) показала уменьшение пассивного замыка-

ния коленного сустава у больных после церебрального инсульта [13, 14].

БОС с использованием кинетических параметров применяется более часто, что обусловлено, скорее всего, достаточно большим выбором регистрирующих приборов. Это могут быть как динамометрические платформы, так и специальные педобарографические стельки, вкладываемые в обувь [15], или другие устройства. В проведенных исследованиях [15, 16] получены положительные результаты такой тренировки. Имеется положительный опыт использования в качестве целевого параметра отдельных экстремумов реакции опоры в переднезаднем направлении [17]. Такие исследования представляют значительный интерес, поскольку силы пропульсии и торможения являются одними из ведущих в кинетике ходьбы.

Использование БОС-тренировки по пространственно-временным параметрам с целевыми показателями длины или ширины шага показали противоречивые результаты у больных после церебрального инсульта [7, 18, 19]. Исследование А. Brasileiro и соавт. [20] не обнаружило увеличения длины шага при использовании этого параметра в качестве целевого. Еще меньшее распространение имеет использование ширины шага как целевого параметра [21]. В рандомизированном контролируемом исследовании высокого качества, проведенном М. Druzicki и соавт. [18], не удалось продемонстрировать значительного улучшения качества походки после тренировки с БОС по длине шага в сравнении с обычными тренировками на беговой дорожке. Наше предшествующее исследование [22, 23] показало, что в раннем восстановительном периоде церебрального инсульта относительно короткие периоды тренировок, общей длительностью не превышающие 3 нед и состоящие в среднем из 10 тренировок, проводимых по целевому показателю «период опоры» (все время опоры конечности), не позволяют сделать однозначного заключения и требуют дальнейшего изучения. При этом временные параметры являются одними из базовых и определяющих функциональное состояние, из них два определяют, насколько конечность сохраняет свою функцию опоры: это параметры «период опоры» и «период одиночной опоры» (только одна конечность на опоре). В отношении второго параметра в доступной литературе не удалось обнаружить соответствующих исследований.

J. Spencer и соавт. [1] по поводу порядка применения БОС-тренировки, включающей длитель-

ность самих тренировок, их частоту, повторяемость и количество, отмечают в своем обзоре очень высокую вариабельность: от единичных тренировок, где сравниваются параметры до и после выполнения упражнений, до нескольких последовательных тренировок. Количество варьирует от 3 до 20 тренировок, а их время — от 11 до 30 мин. Частота тренировок изменяется от трех в неделю до двух ежедневно. Авторы приходят к заключению, что данные параметры требуют дальнейшего изучения, и оптимальные их параметры могут зависеть от многих факторов, включая стадию течения церебрального инсульта.

Цель исследования — изучить динамику восстановления функции ходьбы у больных в раннем восстановительном периоде церебрального инсульта в результате применения технологий целенаправленных БОС-тренировок с воздействием на базовые параметры ходьбы — периоды опоры.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Экспериментальное, проспективное, рандомизированное, интервенционное, продольное, пилотное.

Критерии соответствия

Критерии включения: пациенты с гемипарезом в раннем восстановительном периоде впервые возникшего полушарного ишемического инсульта; возраст до 75 лет; функциональная готовность к вертикализации; адекватная реакция на пробу с ортостазом; возможность держать вертикальную стойку в течение не менее минуты; ходьба без посторонних вспомогательных предметов; ясное сознание с уровнем бодрствования, достаточным для усвоения и выполнения инструкций при проведении исследования и тренировок; отсутствие когнитивных нарушений, препятствующих пониманию поставленных исследователем задач; отсутствие сенсомоторной афазии; наличие тонуса в мышцах нижней конечности выше 2 баллов по модифицированной шкале спастичности Ашфорт (Modified Ashworth Scale); отсутствие декомпенсированной соматической патологии, ишемических изменений на электрокардиограмме, сердечной недостаточности (II класс и выше по Killip); отсутствие заболеваний центральной и периферической нервной системы, помимо инсульта, сопровождающихся неврологическим дефицитом (последствия травм, опухолей, полинейропатии и т.п.); отсутствие ортопедической патологии (суставные деформации

и контрактуры, выраженный болевой синдром, ампутации конечностей и др.).

Критерии исключения: неадекватная реакция сердечно-сосудистой системы во время проведения тренировки; страх ходьбы по тредмилу; отказ пациента от проведения лечебных мероприятий; отрицательная динамика неврологического и/или соматического статуса.

Условия проведения

Исследование проводилось в период с 2020 по 2022 г. в лаборатории Научно-исследовательского центра медицинской реабилитации ФГБУ ФЦМН ФМБА России.

Описание медицинского вмешательства

В исследовании принимали участие две группы пациентов (по 20 человек в каждой) с гемипарезом в раннем восстановительном периоде впервые возникшего полушарного ишемического инсульта и группа контроля, состоящая из 20 здоровых испытуемых. Испытуемым проводились курсы БОС-тренировок по пространственно-временным параметрам ходьбы — периоду опоры и периоду одиночной опоры.

Методика оценки функции ходьбы

Объективную диагностику функции ходьбы выполняли с помощью комплекса «Стэдис» (Нейрософт, Иваново). С помощью эластичных удерживающих лент на область крестца, верхнюю треть бедра и нижнюю треть голени с наружных сторон, тыла обеих стоп производили фиксацию семи инерционных сенсоров «Нейросенс». Каждый сенсор имеет возможность записи амплитудных параметров исследуемых суставов и функциональной электромиографии. Регистрировались электрическая активность прямой мышцы бедра, суммарная активность двуглавой и полусухожильной мышцы, передней большеберцовой мышцы и суммарная активность наружной и внутренней головок трехглавой. Использовали одноразовые поверхностные электроды Mederen (Китай).

Калибровка сенсоров осуществлялась в нейтральном положении пациента: стоя прямо, стопы на ширине плеч, руки выпрямлены вдоль тела, тазобедренные и коленные суставы выпрямлены. Регистрацию биомеханических параметров производили во время ходьбы пациента в произвольном темпе на дистанции 10 м, который разворачивался каждый раз в конце и снова продолжал движение.

Согласно базовым установкам программы, шаги с неустановившимися параметрами (разгон и торможение) программное обеспечение автоматически отбрасывает. Остальные циклы шага калькулируются. Регистрация завершается по истечении 60 сек или при достижении 40 циклов шага.

В процессе исследования нейросеть программного обеспечения определяла циклы шага (ЦШ) для каждой нижней конечности и в соответствии с ними рассчитывала другие параметры ЦШ. Для последующей оценки регистрировали пространственно-временные биомеханические параметры. К временным относились длительность ЦШ (в сек); коэффициент ритмичности (симметрии): отношение времени опоры (stance phase) меньшее к большему; частота шагов (в шагах в минуту; ш/мин). Отдельные временные периоды ЦШ (в % от ЦШ): период опоры (ПО), период одиночной опоры (ОО), суммарный период двойной опоры (ДО) и параметр начала ЦШ другой ноги (начало второй двойной опоры, НВД). Пространственные параметры — высота подъема стопы (clearance) (ВПС; в см); скорость ходьбы (V ; в км/ч); длина ЦШ (в см).

Методика БОС-тренировки

Система «Стэдис» обладает функционалом для целевой БОС-тренировки ходьбы по выбранному пространственно-временному параметру. Оценка ходьбы проводится посредством двух сенсоров «Нейросенс», закрепленных в нижней трети голени с наружной стороны эластичными лентами. Первым этапом пациент с установленными сенсорами становится на беговую дорожку, после чего дорожку включают и выбирают режим скорости, комфортный для пациента. В начале каждой тренировочной сессии на медицинском тредмиле производится двухминутная оценка пространственно-временных параметров ходьбы (temporospatial). По окончании выводится отчет с пространственно-временными параметрами ходьбы с отметками параметров, выходящих за пределы нормы.

Далее отмечается параметр, который будет использован для тренировки (для первой группы испытуемых использовали параметр «период опоры», для второй группы — параметр «одиночная опора»), после чего проводится БОС-тренировка (рис. 1), где выбранный параметр отображается в виде столбиков с отметками планируемого диапазона изменений. Выход за установленный диапазон показывается как ошибочный, при этом замедляются передвижение по виртуальной среде и выполнение

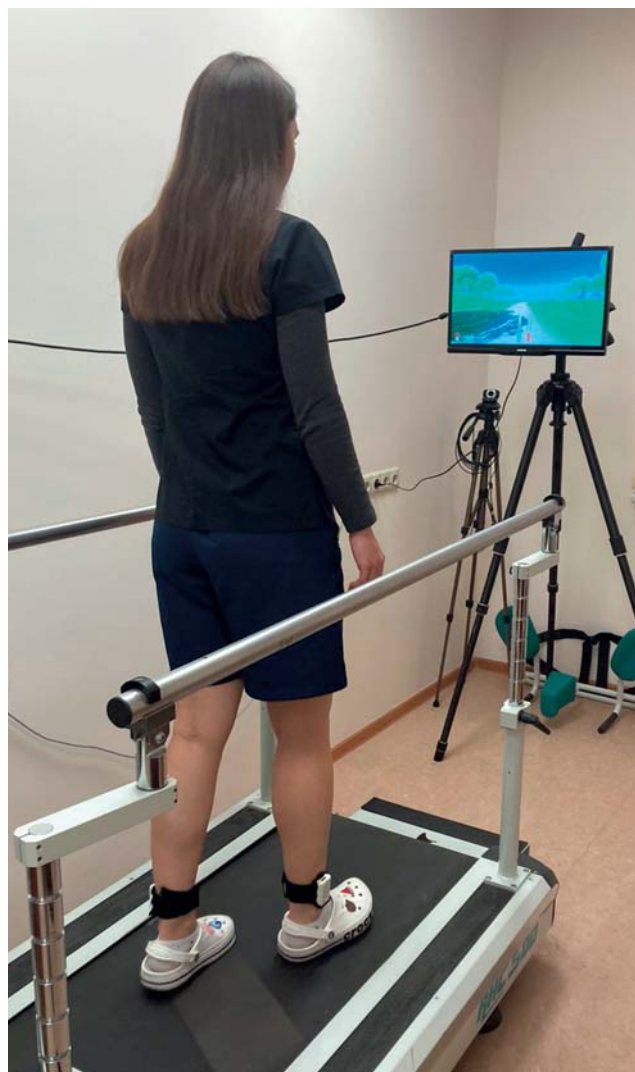


Рис. 1. Процесс тренировки.

Fig. 1. The training process.

требуемого в виртуальной среде задания. Автоматический алгоритм тренировки настроен таким образом, что при успешном выполнении диапазон изменений корректируется в сторону большей симметрии параметров.

Тренировка проводилась в автоматическом режиме до утомления пациента. При необходимости границы допустимых колебаний выбранного параметра можно было отрегулировать вручную. БОС-тренировка осуществлялась исходя из тех возможностей, которые были посильны пациентам и технически осуществимы в течение их пребывания в стационаре. Пациенты находились в стационаре разное количество дней в зависимости от канала госпитализации, что влияло на количество занятий. Таким образом, необходимо было осуществить не менее восьми тренировок. В группе тренировки по параметру «период опоры» (ГПО) коли-

чество процедур составило 8–11 ($9,2 \pm 2,12$), в группе тренировки по параметру «период одиночной опоры» (ГОО) — тоже 8–11 ($9,6 \pm 0,94$). Статистических различий не было.

Длительность тренировки при строгом соответствии всем критериям включения и исключения во многом определяется состоянием пациента на момент ее проведения. Тренировочная сессия проводилась до появления признаков утомления (жалобы пациента на усталость или визуальная картина напряжения). Кроме этого, принимали во внимание регресс параметров тренировки: отсутствие динамики изменения тренируемых параметров, снижение ритмичности движения, увеличение пределов изменения тренируемого параметра (все это отображается на мониторе оператора). В среднем длительность тренировки для ГПО составила 17,53 мин (от 15,14 и до 20,39), а для ГОО — 19,06 мин (от 13,03 и до 25,06). При сравнении параметров средней длительности тренировки исследуемых групп получено достоверное различие в виде большего времени тренировки в ГОО ($p < 0,05$).

Марка используемого тредмила — Runner RHC500 (Air Machine, Италия). Скорость ходьбы пациентов на тренировке изменялась согласно субъективным ощущениям пациентов и критериям безопасности проведения тренировки. Средняя скорость ходьбы пациентов для ГПО составила $1,06 \pm 0,47$ км/ч (от 0,35 и до 2,10 км/ч), для ГОО — $0,99 \pm 0,37$ км/ч (от 0,34 и до 1,71 км/ч). Статистических различий не было.

Для удобства применения в условиях лаборатории, когда положение монитора для БОС-среды было оптимальным позади дорожки, использовали режим скорости назад. С учетом того, что скорость ходьбы пациентов была незначительной, режима движения назад оказалось достаточным.

Этическая экспертиза

Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации с получением письменного согласия пациента на участие в исследовании и одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ ФЦМН ФМБА России (ЭК ФЦМН ФМБА № 7 от 19.07.2021).

Статистический анализ

Обработка полученных результатов проведена стандартными методами описательной вариационной статистики с расчетом средних значений и среднеквадратичного отклонения. Использован

программный пакет STATISTICA 12. Оценку достоверности различий выполняли с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни с критерием $p < 0,05$. Проводили сравнительную оценку аналогичных параметров контралатеральной и паретичной сторон с показателями группы здоровых добровольцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

Группы пациентов с гемипарезом в раннем восстановительном периоде впервые возникшего полужарного ишемического инсульта (по 20 человек в каждой) делили слепым рандомизированным методом по способу воздействия на тренировке. Группа, получавшая тренировку по параметру «период опоры» (ГПО), состояла из 15 мужчин и 5 женщин, из них 9 с правополужарным поражением головного мозга, 11 — с левополужарным, средний возраст $49,05 \pm 12,44$ (23–65) лет, средний рост $176,35 \pm 8,52$ см (159–195), средний вес $79,50 \pm 13,34$ кг (49–102), дней после острого нарушения мозгового кровообращения $113,05 \pm 47,96$ (28–179). Группа, получавшая тренировку по параметру «одиночная опора» (ГОО), включала 10 мужчин и 10 женщин, из них 11 с правополужарным поражением головного мозга, 9 — с левополужарным, средний возраст $55,05 \pm 11,50$ (35–74) лет, средний рост $174,40 \pm 8,12$ см (159–187), средний вес $78,90 \pm 10,78$ кг (59–95), дней после острого нарушения мозгового кровообращения $100,75 \pm 58,65$ (25–179).

Группу контроля составили 20 практически здоровых женщин ($n=10$) и мужчин ($n=10$), средний возраст $28,8 \pm 3,66$ (23–35) лет, средний рост $176,8 \pm 5,53$ см (168–188), средний вес $76,25 \pm 14,09$ кг (55–100), не имеющих в анамнезе травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Основные результаты исследования

Результаты исследования динамики состояния по шкалам оценки функциональных исходов представлены в табл. 1. Наблюдается достоверное улучшение по всем используемым шкалам ($p < 0,05$).

Результаты исследования динамики по шкале оценки мышечной силы (Medical Research Council Weakness Scale, MRC) представлены в табл. 2. В результате проведенного лечения наблюдается достоверное улучшение по всем мышечным группам в обоих исследуемых коллективах ($p < 0,05$).

Данные анализа пространственно-временных параметров ходьбы представлены в табл. 3. Пара-

Таблица 1 / Table 1

Оценка по шкалам функциональных исходов /
Functional outcome assessment scales

Группа	Шкалы							
	Бартел		Ривермид		Рэнкин		ШРМ	
	До	После	До	После	До	После	До	После
ГПО	74,7±10,3	81,7±10,3*	9,4±2,1	11,0±2,1*	3,0±0,0	2,8±0,4*	3,0±0,3	2,8±0,4*
ГОО	73,7±8,4	85,5±10,5*	8,8±1,9	10,8±1,7*	3,0±0,0	2,6±0,7*	3,0±0,0	2,6±0,7*

Примечание. * $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем до лечения). «До» — параметр до тренировки БОС; «После» — параметр после тренировки БОС. БОС — биологическая обратная связь; ГПО — группа тренировки по параметру «период опоры»; ГОО — группа тренировки по параметру «период одиночной опоры»; ШРМ — шкала реабилитационной маршрутизации.

Note: * $p < 0.05$ (compared with the same indicator before the treatment). “Before” — parameter before the biofeedback training; “After” — parameter after the biofeedback training. ГПО — training group according to the “period of support” parameter; ГОО — training group according to the “period of single support” parameter; ШРМ — scale of rehabilitation routing.

Таблица 2 / Table 2

Шкала оценки мышечной силы (MRC) /
Medical Research Council Weakness Scale (MRC)

Группа мышц	Целевой параметр	До	После
Тазобедренный, сгибатели	ГПО	3,70±0,57	4,05±0,76*
	ГОО	3,65±0,59	3,85±0,59*
Тазобедренный, разгибатели	ГПО	3,75±0,64	4,10±0,79*
	ГОО	3,70±0,57	3,90±0,55*
Коленный, разгибатели	ГПО	3,55±0,69	3,90±0,91*
	ГОО	3,50±0,61	3,70±0,57*
Коленный, сгибатели	ГПО	3,60±0,60	3,95±0,83*
	ГОО	3,50±0,61	3,70±0,57*
Голенистоопный, тыльные сгибатели	ГПО	3,00±0,86	3,20±0,83*
	ГОО	2,95±0,83	3,30±0,92*
Голенистоопный, подошвенные сгибатели	ГПО	3,15±0,81	3,35±0,81*
	ГОО	2,95±0,83	3,30±0,92*

Примечание. * $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем до лечения). ГПО — группа тренировки по параметру «период опоры»; ГОО — группа тренировки по параметру «период одиночной опоры».

Note: * $p < 0.05$ (compared with the same indicator before treatment). ГПО — training group according to the “period of support” parameter; ГОО — training group according to the “period of single support” parameter.

метр ЦШ демонстрирует достоверное увеличение в обеих исследуемых группах как до, так и после тренировки в сравнении с группой нормы ($p < 0,05$). Параметр «частота шага» демонстрирует достоверное снижение в обеих исследуемых группах как до, так и после тренировки в сравнении с группой нормы ($p < 0,05$).

Высота подъема стопы паретичной конечности достоверно меньше в обеих исследуемых группах

как до, так и после тренировки в сравнении с группой нормы ($p < 0,05$). В группе ГОО высота подъема стопы контралатеральной конечности достоверно меньше показателей группы нормы и такого же показателя в ГПО до и после проводимого лечения ($p < 0,05$). Высота подъема стопы в паретичной конечности достоверно меньше в обеих исследуемых группах по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны до лечения ($p < 0,05$).

Таблица 3 / Table 3

**Пространственно-временные параметры ходьбы /
Space-time parameters of walking**

Параметр	Целевой параметр	До		После		Контроль
		Конечность				
		Контрала-теральная	Паретичная	Контрала-теральная	Паретичная	
Цикл шага, сек	ГПО	1,56±0,32*	1,56±0,33*	1,53±0,33*	1,53±0,32*	1,09±0,07
	ГОО	1,76±0,50*	1,75±0,49*	1,76±0,42*	1,75±0,40*	
Частота шага, ш/мин	ГПО	39,85±7,34*		40,40±7,43*		54,6±3,49
	ГОО	35,40±9,86*		35,50±9,19*		
Высота подъема стопы, см	ГПО	12,25±1,80	9,90±3,11*#	12,65±1,60	10,20±3,00*@	12,55±2,06
	ГОО	10,15±2,78*&	8,30±3,34*#	10,60±1,93*&	9,30±2,47*\$	
Скорость ходьбы, V, км/ч	ГПО	2,10±0,77*		2,32±0,93*\$		4,42±0,56
	ГОО	1,45±0,85*&		1,60±0,77*&		
Коэффициент ритмичности	ГПО	0,75±0,17*		0,81±0,13*\$		0,98±0,01
	ГОО	0,73±0,22*		0,76±0,21*		
Длина цикла шага, см	ГПО	85,41±21,71*		90,60±25,40*\$		135,60±11,18
	ГОО	63,20±24,37*&		71,55±22,37*&\$		

Примечание. * $p < 0,05$ (по сравнению с таким же значением в группе нормы); # $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны до лечения); ® $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны после лечения); § $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем до лечения); & $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем в группе с параметром «период опоры»). ГПО — группа тренировки по параметру «период опоры»; ГОО — группа тренировки по параметру «период одиночной опоры».

Note: * $p < 0.05$ (compared with the same value in the control group); # $p < 0.05$ (compared with the same indicator of the contralateral side before the treatment); ® $p < 0.05$ (compared with the same indicator of the contralateral side after the treatment); § $p < 0.05$ (compared with the same indicator of the contralateral side after the treatment); & $p < 0.05$ (compared with the same indicator before the treatment); & $p < 0.05$ (compared with the same indicator in the group with the “period of support” parameter). ГПО — training group according to the “period of support” parameter; ГОО — training group according to the “period of single support” parameter.

Высота подъема стопы паретичной конечности в ГПО достоверно меньше по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны после лечения ($p < 0,05$). Высота подъема стопы паретичной конечности в ГОО стала достоверно больше после лечения ($p < 0,05$).

Скорость ходьбы пациентов демонстрирует достоверное снижение показателя в обеих исследуемых группах как до, так и после тренировки по сравнению с группой нормы ($p < 0,05$). Скорость ходьбы пациентов в ГОО достоверно ниже как до, так и после лечения по сравнению с таким же показателем в ГПО ($p < 0,05$). Скорость ходьбы пациентов в ГПО стала достоверно выше после лечения ($p < 0,05$).

Коэффициент ритмичности ходьбы демонстрирует достоверное снижение в обеих исследуемых группах как до, так и после тренировки по сравнению с группой нормы ($p < 0,05$). Коэффициент

ритмичности ходьбы в ГПО стал достоверно выше после лечения ($p < 0,05$).

Длина ЦШ достоверно меньше в обеих исследуемых группах как до, так и после тренировки по сравнению с группой нормы ($p < 0,05$). Длина ЦШ в ГОО достоверно меньше как до, так и после тренировки по сравнению с таким же показателем в ГПО ($p < 0,05$). Длина ЦШ в обеих исследуемых группах после тренировки достоверно увеличилась по сравнению с таким же показателем до лечения ($p < 0,05$).

Данные анализа фазовых параметров ходьбы представлены в табл. 4.

Показатель ПО контралатеральной конечности достоверно больше, чем показатель нормы, как до, так и после лечения в обеих исследуемых группах ($p < 0,05$). Показатель ПО паретичной конечности достоверно больше, чем показатель нормы, как до, так и после лечения в группе ГОО

Таблица 4 / Table 4

Фазы ходьбы /
Walking phases

Параметр	Целевой параметр	До		После		Контроль
		Конечность				
		Контрала-теральная	Паретичная	Контрала-теральная	Паретичная	
Период опоры, %	ГПО	72,78±5,63*	63,51±4,35 [#]	71,18±4,89* ^{\$}	64,46±3,63 [@]	62,85±1,51
	ГОО	76,42±9,80* ^{&}	69,48±7,45* ^{&#}	74,11±9,85* ^{\$}	68,42±8,18* ^{&@}	
Период одиночной опоры, %	ГПО	36,13±4,29	27,13±6,01* [#]	35,76±3,64	29,12±4,66* ^{@\$}	37,21±1,40
	ГОО	31,02±6,63 ^{&}	24,24±9,18 [#]	32,26±8,17	26,50±9,32 [@]	
Период двойной опоры, %	ГПО	36,66±8,33*	36,39±8,05*	35,42±6,76*	35,35±6,70*	25,63±2,75
	ГОО	44,23±14,75* ^{&}	43,65±15,01* ^{&}	41,89±15,95*	42,10±16,10*	
Начало второй двойной опоры, %	ГПО	54,23±4,26*	45,49±4,38* [#]	52,87±3,67*	47,43±3,61* [@]	49,91±0,41
	ГОО	55,29±6,77*	45,67±6,19* [#]	51,93±8,41	47,18±7,01	

Примечание. * $p < 0,05$ (по сравнению с таким же значением в группе нормы); [#] $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны до лечения); [@] $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны после лечения); ^{\$} $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем до лечения); [&] $p < 0,05$ (по сравнению с таким же показателем в группе с параметром «период опоры»). ГПО — группа тренировки по параметру «период опоры»; ГОО — группа тренировки по параметру «период одиночной опоры».

Note: * $p < 0.05$ (compared with the same value in the control group); [#] $p < 0.05$ (compared with the same indicator of the contralateral side before the treatment); [@] $p < 0.05$ (compared with the same indicator of the contralateral side after the treatment); ^{\$} $p < 0.05$ (compared with the same before the treatment); [&] $p < 0.05$ (compared with the same indicator in the group with the “support period” parameter). ГПО — training group according to the “period of support” parameter; ГОО — training group according to the “period of single support” parameter.

($p < 0,05$). Показатель ПО контралатеральной конечности до лечения и паретичной конечности как до, так и после лечения достоверно больше, чем аналогичный показатель в ГПО ($p < 0,05$). Показатель ПО паретичной конечности в обеих исследуемых группах достоверно меньше в сравнении с таким же показателем контралатеральной стороны до лечения ($p < 0,05$). Показатель ПО контралатеральной конечности в обеих исследуемых группах стал достоверно меньше, чем до проводимого лечения ($p < 0,05$). Показатель ПО паретичной конечности в ГПО стал достоверно больше, а в группе ГОО — достоверно меньше, чем до проводимого лечения ($p < 0,05$).

Параметр ОО паретичной конечности достоверно меньше показателей группы нормы и контралатеральной стороны до и после лечения ($p < 0,05$). Параметр ОО паретичной конечности в обеих исследуемых группах меньше, чем показатель контралатеральной стороны как до, так и после лечения ($p < 0,05$). Параметр ОО контралатеральной конечности до лечения достоверно меньше, чем идентичный показатель в ГПО ($p < 0,05$). Параметр ОО

паретичной конечности в ГПО после лечения стал больше, чем до лечения ($p < 0,05$).

Период ДО демонстрирует достоверное увеличение по сравнению с группой нормы для обеих сторон до и после лечения в обеих исследуемых группах ($p < 0,05$). Период ДО демонстрирует достоверное увеличение показателя в ГОО по сравнению с ГПО для паретичной и контралатеральной сторон до лечения ($p < 0,05$).

Показатель НВД контралатеральной стороны до лечения в обеих исследуемых группах и после лечения в ГПО достоверно выше по сравнению с группой нормы ($p < 0,05$). Показатель НВД паретичной стороны до лечения в обеих исследуемых группах и после лечения в ГПО достоверно ниже по сравнению с группой нормы ($p < 0,05$). Показатель НВД паретичной стороны до лечения в обеих исследуемых группах достоверно ниже по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны до лечения ($p < 0,05$). Показатель НВД паретичной стороны после лечения в ГПО достоверно ниже по сравнению с таким же показателем контралатеральной стороны после лечения ($p < 0,05$).

Собственное наблюдение пациента с левосторонним гемипарезом

В качестве примера приводим наблюдение пациента Ф. 53 лет с левосторонним гемипарезом (рис. 2).

Тренировка проводилась по целевому параметру периода опоры. До курса лечения разность параметров составляла 5,7% от ЦШ, по окончании курса — 2,7% от ЦШ. Уменьшилась асимметрия длительности периода одиночной опоры с 5,1 до 2,9%. Аналогичным образом изменилось значение параметра «начало второй двойной опоры» с асимметрии (2,9%) до ее полного нивелирования (0%). Сократилось, хотя и незначительно, время цикла шага, что также является положительным симптомом, и возросла скорость ходьбы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническое состояние больных по оцениваемым параметрам до начала восстановительного лечения как в ГПО, так и в ГОО не имеет существенных отличий (см. табл. 1, 2). Таким образом, обе группы, с клинической точки зрения, являются однородными. Все исследуемые параметры достоверно изменились в результате проведенной реабилитации. Изменения в обеих группах однотипны, равно как и величины этих изменений.

Инструментальное исследование показало, что полученные нами изменения в обеих группах наблюдения по сравнению с контролем — это типичный вариант ходьбы при гемипарезе [22, 24, 25]. По ЦШ и частоте шага группы не имеют существенных отличий. Однако такие параметры, как ВПС, скорость (V) и длина ЦШ, показывают еще и то, что их значения достоверно ниже в ГОО по сравнению с ГПО. Это очевидные симптомы того, что функционально ГОО изначально имеет более тяжелые функциональные расстройства. В результате тренировки и проводимого лечения эти отличия незначительно сглаживаются (по параметру ВПС на стороне пареза), но не исчезают. В данном случае мы имеем наглядную демонстрацию того, что клинические и функциональные параметры не равны друг другу. По клиническим параметрам обе группы неотличимы друг от друга, однако по функции ходьбы они существенно отличаются, при этом больные ГОО ходят явно хуже и с меньшей скоростью, имеют большие функциональные асимметрии.

Параметр ВПС достоверно возрастает по сравнению с таковым до БОС-тренировки только в ГОО. Такие параметры, как скорость ходьбы и длина шага, достоверно возросли после тренировки в обеих группах. Все перечисленные параметры являются базовыми и, по нашему предположению,

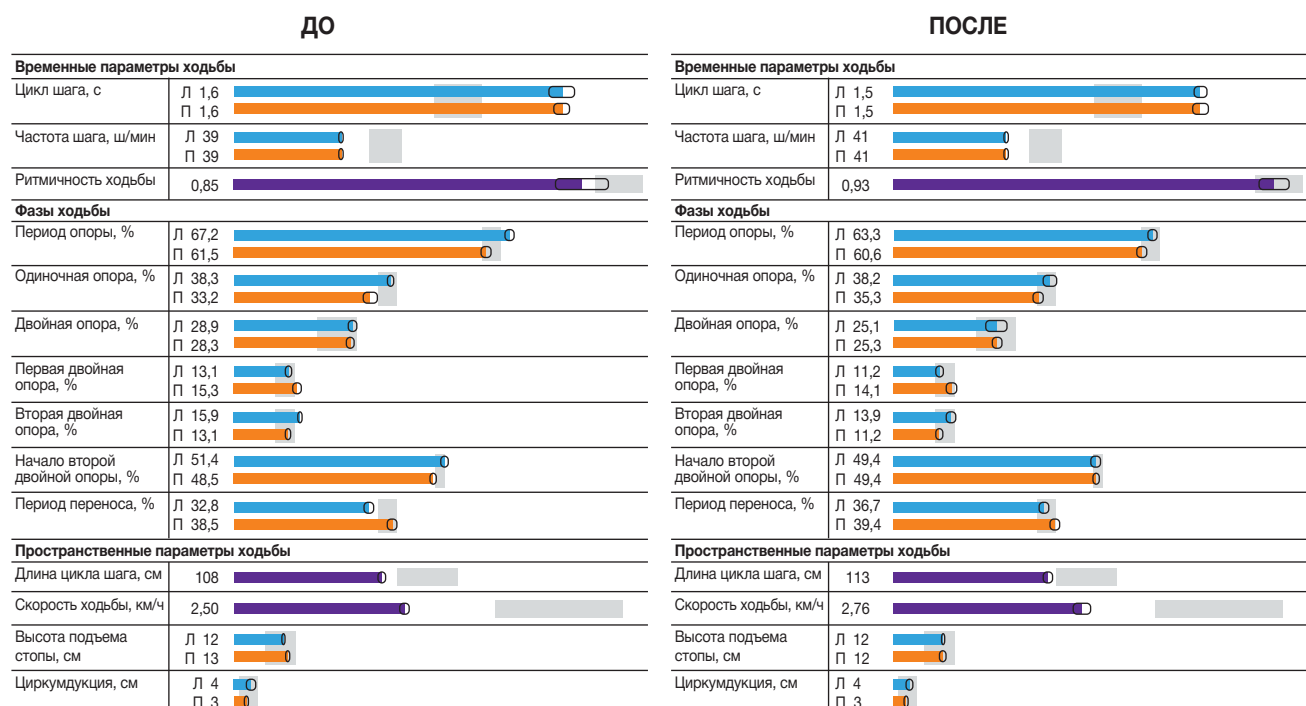


Рис. 2. Результаты контрольного исследования пациента Ф. с левосторонним гемипарезом: основные исследуемые параметры (фрагмент отчета) до и после курса лечения.

Fig. 2. The results of the control study of patient F. with left-sided hemiparesis: the main parameters studied (fragment of the report) before and after the course of treatment.

не могут отражать специфику тренировки по тому или иному параметру данной работы.

Наиболее интересен момент отличий по собственнотренируемому параметру. В ГПО обнаружено, что параметр ПО достоверно изменился после тренировки только на здоровой стороне. Аналогичное изменение мы получили и для ГОО. Параметр ОО достоверно возрастает в результате тренировки в ГПО на стороне поражения. Это очевидная положительная динамика, которая отмечается только в ГПО. Кроме этого, можно отметить, что по всем параметрам, кроме НВД, ГОО показывала и до тренировки несколько худшие результаты. Для параметров ПО и ДО отличия достоверны для обеих сторон, для ОО — только для контралатеральной стороны. Таким образом, на уровне клинической оценки группы не имеют отличий, но функция ходьбы у них отличается, и больные в ГОО показывают до тренировки результаты достоверно ниже, чем в группе ГПО.

Наибольшее количество достоверных отличий после курса тренировки нами получено по параметру ПО в обеих группах. Тренировка по параметру ОО показала меньшее количество изменений, и те преимущественно по параметру ПО. Кроме этого, можно отметить, что наиболее эффективный отклик от тренировки мы видим в обеих группах на контралатеральной стороне. Почему так? Ответ очевиден: сохранная конечность имеет полноценное управление, которое лучше поддается тренировке. Паретичная сторона, имея дефекты в реализации движения и управления им, тренируется заведомо хуже. Это позволяет предположить, что более эффективный вариант тренировки, возможно, может быть при осуществлении БОС только по параметру стороны поражения. Здоровая сторона, как можно предположить, не нуждается в дополнительной стимуляции, и ее параметры ходьбы будут меняться настолько, насколько удастся модифицировать параметры стороны гемипареза.

В доступной литературе мы встретили одно исследование, где в качестве целевого параметра использовалась БОС по параметру ПО у больных церебральным инсультом [26]. Авторы получили положительный результат. В данном исследовании применялся вибротактильный способ БОС, и тоже для обеих ног, но дизайн исследования очень существенно отличался от нашего. В нашей предшествующей работе [22, 23], где проводилась аналогичная тренировка по параметру ПО, мы не получили убедительных данных, что ПО подверга-

ется влиянию целевой тренировки. Новые данные представленного исследования свидетельствуют, что процесс тренировки происходит, и целевой параметр оказывает влияние. Однако из двух параметров, которые мы пробовали применить, только параметр ПО демонстрирует наиболее значимые результаты, которые гораздо более выражены для здоровой стороны. В данном случае может еще влиять и то, что группа ГОО функционально оказалась существенно более тяжелой, что никак не следовало из клинической оценки, по которой и проводился отбор пациентов. В конечном счете, именно по причине функциональных отличий вопрос о том, по какому параметру метод БОС-тренировки наиболее эффективен, остался невыясненным.

Ограничения исследования

Помимо БОС-тренировок, каждая группа пациентов получала индивидуальный план медицинской реабилитации, направленный на восстановление утраченных функций и восстановление активности больного. Программы индивидуальных занятий в обеих исследуемых группах были идентичны по составу. В представленном исследовании мы не могли исключить влияния и других видов восстановительного лечения, которые нельзя было отметить; и собственных занятий отдельных пациентов вне лечебного плана; и ряда индивидуальных особенностей, способствующих или противодействующих эффективному восстановлению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании мы обнаружили, что клинические и инструментальные исследования имеют различную чувствительность. По трем базовым параметрам (ВПС, V и длина ЦШ) группа ГОО оказалась функционально более тяжелой, что никак не отражается на шкалах клинической оценки и мышечной силы. Таким образом, по клинической оценке обе группы однородны, а по инструментальной — отличаются. Но первично отбор больных производился по традиционным клиническим критериям.

Применение целевой тренировки ходьбы у больных церебральным инсультом потенциально позволяет модифицировать параметры ходьбы в требуемом направлении.

У больных церебральным инсультом и гемипарезом возможна целенаправленная тренировка функции ходьбы с использованием параметров ПО и ОО. При использовании целевого параметра ПО получены косвенные свидетельства того, что такая

тренировка эффективна. Совершенно определенно, что параметр ПО на здоровой стороне меняется в нужном направлении в сторону уменьшения. Таким образом, относительная нагрузка на паретичную сторону все равно возрастает.

Для целевой тренировки по параметру ОО мы не обнаружили очевидных изменений под влиянием целевой тренировки, вероятно, по причине того, что функционально эта группа была более тяжелой, тем не менее обе группы показали улучшение основных параметров ходьбы в конце курса тренировки, при этом мы не могли исключить сам фактор времени и проводимой терапии в той и другой группе.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. Д.В. Скворцов — дизайн исследования, поиск и обработка литературы, проведение исследования, обработка данных, написание текста статьи; С.Н. Кауркин — отбор и обследование больных для исследования, клиническое исследование, проведение исследования, обработка первичных данных, статистическая обработка, написание текста статьи; Г.Е. Иванова — общее руководство, дизайн исследования, написание текста статьи; А.Ю. Суворов — поиск и обработка литературы, написание текста статьи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. D.V. Skvortsov — research design, literature search and processing, research, data processing, writing the text of the article; S.N. Kaurkin — selection and examination of patients for research, clinical research, research, primary data processing, statistical processing, writing the text of the article; G.E. Ivanova — general guidance, research design, writing the text of the article; A.Yu. Suvorov — search and processing of literature, writing the text of the article. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России (НИР «Разработка новых технологий медицинской реабилитации у пациентов с пораже-

ниями и заболеваниями головного мозга») АААА-А19-119042590030-2.

Funding source. This work was supported by funding АААА-А19-119042590030-2.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Федерального центра мозга и нейротехнологий, помогавшим в работе с больными, ординаторам Борзых Александре Петровне, Валлиулину Ильдару Дильшатовичу, Барановой Анне Константиновне.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the staff of the Federal Center for the Brain and Neurotechnologies, who helped work with patients, the residents Borzykh Alexandra Petrovna, Valliulin Ildar Dilshatovich, Baranova Anna Konstantinovna.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Spencer J, Wolf SL, Kesar TM. Biofeedback for post-stroke gait retraining: A review of current evidence and future research directions in the context of emerging technologies. *Front Neurol*. 2021;12:637199. doi: 10.3389/fneur.2021.637199
2. Genthe K, Schenck C, Eicholtz S, et al. Effects of real-time gait biofeedback on paretic propulsion and gait biomechanics in individuals post-stroke. *Top Stroke Rehabil*. 2018;25(3):186–193. doi: 10.1080/10749357.2018.1436384
3. Hollands KL, Pelton TA, Tyson SF, et al. Interventions for coordination of walking following stroke: systematic review. *Gait Posture*. 2012;35(3):349–359. doi: 10.1016/j.gaitpost.2011.10.355
4. Nadeau S, Betschart M, Bethoux F. Gait analysis for poststroke rehabilitation: the relevance of biomechanical analysis and the impact of gait speed. *PhysMed Rehabil Clin N Am*. 2013; 24(2):265–276. doi: 10.1016/j.pmr.2012.11.007
5. Harris-Love ML, Forrester LW, Macko RF, et al. Hemiparetic gait parameters in overground versus treadmill walking. *Neurorehabilitation Neural Repair*. 2001;15(2):105–112. doi: 10.1177/154596830101500204
6. Horak F, King L, Mancini M. Role of body-worn movement monitor technology for balance and gait rehabilitation. *Phys Ther*. 2015;95(3):461–470. doi: 10.2522/ptj.20140253
7. Tate JJ, Milner CE. Real-time kinematic, temporospatial, and kinetic biofeedback during gait retraining in patients: A systematic review. *Phys Ther*. 2010;90(8):1123–1134. doi: 10.2522/ptj.20080281
8. De Rooij IJ, van de Port IG, Meijer JG. Effect of virtual reality training on balance and gait ability in patients with stroke: systematic review and meta-analysis. *Phys Ther*. 2016; 96(12):1905–1918. doi: 10.2522/ptj.20160054
9. Kang HK, Kim Y, Chung Y, Hwang S. Effects of treadmill training with optic flow on balance and gait in individuals following stroke: randomized controlled trials. *Clin Rehabil*. 2012;26(3): 246–255. doi: 10.1177/0269215511419383
10. Maier M, Ballester BR, Verschure P. Principles of neuro-rehabilitation after stroke based on motor learning and brain plasticity mechanisms. *Front Syst Neurosci*. 2019;13:74. doi: 10.3389/fnsys.2019.00074

11. Ronsse R, Puttemans V, Coxon JP, et al. Motor learning with augmented feedback: modality-dependent behavioral and neural consequences. *Cereb Cortex*. 2011;21(6):1283–1294. doi: 10.1093/cercor/bhq209
12. Shin J, Chung Y. Influence of visual feedback and rhythmic auditory cue on walking of chronic stroke patient induced by treadmill walking in real-time basis. *NeuroRehabilitation*. 2017;41(2):445–452. doi: 10.3233/NRE-162139
13. Morris ME, Matyas TA, Bach TM, Goldie PA. Electrogoniometric feedback: Its effect on genu recurvatum in stroke. *Arch Phys Med Rehabil*. 1992;73(12):1147–1154.
14. Basaglia N, Mazzini N, Boldrini P, et al. Biofeedback treatment of genu-recurvatum using an electrogoniometric device with an acoustic signal. One-year follow-up. *Scand J Rehabil Med*. 1989;21(3):125–130.
15. Choi YH, Kim JD, Lee JH, Cha YJ. Walking and balance ability gain from two types of gait intervention in adult patients with chronic hemiplegic stroke: a pilot study. *Assist Technol*. 2019;31(2):112–115. doi: 10.1080/10400435.2017.1387616
16. Sungkarat S, Fisher BE, Kovindha A. Efficacy of an insole shoe wedge and augmented pressure sensor for gait training in individuals with stroke: A randomized controlled trial. *Clin Rehabil*. 2011;25(4):360–369. doi: 10.1177/0269215510386125
17. Schenck C, Kesar TM. Effects of unilateral real-time biofeedback on propulsive forces during gait. *J Neuroeng Rehabil*. 2017; 14(1):52. doi: 10.1186/s12984-017-0252-z
18. Druzicki M, Przysada G, Guzik A, et al. The efficacy of gait training using a body weight support treadmill and visual biofeedback in patients with subacute stroke: A randomized controlled trial. *Biomed Res Int*. 2018;2018:3812602. doi: 10.1155/2018/3812602
19. Druzicki M, Guzik A, Przysada G, et al. Efficacy of gait training using a treadmill with and without visual biofeedback in patients after stroke: a randomized study. *J Rehabil Med*. 2015;47(5): 419–425. doi: 10.2340/16501977-1949
20. Brasileiro A, Gama G, Trigueiro L, et al. Influence of visual and auditory biofeedback on partial body weight support treadmill training of individuals with chronic hemiparesis: A randomized controlled clinical trial. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2015;51(1):49–58.
21. Aruin AS, Hanke TA, Sharma A. Base of support feedback in gait rehabilitation. *Int J Rehabil Res*. 2003;26(4):309–312. doi: 10.1097/01.mrr.0000102059.48781.a8
22. Сковцов Д.В., Кауркин С.Н., Иванова Г.Е., и др. Целенаправленная тренировка ходьбы в раннем восстановительном периоде у больных с церебральным инсультом (предварительное исследование) // *Клиническая практика*. 2021. Т. 12, № 4. С. 12–22. [Skvortsov DV, Kaurkin SN, Ivanova GE, et al. Purposeful walking training in the early recovery period in patients with cerebral stroke (preliminary study). *Journal of Clinical Practice*. 2021;12(4):12–22. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract77334
23. Skvortsov DV, Kaurkin SN, Ivanova GE. A study of biofeedback gait training in cerebral stroke patients in the early recovery phase with stance phase as target parameter. *Sensors (Basel)*. 2021;21(21):7217. doi: 10.3390/s21217217
24. Balaban B, Tok F. Gait disturbances in patients with stroke. *PM R*. 2014;6(7):635–642. doi: 10.1016/j.pmrj.2013.12.017
25. Guzik A, Druzicki M. Application of the gait deviation index in the analysis of post-stroke hemiparetic gait. *J Biomech*. 2020; 99:109575. doi: 10.1016/j.jbiomech.2019.109575
26. Afzal R, Oh MK, Lee CH, et al. A portable gait asymmetry rehabilitation system for individuals with stroke using a vibrotactile feedback. *BioMed Res Int*. 2015;2015:375638. doi: 10.1155/2015/375638

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Сковцов Дмитрий Владимирович, д.м.н., профессор;
адрес: Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1;
e-mail: dskvorts63@mail.ru; eLibrary SPIN: 6274-4448;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2794-4912>

Соавторы:

Кауркин Сергей Николаевич, к.м.н.;
e-mail: kaurkins@bk.ru; eLibrary SPIN: 4986-3575;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5232-7740>

Иванова Галина Евгеньевна, д.м.н.;
e-mail: reabilivanova@mail.ru; eLibrary SPIN: 4049-4581;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3180-5525>

Суворов Андрей Юрьевич, к.м.н.;
e-mail: dr_suvorov@mail.ru; eLibrary SPIN: 1639-3135;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4901-2208>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Dmitry V. Skvortsov, MD, PhD, Professor;
address: 1 Ostrovityanova street, 117997 Moscow, Russia;
e-mail: dskvorts63@mail.ru; eLibrary SPIN: 6274-4448;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2794-4912>

Co-authors:

Sergey N. Kaurkin, MD, PhD;
e-mail: kaurkins@bk.ru; eLibrary SPIN: 4986-3575;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5232-7740>

Galina E. Ivanova, MD, PhD;
e-mail: reabilivanova@mail.ru; eLibrary SPIN: 4049-4581;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3180-5525>

Andrey Yu. Suvorov, MD, PhD;
e-mail: dr_suvorov@mail.ru; eLibrary SPIN: 1639-3135;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4901-2208>

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G К SARS-CoV-2

Р.И. Шакуров¹, Я.Д. Шанский¹, К.А. Прусаков¹, С.В. Сизова^{1,2}, С.П. Дудик¹, Л.В. Плотникова³, В.А. Манувера¹, Д.В. Клинов¹, В.Н. Лазарев¹, Ю.А. Беспятых^{1,3}, Д.В. Басманов¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, Российская Федерация

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Российская Федерация

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация

Обоснование. С 2019 года весь мир охватила пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, которая продолжается по сей день. За эти годы возбудитель SARS-CoV-2 претерпел ряд мутационных изменений в геноме, что повлекло распространение различных генетических вариантов вируса. Между тем для диагностики этиологического агента, установления стадии заболевания и оценки иммунитета используются методы, неспецифичные в отношении различных вариантов SARS-CoV-2 и требующие значительных временных затрат. Таким образом, актуальным направлением является разработка новых методов диагностики COVID-19, а также внедрение данных разработок в практику. Широкие возможности в этом направлении открывают системы на основе химически модифицированных флуоресцентных микросфер с возможностью мультиплексного анализа целевых белковых молекул. **Цель исследования** — разработка микрофлюидной тест-системы на основе флуоресцентных микросфер для специфического обнаружения иммуноглобулинов класса G (IgG) к SARS-CoV-2. **Методы.** Формирование охарактеризованной коллекции образцов сыворотки крови человека с использованием иммуноферментного анализа и коммерчески доступных наборов реагентов. Обнаружение IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека, содержащей известный уровень антител, разработанным иммунофлуоресцентным методом с использованием микросфер, на поверхности которых химическим путем был иммобилизован RBD-фрагмент S-белка вируса SARS-CoV-2, вариант Каппа. **Результаты.** Согласно данным иммуноферментного анализа, уровень IgG в сыворотке крови добровольцев в группе, перенесших коронавирусную инфекцию, в 9–300 раз превышал таковой в группе условно здоровых добровольцев, не болевших COVID-19. Получены конъюгаты флуоресцентных микросфер с RBD-фрагментом S-белка, способные специфически связывать IgG из сыворотки крови. Образование иммунных комплексов подтверждено данными флуоресцентной микроскопии: интенсивность флуоресценции вторичных антител в иммунных комплексах при их образовании на поверхности флуоресцентных микросфер прямо пропорциональна содержанию IgG ($r=0,963$). Тест-система обладает хорошей прогностической значимостью (AUC 70,3%). **Заключение.** Разработана тест-система на основе флуоресцентных микросфер, содержащих иммобилизованный RBD-фрагмент S-белка SARS-CoV-2, для иммунофлуоресцентного выявления IgG в сыворотке крови человека. При апробации системы на образцах сыворотки крови добровольцев с различным уровнем IgG к SARS-CoV-2 показана ее прогностическая ценность, что позволяет позиционировать представленную тест-систему как метод оценки содержания иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека с перспективой внедрения в клиническую практику. Представленная тест-система может быть использована также для интеграции в различные микрофлюидные системы и создания чипов и приборов «прикроватной диагностики».

Ключевые слова: диагностика COVID-19; иммуноферментный анализ; персонализированная медицина.

Для цитирования: Шакуров Р.И., Шанский Я.Д., Прусаков К.А., Сизова С.В., Дудик С.П., Плотникова Л.В., Манувера В.А., Клинов Д.В., Лазарев В.Н., Беспятых Ю.А., Басманов Д.В. Разработка микрофлюидной тест-системы на основе флуоресцентных микросфер для обнаружения иммуноглобулинов класса G к SARS-CoV-2. *Клиническая практика*. 2023;14(1):44–53. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract278280>

Поступила 23.02.2023

Принята 01.03.2023

Опубликована 31.03.2023

A FLUORESCENT MICROSPHERES-BASED MICROFLUIDIC TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN G TO SARS-COV-2

R.I. Shakurov¹, Ya.D. Shansky¹, K.A. Prusakov¹, S.V. Sizova^{1,2}, S.P. Dudik¹, L.V. Plotnikova³, V.A. Manuvera¹, D.V. Klinov¹, V.N. Lazarev¹, J.A. Bespyatykh^{1,3}, D.V. Basmanov¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

² Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

³ Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

Background: The pandemic of the new coronavirus infection, COVID-19, is currently ongoing in the world. Over the years, the pathogen, SARS-CoV-2, has undergone a series of mutational genome changes, which has led to the spread of various genetic variants of the virus. Meanwhile, the methods used to diagnose SARS-CoV-2, to establish the disease stage and to assess the immunity, are nonspecific to SARS-CoV-2 variants and time-consumable. Thus, the development of new methods for diagnosing COVID-19, as well as their implementation in practice, is currently an important direction. In particular, application of systems based on chemically modified fluorescent microspheres (with a multiplex assay for target protein molecules) opens great opportunities. **Aim:** development of a microfluidic diagnostic test system based on fluorescent microspheres for the specific detection of immunoglobulins G (IgG) to SARS-CoV-2. **Methods:** A collection of human serum samples was characterized using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and commercially available reagent kits. IgG to SARS-CoV-2 in the human serum were detected by the developed immunofluorescent method using microspheres containing the chemically immobilized RBD fragment of the SARS-CoV-2 ("Kappa" variant) viral S-protein. **Results:** The level of IgG in the blood serum of recovered volunteers was 9-300 times higher than that in apparently healthy volunteers, according to ELISA ($p < 0.001$). Conjugates of fluorescent microspheres with the RBD-fragment of the S-protein, capable of specifically binding IgG from the blood serum, have been obtained. The immune complexes formation was confirmed by the fluorescence microscopy data; the fluorescence intensity of secondary antibodies in the immune complexes formed on the surface of microspheres was proportional to the content of IgG ($r = 0.963$). The test system had a good predictive value (AUC 70.3%). **Conclusion:** A test system has been developed, based on fluorescent microspheres containing the immobilized RBD fragment of the SARS-CoV-2 S-protein, for the immunofluorescent detection of IgG in the human blood serum. When testing the system on samples with different levels of IgG to SARS-CoV-2, its prognostic value was shown. The obtained results allow us to present the test system as a method to assess the level of immunoglobulins to SARS-CoV-2 in the human blood serum for the implementation in clinical practice. The test system can also be integrated into various microfluidic systems to create chips and devices for the point-of-care diagnostics.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; COVID-19 testing; personalized medicine.

For citation: Shakurov RI, Shansky YaD, Prusakov KA, Sizova SV, Dudik SP, Plotnikova LV, Manuvera VA, Klinov DV, Lazarev VN, Bespyatykh JA, Basmanov DV. A Fluorescent Microspheres-Based Microfluidic Test System for the Detection of Immunoglobulin G to SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):44–53. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract278280>

Submitted 23.02.2023

Revised 01.03.2023

Published 31.03.2023

ОБОСНОВАНИЕ

В настоящее время в мире продолжается пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызываемой представителем рода бетакоронавирусов SARS-CoV-2. На данный момент идентифицировано 14 вариантов SARS-CoV-2, возникших

в результате замены нуклеотидов в вирусной РНК, из которых 5 вариантов являются эпидемиологически значимыми [1]. Иммунный ответ на попадание вируса SARS-CoV-2 в организм человека включает выработку специфических иммуноглобулинов (антител) различного типа. Иммуноглобулины класса G

(IgG) являются в наибольшей мере ответственными за формирование стойкого иммунитета. Данный тип антител вырабатывается к структурному белку нуклеокапсида (N-белок), гликопротеину шипиков (S-белок) и его RBD-фрагменту, который отвечает за связывание вирусной частицы с клеточной мишенью. Определение уровня IgG используется для оценки эффективности иммунного ответа на перенесенную и текущую инфекцию, а также для выявления поствакцинального иммунитета и отбора доноров с наилучшими показателями содержания защитных антител. Более поздние варианты SARS-CoV-2 обладают повышенной трансмиссивностью и вирулентностью, а также пониженной чувствительностью к механизмам иммунитета [2]. В частности, такие варианты могут ускользать от поствакцинальных антител, что обуславливает необходимость их своевременного обнаружения и оценки уровня иммунитета к ним.

Существует ряд диагностических методов, основанных на определении содержания IgG в биологических жидкостях человека. В клинической практике основным на сегодняшний день является неконкурентный иммуноферментный анализ (ИФА). Хотя золотым стандартом в диагностике COVID-19 остается непосредственно обнаружение РНК вируса в организме человека методом полимеразной цепной реакции [3], ИФА получил широкое распространение как для выявления антител, так и антигена вируса. К преимуществам ИФА относится высокая скорость проведения исследования, что особенно важно для своевременной постановки диагноза [4]. Однако коммерческие наборы ИФА обычно неспецифичны в отношении различных вариантов коронавируса. В связи с этим актуальным является создание высокочувствительной и специфичной мультиплексной тест-системы, направленной на обнаружение IgG в сыворотке крови человека.

В период пандемии COVID-19, когда резко возросла нагрузка на лечебно-профилактические учреждения и серьезно сократились временные и материальные ресурсы, особенно очевидной стала важность не только точности анализа, но и скорости его получения. Одним из решений данной проблемы стали разработка и внедрение в клиническую практику методов диагностики непосредственно у постели пациента, так называемой прикроватной диагностики (point-of-care) [5]. Коммерчески доступные флуоресцентные микросферы, модифицированные различными химическими

группами, представляют собой удобную и гибкую платформу для разработки мультиплексных тест-систем для «прикроватной диагностики» [6].

Цель исследования: разработать микрофлюидную тест-систему на основе флуоресцентных микросфер с целью специфического обнаружения IgG к SARS-CoV-2 с перспективой мультиплексирования для разных генетических вариантов вируса.

МЕТОДЫ

Критерии соответствия

Критерии включения в первую группу исследования: условно здоровые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 лет и старше, без жалоб на состояние здоровья, без перенесенной новой коронавирусной инфекции (на основании анамнеза и оценки уровня IgG и IgM к SARS-CoV-2) и гиперчувствительности к компонентам вакцины в анамнезе.

Критерии включения во вторую группу исследования: добровольцы обоего пола в возрасте от 18 лет и старше, перенесшие новую коронавирусную инфекцию и имеющие подтвержденный высокий уровень IgG к SARS-CoV-2.

Критерии не включения: гиперчувствительность к компонентам вакцины в анамнезе.

Условия проведения

Исследование проводили в ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России (Одинцово, Московская область).

Описание медицинского вмешательства

Формирование коллекции образцов сыворотки крови

Для формирования коллекции образцов сыворотки крови у добровольцев ($n=27$) отбирали кровь в объеме 5 мл в пробирки с гелем и активатором свертывания (Zhejiang Gongdong Medical Technology, Китай). Пробирки центрифугировали при 2000 об./мин в течение 20 мин (центрифуга LMC-3000, Biosan, Латвия). Далее отбирали сыворотку и аликвотировали в пластиковых микроцентрифужных пробирках (Eppendorf, Германия) по ~1,0 мл, при необходимости хранили при -40°C .

Иммуноферментный анализ IgG

Уровень содержания IgG и IgM в образцах коллекции сыворотки крови человека определяли методом непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа. Исследование проводили

на анализаторе Lazurite (Dyrex Technologies Inc., США) с использованием наборов реагентов для иммуноферментного выявления IgG и IgM к SARS-CoV-2 — «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия). По результатам измерений рассчитывали коэффициент позитивности (КП):

$$\text{КП} = \text{OD}_{\text{обр}} / ((\text{OD}_1^{\text{K}^-} + \text{OD}_2^{\text{K}^-}) / 2 + 0,2)$$

где $\text{OD}_{\text{обр}}$ — оптическая плотность образца сыворотки; K^- — отрицательный контрольный образец из набора. Значения КП интерпретировали следующим образом: $\text{КП} > 1,1$ — результат положительный (присутствуют IgG); $0,8 \leq \text{КП} < 1,1$ — результат пограничный; $\text{КП} < 0,8$ — результат отрицательный (отсутствуют IgG).

Микросферы

В исследовании использовали парамагнитные полилактидные микросферы Magplex-C 056 (Luminex, США) диаметром $6,5 \pm 0,2$ мкм с поверхностными карбоксильными группами. Активацию карбоксильных групп на поверхности микросфер проводили при помощи 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC, Sigma Aldrich, Германия) в MES-буфере (BioRad, США) в присутствии N-гидроксисульфосукцинимид (NHS, Abcam, США). Для конъюгации с активированными микросферами использовали RBD-фрагмент синтетического

S-белка вируса SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.1 Каппа) в концентрации 0,1 мг/мл.

Микрофлюидный чип

Микрофлюидный чип был изготовлен из полиметилметакрилата методом лазерной абляции [7]. Чип представлял собой многослойную конструкцию из слоев полиметилметакрилата и акрилового адгезива, изготовленную методом лазерной абляции (GCC Spirit GLS, США). Чип имеет каналы и переходные отверстия и содержит реакционную лунку объемом 200 мкл с микрофильтрующей мембраной из SiO_2 Advantec GC5025MM (Cole-Parmer, США) с напылением хрома, на которой удерживаются микросферы (рис. 1).

Флюоресцентная микроскопия

Для детекции флюоресцентных сигналов от микросфер, расположенных на микрофильтрующей мембране в микрофлюидном чипе, использовался автоматизированный эпифлюоресцентный микроскоп собственной разработки и сборки. Микроскоп собран на основе оптических компонент: объектив Nikon N10X-PF (Nikon Instruments Inc., Япония), тубусная линза ThorLabs TTL200 (Thorlabs Inc., США), цифровая КМОП-камера Basler acA2040-90um (Basler AG, Германия), набор спектральных фильтров (SemRock, США). Особенность данного микроскопа состоит в возможности автоматизированного получения серий микроизображений из

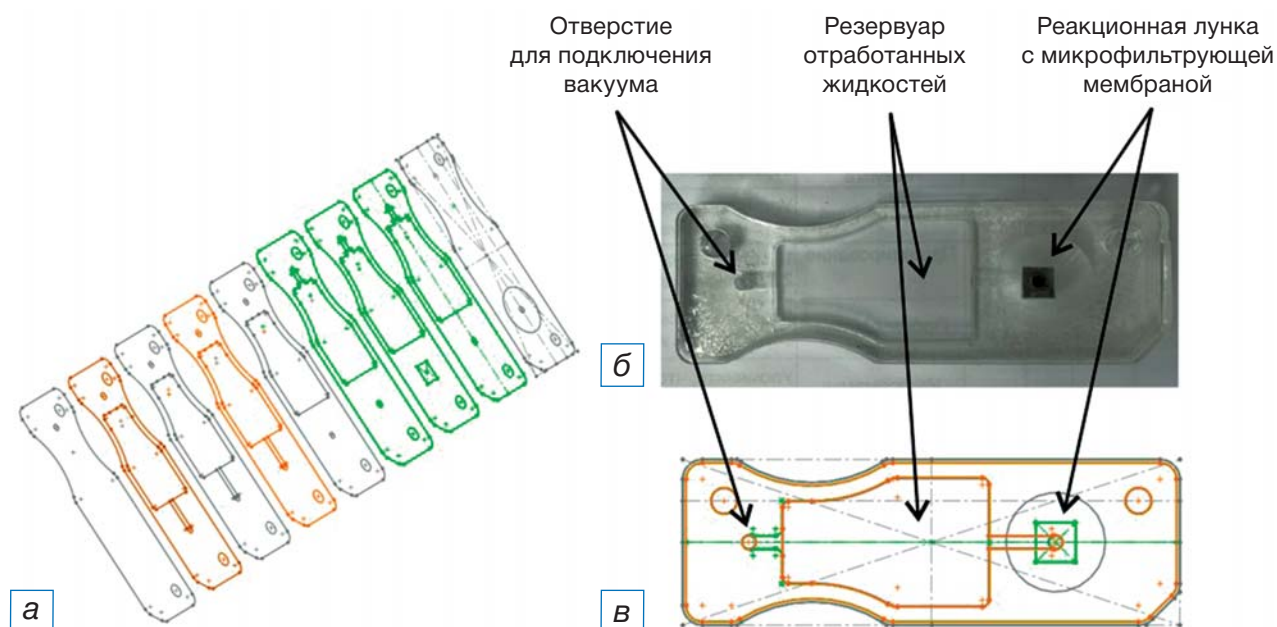


Рис. 1. Многослойный микрофлюидный чип: послойная модель (а), фото (б) и схематическая модель (в).

Fig. 1. A multilayered microfluidic chip: a layer-by-layer model (a), a photo image (b), and a schematic model (v).

разных фокусных плоскостей в нескольких спектральных каналах. Необходимость сканирования по фокусу обусловлена развитым рельефом микрофильтрующей мембраны, на которой расположены микросферы. С помощью данной экспериментальной установки анализировались флуоресцентные сигналы в трех спектральных каналах. Первый канал с длиной волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}_1}=520$ нм и длиной волны эмиссии $\lambda_{\text{em}_1}=578$ нм предназначен для детекции флуоресцентного свечения от конъюгатов вторичных антител anti-IgG с флюорофором фикоэритрин (PE). Данные конъюгаты являются завершающим слоем иммунного комплекса антиген-антитело-вторичное антитело с флюорофором, образуемого на поверхности микросфер, и, таким образом, интенсивность флуоресцентного сигнала от них отображает количество (концентрацию) искоемых антител в пробе. Второй и третий флуоресцентные каналы предназначены для детекции паспортных флюорофоров, входящих в состав микросфер. Длина волны возбуждения этих флюорофоров составляет $\lambda_{\text{ex}_2\&3}=623$ нм, а длины волн эмиссии — $\lambda_{\text{em}_2}=661$ нм и $\lambda_{\text{em}_3}=710$ нм. Получаемые в данных спектральных каналах микрофотографии использовали для точного определения положения и размера каждой микросферы на изображении.

Апробация методики на образцах сыворотки крови человека

Для построения калибровочного графика были взяты образцы стандартных растворов сывороток-калибраторов — растворов антител IgG из указанного ранее коммерческого набора «Вектор-Бест». Калибраторы разводили фосфатным солевым буферным раствором (pH 7,4; BioRad, США). Конечные концентрации составили 0,0; 0,5; 1,0; 6,25; 12,5; 25,0 и 50,0 ВАУ/мл.

Для валидации методики использованы образцы коллекции сыворотки крови добровольцев ($n=13$ и $n=14$ для групп с низким и высоким значением КП соответственно).

Предварительно активировали карбоксильные группы на поверхности микросфер добавлением раствора EDC (16,67 мг/мл) и раствора NHS (10,0 мг/мл) в MES-буфере, полученную смесь инкубировали при комнатной температуре и постоянном перемешивании (ротатор-шейкер Multi Bio RS-24, Biosan, Латвия) в течение 30 мин.

К активированным микросферам добавляли 0,2 мл фосфатного буферного раствора. Супернатант, содержащий продукты активации, удаляли,

при этом микросферы удерживали при помощи магнитного держателя. Активированные микросферы ресуспендировали в 0,1 мл фосфатного буфера в микроцентрифужных пробирках (Eppendorf, Германия); в пробирки добавляли 0,1 мл раствора RBD-фрагмента S-белка; конечная концентрация белка в реакционной смеси составляла 0,1 мг/мл. Пробирки помещали на мешалку и инкубировали при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Для блокировки непрореагировавших карбоксильных групп по истечении времени инкубации из пробирок удаляли супернатант, при этом микросферы, конъюгированные с RBD-фрагментом S-белка, удерживали при помощи магнитного держателя, и добавляли 0,1 мл раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma Aldrich, США) в концентрации 0,1 мг/мл.

Пробирки помещали на мешалку и инкубировали при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте, после этого конъюгаты микросфер и RBD-фрагмента S-белка удерживали на магнитном держателе, удаляли супернатант и к полученным конъюгатам добавляли 0,1 мл подготовленного раствора калибратора или опытной сыворотки крови человека, предварительно разведенной фосфатным буферным раствором (в соотношении 1:10). Пробирки снова помещали на мешалку и инкубировали при встряхивании в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте, микросферы удерживали на магнитном держателе, удаляли супернатант и к микросферам добавляли вторичные антитела anti-IgG с флуоресцентной меткой фикоэритрин (Invitrogen, США) в разведении 1:100. Повторяли инкубацию при встряхивании в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. Микросферы удерживали на магнитном держателе, супернатант удаляли, к микросферам добавляли 0,2 мл фосфатного буферного раствора, ресуспендировали в 0,2 мл буфера для хранения (Bioplex, BioRad, США) и хранили при 4°C.

Пробу суспензии микросфер объемом 50 мкл наносили на мембрану микрофлюидного чипа. Жидкость удаляли под мембраной с помощью лабораторного вакуумного насоса (Vacuubrand MD 4C NT, Германия). Чип помещали на предметный столик флуоресцентного микроскопа и анализировали полученные максимумы флуоресценции.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (Statsoft Inc.,

2011, СА, США). Для оценки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро–Уилка. Так как распределение данных, вошедших в анализ, было отличным от нормального, то их представляли в виде медианы (Q2) и интерквартильного размаха (Q1–Q3). Для сравнения двух несвязанных выборок применяли тест Манна–Уитни. Определение прогностической эффективности проводили при помощи ROC-анализа. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

Объектом исследования были добровольцы, разделенные на две группы.

Первая группа ($n=13$) — условно здоровые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 лет и старше, без жалоб на состояние здоровья, без перенесенной новой коронавирусной инфекции (на основании анамнеза и оценки уровня IgG и IgM к SARS-CoV-2) и гиперчувствительности к компонентам вакцины в анамнезе.

Вторая группа ($n=14$) — добровольцы обоего пола в возрасте от 18 лет и старше, перенесшие новую коронавирусную инфекцию и имеющие подтвержденный высокий уровень IgG к SARS-CoV-2.

Формирование коллекции образцов

В условиях пандемии сложным этапом является подбор доноров образцов крови, не содержащих антитела к циркулирующему инфекционному агенту SARS-CoV-2. В связи с этим образцы сыворотки крови потенциально здоровых добровольцев первой группы ($n=13$) тестировали на содержание IgG, а также IgM. Анализ на наличие IgM необходим для исключения из контрольной группы пациентов на начальной стадии заболевания. Согласно полученным данным, все 13 образцов коллекции не содержали антител (IgM, IgG) к SARS-CoV-2. В то же время все образцы коллекции второй группы ($n=14$) содержали IgG. Коэффициент позитивности IgG в группе перенесших коронавирусную инфекцию в 9–300 раз превышал таковой в группе условно здоровых добровольцев ($p < 0,001$). Измеренные методом ИФА концентрации IgG приведены на рис. 2.

Схема проведения анализа

Для проведения исследований нами была разработана следующая схема анализа.

1. В отдельных пробирках (1.1) активация карбоксильных групп флуоресцентных микросфер и отмывка от остаточных продуктов активации;

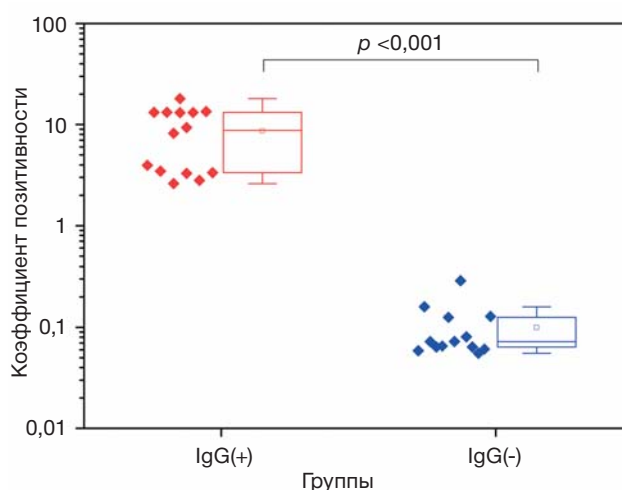


Рис. 2. Сравнение коэффициента позитивности для IgG в образцах сыворотки крови в исследуемых группах.

Примечание. Точки — исходные данные, ящичная диаграмма — медиана, Q1–Q3 и интервал без выбросов.

Fig. 2. Comparison of IgG CoP in the serum samples by groups.

Note: The points are raw data. Box plots: line — the median; box borders — the 25% and 75% quartiles; whiskers — the non-outlier range.

(1.2) блокировка сайтов неспецифического связывания антител на поверхности микросфер добавлением раствора BSA; (1.3) ковалентное связывание RBD-фрагмента S-белка с активированными карбоксильными группами на поверхности микросфер и отмывка от непрореагировавших компонентов; (1.4) связывание IgG из опытных образцов путем инкубации в них микросфер с комплексами антиген–антитело; (1.5) добавление вторичных антител anti-IgG с флуоресцентной меткой (фикоэритрин) для визуализации иммунного комплекса.

2. Нанесение образца микросфер с комплексами антиген–антитело–вторичное антитело с меткой на мембрану микрофлюидного чипа.
3. Помещение чипа в систему флуоресцентной визуализации.
4. Анализ флуоресценции с помощью программного обеспечения.

В текущем исполнении этапы 1.1–1.5 проводятся в индивидуальных пробирках и ручном режиме. Однако использование микрофлюидных технологий и микрофлюидных чипов класса «лаборатория-на-чипе», уже предлагаемых авторами данного исследования ранее [7], в дальнейшем могут позволить реализовать полную автоматизацию процесса большого спектра анализов на выявление антител или белковых маркеров в биологической пробе пациента.

Флюоресцентная микроскопия

Образование иммунных комплексов между RBD-фрагментом S-белка и IgG сыворотки крови на поверхности микросфер было подтверждено данными флюоресцентной микроскопии (рис. 3).

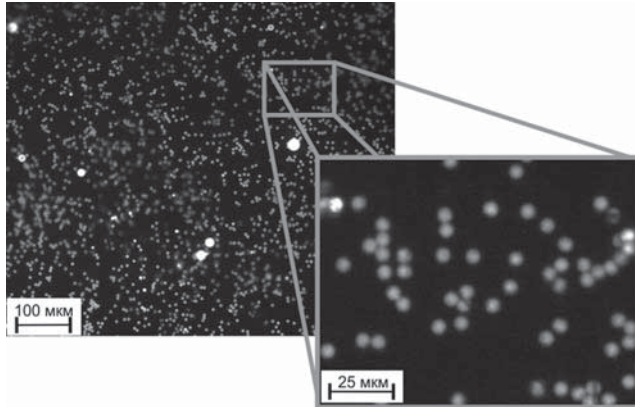


Рис. 3. Изображение реакционной мембраны микрофлюидного чипа с проявленными флюоресцентными микросферами; в выноске — фрагмент мембраны с дополнительным увеличением (×4). Изображение получено в паспортном канале микросфер.

Fig. 3. The reaction membrane of a microfluidic chip with detected fluorescent microspheres on the membrane (a fragment of the membrane is magnified, ×4). The image was obtained in the 'passport' channel of microspheres.

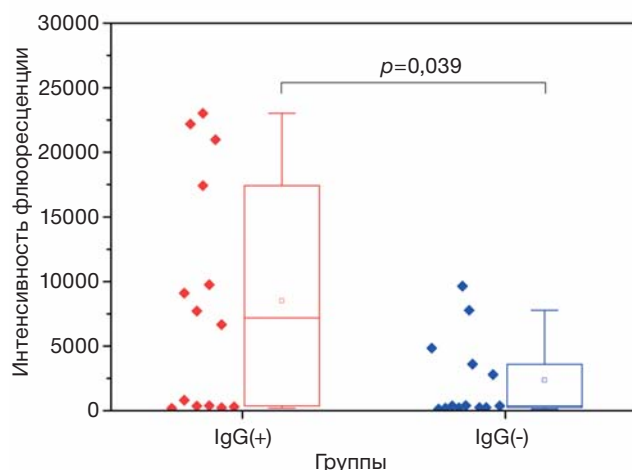


Рис. 4. Сравнение интенсивности флюоресценции вторичных антител anti-IgG в составе иммунных комплексов при образовании последних на поверхности микросфер в группах с низкими (IgG-) и высокими (IgG+) значениями коэффициента позитивности IgG.

Примечание. Точки — исходные данные, ящичная диаграмма — медиана, Q1–Q3 и интервал без выбросов.

Fig. 4. Comparison of the fluorescence intensity of secondary anti-IgG antibodies in the immune complexes formed on the microspheres' surface in the groups with low (IgG-) and high (IgG+) IgG CoP values.

Note: The points are raw data. Box plots: line — the median; box borders — the 25% and 75% quartiles; whiskers — the non-outlier range.

На основании построенного по результатам флюоресцентной микроскопии калибровочного графика показана прямая линейная зависимость между концентрацией IgG в анализируемом образце и интенсивностью светимости микросфер, инкубированных с данным образцом (R^2 0,963). Линейность сохранялась в диапазоне концентраций IgG от 0,5 до 50,0 ВАУ/мл.

Результаты апробации методики на образцах сыворотки крови человека

При оценке интенсивности флюоресценции вторичных антител anti-IgG в составе иммунных комплексов при образовании последних на поверхности микросфер было выявлено, что уровень светимости микросфер прямо пропорционален значениям КП IgG. Интенсивность данной флюоресценции в группе с высокими значениями КП IgG (медиана 7187,0, минимум-максимум 188,5–23019,0) была статистически значимо выше, чем в группе с низким КП (медиана интенсивности свечения 371,3, минимум-максимум 129,7–9632,1) ($p=0,039$); рис. 4.

Оценка диагностической значимости

Для оценки диагностических характеристик разрабатываемой тест-системы в сравнении со стандартным референтным методом ИФА проведен ROC-анализ. Согласно результатам анализа, тест-система обладает хорошей прогностической ценностью: площадь под кривой (AUC) 70,3%; точка отсечения: интенсивность флюоресценции 5754,0; чувствительность 0,571; специфичность 0,846 (рис. 5).

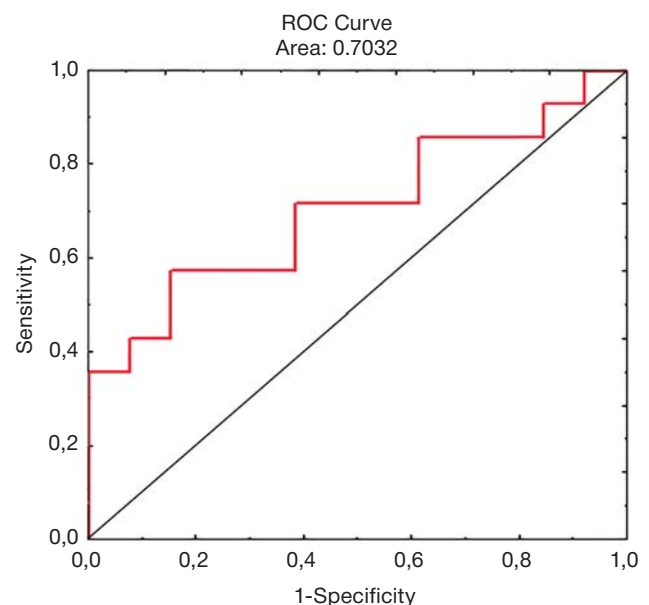


Рис. 5. ROC-кривая для тест-системы.

Fig. 5. A ROC curve for the test system.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в мире растет интерес к созданию «лабораторий-на-чипе» (lab-on-a-chip), которые позволяют одновременно определять несколько биохимических или иммунологических показателей с использованием минимального количества анализируемого образца и максимальным уровнем автоматизации процесса проведения анализа [7]. В случае COVID-19 имеется потенциальная возможность объединить высокую скорость ИФА с большим количеством определяемых данным методом биомаркеров [8, 9]. В частности, подобные решения были предложены для нуклеокапсидного белка [10], IgM и IgG [11], общих антител к SARS-CoV-2 [12]. В то же время ИФА обладает рядом ограничений и недостатков. Например, наличие градиента определяемых концентраций аналита в разных по положению лунках планшета может привести к занижению или завышению истинной концентрации аналита в зависимости от конструкции тест-системы. При использовании наиболее распространенных планшетных тест-систем невозможно определить несколько аналитов в одном образце одновременно.

Использование флуоресцентно меченых микросфер в сочетании с микрофлюидным чипом позволит преодолеть данные ограничения. Как было отмечено ранее, уровень IgG к SARS-CoV-2 используется для оценки напряженности постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Взаимодействие вируса SARS-CoV-2 с мембраной клетки-хозяина обусловлено наличием S-белка, в частности его RBD-фрагмента, мутации в котором привели к появлению британского и индийского вариантов SARS-CoV-2 [13], устойчивых к антителам против варианта Омикрон [14, 15]. В связи с этим для разработки диагностических COVID-19-тест-систем представляют интерес IgG, вырабатываемые именно к RBD-фрагменту S-белка. В предложенной нами тест-системе успешно реализована флуоресцентная детекция специфического иммунного взаимодействия антител в биологических образцах с ковалентно связанным на поверхности микросфер RBD-фрагментом S-белка варианта B.1.617.2 Каппа вируса SARS-CoV-2. Данный вариант вируса, впервые обнаруженный в Индии в декабре 2020 года, ассоциирован с подъемом заболеваемости COVID-19 в 2021 году. Для апробации описываемой тест-системы использован белок именно данного штамма как наиболее актуальный на момент проведения исследования. В то же время одна из

основных идей создания подобной тест-системы — это переход к мультиплексному тестированию.

Таким образом, в дальнейшем предполагается размещение различных вариантов антигенов SARS-CoV-2 на собственном типе микросфер. Разные типы микросфер в данной логике имеют собственные спектральные «паспорта», по которым и происходит их идентификация. Использование в диагностической тест-системе различных вариантов антигенов позволит установить, каким именно штаммом вируса был инфицирован пациент, а также спрогнозировать тип и характер формирования иммунитета. Таким образом, возможно создание полноценной диагностической «лаборатории-на-чипе».

Ограничения исследования

Представленная тест-система для измерения уровня IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека требует валидации на большей выборке для предоставления заключения о возможности использования в клиничко-лабораторной диагностике COVID-19, что планируется выполнить в дальнейших исследованиях. Параметры уровня IgG могут варьировать в зависимости от ряда факторов, таких как наличие в анамнезе недавней или отдаленной инфекции COVID-19, вакцинации и т.д. В задачи данной работы не входило изучение вклада данных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования была разработана микрофлюидная тест-система на основе флуоресцентных микросфер, содержащих иммобилизованный RBD-фрагмент S-белка SARS-CoV-2, для иммунофлуоресцентного обнаружения IgG в сыворотке крови человека. При калибровке системы выявлена прямая зависимость между концентрацией IgG в стандартных растворах известной концентрации и флуоресцентным сигналом. Система апробирована на образцах сыворотки крови добровольцев, содержащих различный уровень IgG к SARS-CoV-2, показана ее прогностическая ценность. На данном этапе продемонстрирована сопоставимость данной тест-системы с классическим методом ИФА. В то же время возможность мультиплексирования системы делает ее намного перспективнее ИФА.

Полученные в ходе данной работы результаты позволяют позиционировать флуоресцентную тест-систему на чипе как количественный метод оценки содержания IgG к SARS-CoV-2.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. *Р.И. Шакуров* — разработка концепции, разработка химических протоколов конъюгирования; *Я.Д. Шанский* — получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме исследования; *К.А. Прусаков, С.В. Сизова, Л.В. Плотникова* — получение экспериментальных данных, анализ полученных данных; *С.П. Дудик* — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме исследования; *В.Н. Лазарев, В.А. Манувера* — получение RBD-фрагмента синтетического S-белка вируса SARS-CoV-2; *Д.В. Клинов* — концепция методики мультиплексной детекции на флуоресцентных микросферах; *Ю.А. Беспятых, Д.В. Басманов* — концепция исследования, написание текста рукописи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. *R.I. Shakurov* — concept development, development of chemical conjugation protocols; *Ya.D. Shansky* — data acquisition and analysis, literature review, manuscript writing; *K.A. Prusakov, S.V. Sizova, L.V. Plotnikova* — data acquisition and analysis; *S.P. Dudik* — literature review, manuscript writing; *V.N. Lazarev, V.A. Manuvera* — the synthesis of RBD of S-protein SARS-CoV-2; *D.V. Klinov* — concept of multiplex detection technique using fluorescent microspheres; *D.V. Basmanov, J.A. Bespyatykh* — study concept, manuscript writing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Научное исследование проведено при поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант № МК-2988.2022.3).

Funding source. This work was supported by the grant of the President of Russian Federation (grant № МК-2988.2022.3).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. Authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [cited 2023 February, 20]. Режим доступа: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Дата обращения: 20.02.2023.
- Баклаушев В.П., Юсубалиева Г.М., Бычинин М.В., и др. Рациональная стратегия поддержания противовирусного иммунитета к новым вариантам SARS-CoV-2 // *Клиническая практика*. 2022. Т. 13, № 3. С. 43–55. [Baklaushv VP, Yusubalieva GM, Bychinin MV, et al. A rational strategy for the maintenance of antiviral immunity to new SARS-CoV-2 strains. *Journal of Clinical Practice*. 2022;13(3):43–55. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract111120
- Fernandes RS, de Oliveira Silva J, Gomes KB, et al. Recent advances in point of care testing for COVID-19 detection. *Biomed Pharmacother* 2022;153:113538. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2022.113538
- Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, et al. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta* 2022;244:123409. doi: 10.1016/J.TALANTA.2022.123409
- Farmer S, Razin V, Peagler AF, et al. Don't forget about human factors: Lessons learned from COVID-19 point-of-care testing. *Cell Reports Methods* 2022;2:100222. doi: 10.1016/J.CRMETH.2022.100222
- Zhong Z, Wang J, He S, et al. An encodable multiplex microsphere-phase amplification sensing platform detects SARS-CoV-2 mutations. *Biosens Bioelectron*. 2022;203:114032.
- Патент РФ № RU 200301 U1/2020.10.15. Прусаков К.А., Басманов Д.В., Алдаров К.Г., и др. Микрофлюидный чип для проведения многопараметрического иммуноанализа. [Patent RUS № RU 200301 U1/2020.10.15. Prusakov KA, Basmanov DV, Aldarov KG, et al. Microfluidic chip for multiparametric immunoassay. (In Russ).] Режим доступа: https://yandex.ru/patents/doc/RU200301U1_20201015. Дата обращения: 20.02.2023.
- Yuan H, Chen P, Wan C, et al. Merging microfluidics with luminescence immunoassays for urgent point-of-care diagnostics of COVID-19. *TrAC Trends Anal Chem* 2022; 157:116814. doi: 10.1016/J.TRAC.2022.116814
- Sheridan C. Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol* 2020;38:515–518. doi: 10.1038/D41587-020-00010-2
- Drain PK, Ampajwala M, Chappel C, et al. A rapid, high-sensitivity SARS-CoV-2 nucleocapsid immunoassay to aid diagnosis of acute COVID-19 at the point of care: A clinical performance study. *Infect Dis Ther*. 2021;10:753–761. doi: 10.1007/S40121-021-00413-X/FIGURES/2
- Chen R, Ren C, Liu M, et al. Early detection of SARS-CoV-2 seroconversion in humans with aggregation-induced near-infrared emission nanoparticle-labeled lateral flow immunoassay. *ACS Nano*. 2021;15:8996–9004. doi: 10.1021/ACS.NANO.1C01932
- Zhou Y, Chen Y, Liu W, et al. Development of a rapid and sensitive quantum dot nanobead-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay and its clinical performance for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies. *Sensors Actuators B Chem* 2021;343:130139. doi: 10.1016/J.SNB.2021.130139
- Hajazadeh F, Khanizadeh S, Khodadadi H, et al. SARS-COV-2 RBD (Receptor binding domain) mutations and variants (A sectional-analytical study). *Microb Pathog* 2022;168:105595. doi: 10.1016/J.MICPATH.2022.105595
- Heggstad JT, Kinnamon DS, Olson LB, et al. Multiplexed, quantitative serological profiling of COVID-19 from blood by a point-of-care test. *Sci Adv* 2021;7:4901–4926. doi: 10.1126/SCIADV.ABG4901/SUPPL_FILE/ABG4901_SOURCE_DATA.XLSX
- Gan HH, Zinno J, Piano F, Gunsalus KC. Omicron spike protein has a positive electrostatic surface that promotes ACE2 recognition and antibody escape. *Front Virol* 2022;2:43. doi: 10.3389/FVIRO.2022.894531

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Шакуров Руслан Ильдарович, м.н.с.;

адрес: Россия, 119435, Москва,

ул. Малая Пироговская, д. 1А;

e-mail: ruslan.shakurov@rcpcm.org;

eLibrary SPIN: 9576-8093;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5986-0676>

Соавторы:

Шанский Ярослав Дмитриевич, к.б.н., н.с.;

e-mail: yar.shansky@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 7640-5940;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>

Прусаков Кирилл Александрович, н.с.;

e-mail: k.prusakov@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 9244-6581;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7244-5741>

Сизова Светлана Викторовна, к.х.н., н.с.;

e-mail: sv.sizova@gmail.com; eLibrary SPIN: 4322-1945;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0846-4670>

Дудик Степан Павлович;

e-mail: stepan.dudik@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 8007-1870;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3157-5902>

Плотникова Людмила Валерьевна;

e-mail: ntmdfs@gmail.com

Манувера Валентин Александрович, к.б.н., с.н.с.;

e-mail: vmanuvera@yandex.ru; eLibrary SPIN: 9010-4521;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2471-0563>

Клинов Дмитрий Владимирович, к.ф.-м.н.;

e-mail: klinov.dmitry@mail.ru; eLibrary SPIN: 9830-8561;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8288-2198>

Лазарев Василий Николаевич, д.б.н.;

e-mail: lazar0@mail.ru; eLibrary SPIN: 1578-8932;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0042-966X>

Беспятах Юлия Андреевна, к.б.н.;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 6003-9246;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

Басманов Дмитрий Викторович;

e-mail: dmitry.basmanov@rcpcm.org;

eLibrary SPIN: 1801-6408;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6620-7360>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Ruslan I. Shakurov, Junior Research Associate;

address: 1a Malaya Pirogovskaya street,

119435 Moscow, Russia;

e-mail: ruslan.shakurov@rcpcm.org;

eLibrary SPIN: 9576-8093;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5986-0676>

Co-authors:

Yaroslav D. Shansky, PhD, Research Associate;

e-mail: yar.shansky@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 7640-5940;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>

Kirill A. Prusakov, Research Associate;

e-mail: k.prusakov@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 9244-6581;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7244-5741>

Svetlana V. Sizova, PhD, Research Associate;

e-mail: sv.sizova@gmail.com; eLibrary SPIN: 4322-1945;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0846-4670>

Stepan P. Dudik;

e-mail: stepan.dudik@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 8007-1870;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3157-5902>

Lyudmila V. Plotnikova;

e-mail: ntmdfs@gmail.com

Valentin A. Manuvera, PhD, Senior Research Assistant;

e-mail: vmanuvera@yandex.ru; eLibrary SPIN: 9010-4521;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2471-0563>

Dmitry V. Klinov, PhD;

e-mail: klinov.dmitry@mail.ru; eLibrary SPIN: 9830-8561;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8288-2198>

Vassili N. Lazarev, PhD;

e-mail: lazar0@mail.ru; eLibrary SPIN: 1578-8932;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0042-966X>

Julia A. Bespyatykh, PhD;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 6003-9246;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

Dmitriy V. Basmanov;

e-mail: dmitry.basmanov@rcpcm.org;

eLibrary SPIN: 1801-6408;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6620-7360>

КОРРЕЛЯЦИЯ УРОВНЯ ЦИНКА В СПЕРМОПЛАЗМЕ С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ФЕРТИЛЬНОСТИ ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА

Д.Л. Луцкий^{1, 2}, А.М. Луцкая^{1, 2}, Р.М. Махмудов³, Е.В. Палкина⁴, А.И. Полунин⁵

¹ Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Российская Федерация

² Лаборатория «ДИАМЕД-экспресс» ООО «РЕПРОДИАМЕД», Астрахань, Российская Федерация

³ Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

⁴ Александро-Мариинская областная клиническая больница, Астрахань, Российская Федерация

⁵ Областной кожно-венерологический диспансер, Астрахань, Российская Федерация

Обоснование. Цинк имеет важное значение для нормального функционирования мужской репродуктивной системы. Данные о диагностическом значении определения цинка в спермоплазме человека и взаимосвязи его уровня с основными параметрами фертильности спермы носят противоречивый характер. **Цель исследования** — изучение корреляций уровня цинка в спермоплазме с характеристиками спермограммы. **Методы.** Исследована сперма мужчин репродуктивного возраста ($n=486$, средний возраст $33,07 \pm 3,03$ года). В образцах спермы кроме стандартной спермограммы были выполнены MAR-тесты (IgA, IgG и IgM), проведена оценка степени фрагментации ДНК сперматозоидов и взаимодействия сперматозоидов с гиалуроновой кислотой; определены активность акрозина и нейтральной альфа-глюкозидазы, уровни лимонной кислоты, фруктозы и гликоделина; исследован уровень активных форм кислорода. Определение уровня цинка в спермоплазме проведено стандартным спектрофотометрическим методом с хромогеном 5-Br-PAPS. Для корреляционного анализа использована формула Пирсона. Исследование проводилось с 2018 г. по май 2022 г., однократно. **Результаты.** Выявлена достоверная отрицательная корреляция уровня цинка в спермоплазме с возрастом мужчин ($r=-0,16$; $p < 0,001$). Уровень цинка в спермоплазме слабоотрицательно коррелировал со временем разжижения и вязкостью спермы. Положительная корреляция была с количеством сперматозоидов ($r=0,13$; $p < 0,01$) и их подвижностью ($r=0,38$; $p < 0,00001$). Уровень цинка в спермоплазме отрицательно коррелировал со степенью фрагментации ДНК сперматозоидов и количеством активных форм кислорода, а с тестом на связывание сперматозоидов с гиалуроновой кислотой — положительно. **Заключение.** Уровень цинка в спермоплазме достоверно коррелирует с рядом физиологических и биохимических характеристик спермы. Полученные данные позволяют рекомендовать определение цинка в спермоплазме не только для оценки функциональной активности предстательной железы, но и для диагностики фертильности эякулята, а также оптимизировать терапию цинксодержащими препаратами и улучшить контроль над эффективностью проводимого лечения.

Ключевые слова: цинк; эякулят; сперматозоиды; фертильность; мужское бесплодие.

Для цитирования: Луцкий Д.Л., Луцкая А.М., Махмудов Р.М., Палкина Е.В., Полунин А.И. Корреляция уровня цинка в спермоплазме с характеристиками фертильности эякулята человека. Клиническая практика. 2023;14(1):54–65. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract115002>

Поступила 30.11.2022

Принята 03.12.2022

Опубликована 30.12.2022

ОБОСНОВАНИЕ

Спермоплазма человека содержит множество макро- и микроэлементов, которые, несомненно, играют важную роль в нормальном функционировании сперматозоидов и формировании их оплодотворяющих свойств [1–3]. Но среди них особое место занимает микроэлемент цинк (Zn): не случайно его концентрация в спермоплазме значительно

выше, чем в любой другой биологической жидкости организма человека [4].

Цинк — единственный среди микроэлементов включен в рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по исследованию эякулята человека в качестве одного из биохимических маркеров фертильности спермы [5]. И действительно, участие цинка в функционировании

CORRELATION OF THE ZINC LEVEL IN THE SPERMOPLASM WITH THE FERTILITY CHARACTERISTICS OF HUMAN EJACULATE

D.L. Lutsky^{1,2}, A.M. Lutskaya^{1,2}, R.M. Makhmudov³, E.V. Palkina⁴, A.I. Polunin⁵

¹ Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

² Laboratory "DIAMED-Express" REPRODIA MED, Astrakhan, Russian Federation

³ Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russian Federation

⁴ Alexander-Mariinsky Regional Clinical Hospital, Astrakhan, Russian Federation

⁵ Regional Skin and Venereological Dispensary, Astrakhan, Russian Federation

Background: Zinc is essential for the normal functioning of the male reproductive system. The data on the diagnostic value of the zinc level in the human spermoplasm and its relationship with the main parameters of the sperm fertility are contradictory. **Aim:** study of the correlations between the zinc level in the spermoplasm and the spermogram characteristics. **Methods:** The sperm of men of the reproductive age ($n=486$, average age 33.07 ± 3.03 years) was studied. In addition to the standard spermogram, MAR tests (IgA, IgG and IgM) were performed in the sperm samples, the degree of fragmentation of the sperm DNA, the sperm interaction with hyaluronic acid, the acrosine activity, and the neutral alpha-glucosidase activity were assessed, the citric acid, fructose and glycodeilin levels were determined, and the level of reactive oxygen species was studied. The zinc level determination in the spermoplasm was carried out by a standard spectrophotometric method with 5-Br-PAPS chromogen. The Pearson's formula was used for the correlation analysis. The study was conducted from 2018 to May 2022, once. **Results:** A significant negative correlation of the zinc level in the spermoplasm with the age of men was revealed ($r=-0.16$; $p < 0.001$). The level of zinc in the spermoplasm weakly negatively correlated with the dilution time and with the viscosity of the sperm. The positive correlation was found with the number of spermatozoa ($r=0.13$; $p < 0.01$) and their mobility ($r=0.38$; $p < 0.00001$). The level of zinc in the spermoplasm negatively correlated with the degree of the sperm DNA fragmentation and with the amount of reactive oxygen species, and positively correlated with the results of the test for binding to hyaluronic acid. **Conclusions:** The level of zinc in the spermoplasm significantly correlates with a number of physiological and biochemical characteristics of the sperm. The data obtained allow us to recommend determination of the zinc level in the sperm plasma to not only assess the functional activity of the prostate gland, but also to diagnose the fertility of the ejaculate, as well as to optimize the therapy with zinc-containing drugs and improve the control over the effectiveness of the treatment.

Keywords: zinc; ejaculate; sperm; fertility; male infertility.

For citation: Lutsky DL, Lutskaya AM, Makhmudov RM, Palkina EV, Polunin AI. Correlation of the Zinc Level in the Spermoplasm with the Fertility Characteristics of Human Ejaculate. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):54–65. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract115002>

Submitted 30.11.2022

Revised 03.12.2022

Published 30.12.2022

более трехсот металлоферментов [6] справедливо позволяет отнести его к группе эссенциальных микроэлементов [7].

Нарушение метаболизма цинка может быть обусловлено не только природными эндогенными факторами, но и экзогенными, а также техногенными [8], тем более что природные геохимические аномалии в распределении этого элемента встречаются в целом ряде стран (Португалия, Иран, Египет, Турция, Панама и др.), включая и ряд регионов России [9, 10].

Препараты цинка давно используются для лечения заболеваний органов мужской репро-

дуктивной системы [6, 11]. Однако, несмотря на признаваемую всеми исследователями важную роль цинка в функционировании репродуктивной системы мужчин [7, 11–13], данные о диагностическом значении определения этого микроэлемента в спермоплазме человека и взаимосвязи его уровня с основными параметрами фертильности спермы носят довольно противоречивый характер (табл. 1). Так, например, в работе A.F. Palani и A.H. Alshatteri [2] показано отсутствие корреляции подвижности, морфологии и количества сперматозоидов с уровнем цинка в спермоплазме. В работах других исследователей сообщается

Таблица 1 / Table 1

**Корреляция уровня цинка в спермоплазме с основными параметрами спермограммы
по данным литературы /**
**Correlation of the zinc level in the spermoplasm with the main parameters of the spermogram
according to the literature**

Количество сперматозоидов	Морфология сперматозоидов	Подвижность сперматозоидов	Общее количество обследованных (фертильных/ субфертильных)	Средний возраст обследованных (фертильных/ субфертильных)	Метод определения цинка в спермоплазме	Год публикации	Источник литературы
+	N	–	106 (8/98)	нд	ПК	1999	[14]
+	N	+	210 (103/107)	34,2±4,3/34,8±5,3	ААС-ПА	2000	[15]
+	N	N	210 (107/103)	нд	ААС-ПА	2001	[1]
+	+	+	170 (20/150)	нд	ААС-ПА	2005	[16]
+	+	N	72 (36/36)	30,44±3,83/30,02±3,88	ААС-ПА	2009	[17]
N	нд	N	99 (39/60)	31,87±3,76*	ПК	2009	[18]
+	N	N	152 (61/91)	33,43±5,10*	ААС-ПА	2010	[19]
+	N	+	1618 (318/1300)	33,09±0,59/34,33±0,37	ПК	2011	[4]
+	N	+	250 (60/190)	33,43±4,40/37,80±4,54	ААС-ПА	2012	[20]
+	+	+	52 (8/44)	нд	ААС-ПА	2013	[21]
нд	+	+	110 (50/60)	35,0±9,5*	ПК	2016	[22]
N	N	N	131 (25/106)	32,3±6,9/36,3±6,9	ОЭС-ИСП	2017	[2]
N	нд	N	106 (96/96)	30,2±5,3/31,2±5,9	ААС-ПА	2018	[3]
+	+	+	144	нд	ААС-ПА	2018	[23]
+	нд	нд	276 (176/100)	32 (30–37)/35 (31–38)	ПК	2020	[24]
N	+	+	70 (40/30)	36,80±4,91/37,74±5,41	ААС-ПА	2021	[25]
N	N	+	70	32,50±6,58*	ААС-ПА	2022	[26]

Примечание. * — средний возраст всех обследованных; «нд» — данные не приводятся; «N» — корреляция отсутствует; «+» — достоверная положительная корреляция; «–» — достоверная отрицательная корреляция. ААС-ПА — атомно-абсорбционная спектроскопия с пламенной атомизацией; ПК — прямая колориметрия (спектрофотометрия); ОЭС-ИСП — оптическая эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.

Note: * — the average age of all the examined persons; нд — the data are not provided by the author; N — no correlation found; «+» — reliable positive correlation; «–» — reliable negative correlation; ААС-ПА — atomic absorption spectroscopy with flame atomization; ПК — direct colorimetry (spectrophotometry); ОЭС-ИСП — optical emission spectrometry with inductively coupled plasma.

о достоверной корреляции уровня цинка в спермоплазме с подвижностью, морфологией и количеством сперматозоидов [16, 21]. В ряде исследований установлена достоверная корреляция уровня цинка в спермоплазме только с количеством сперматозоидов [1, 19, 24] (рис. 1), в то время как в работах других авторов показаны корреляции спермоплазменного уровня цинка с морфологией и подвижностью сперматозоидов, но не с количеством сперматозоидов [25] или только с подвижностью [26] (рис. 16, в).

Использование разных методических подходов к определению уровня цинка в спермоплазме также не может объяснить противоречивость полученных

данных (рис. 1г), тем более что для основных методов определения уровня цинка в спермоплазме, а именно атомно-абсорбционной спектроскопии с пламенной атомизацией и прямой колориметрии (спектрофотометрии), показана высокая степень корреляции ($r=0,996$, $n=105$) [27]. Не случайно все исследовательские работы, включая обзоры и метаанализы, в заключение делают вывод о необходимости дальнейших исследований взаимосвязи уровня цинка в спермоплазме с параметрами фертильности эякулята.

Цель исследования — изучение корреляций уровня цинка в спермоплазме с характеристиками спермограммы.

МЕТОДЫ**Дизайн исследования**

Двухцентровое наблюдательное когортное ретроспективное.

Критерии соответствия

Критерии включения: мужской пол.

Критерии не включения: рак предстательной железы; синдромом Данболта–Клосса, болезнь Прасада; вредные привычки (курение, алкоголизм); лечение цинксодержащими, а также препаратами, способными оказывать негативное воздействие на мужскую фертильность [28].

Критерии исключения: азооспермия.

Условия проведения

Исследование выполнено на базе лаборатории «ДИАМЕД-экспресс» ООО «РЕПРОДИАМЕД» и клинико-диагностической лаборатории Александро-Мариинской областной клинической больницы (Астрахань).

Продолжительность исследования

Исследование проводилось однократно в период с 2018 г. по май 2022 г.

Описание медицинского вмешательства

Для достижения поставленной цели пациентам, обратившимся для проведения спермограммы, выполнены комплексный анализ эякулята и определение уровня цинка в спермоплазме.

Комплексный анализ спермы, кроме выполнения стандартной спермограммы по протоколу ВОЗ [5], включал MAR-тест (Mixed Agglutination Reaction) или IBD-тест (ImmunoBead Direct) для выявления на поверхности сперматозоидов антиспермальных антител — иммуноглобулинов изотипов А, G, M; определение в спермоплазме лимонной кислоты, фруктозы, активности нейтральной α -глюкозидазы и акрозина, степени фрагментации ДНК сперматозоидов (Sperm DNA Fragmentation, SDF-тест), взаимодействия сперматозоидов с гиалуроновой кислотой и уровня оксидативного стресса.

Для оценки результатов спермограммы использовали нормативные значения (табл. 2), рекомендованные экспертной группой ВОЗ [5] и общепринятые в лабораторной диагностике при исследовании эякулята [29].

Для выполнения MAR-теста использовали коммерческие наборы SpermMar IgA и SpermMar IgG

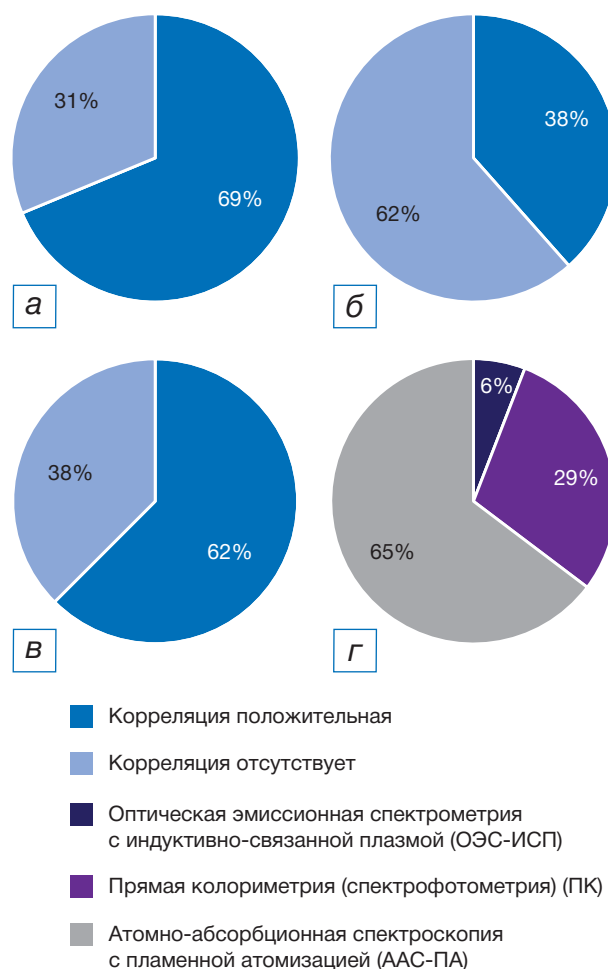


Рис. 1. Взаимосвязь уровня цинка с параметрами спермоплазмы по данным литературы. Частота выявления взаимосвязи с количеством (а); морфологией (б) и подвижностью (в) сперматозоидов; (г) — методы определения цинка в спермоплазме.

Fig. 1. Correlation of zinc levels with sperm parameters according to the literature. Frequency of zinc relationship with the amount (a); morphology (б) and motility (в) of spermatozoa; (г) — methods for determining zinc in spermoplasm.

(FertiPro, Бельгия), а также ImmunoSpheres AntilgM (Bioscreen Inc., США). Исследование проводили в соответствии с рекомендациями экспертной группы ВОЗ [29].

Определение в спермоплазме уровня лимонной кислоты проводили спектрофотометрическим методом с использованием коммерческого набора Citric Acid Test (FertiPro, Бельгия). Оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм [29].

Для определения в спермоплазме уровня фруктозы использовали спектрофотометрический метод. В работе применяли коммерческий набор

Таблица 2 / Table 2

**Референсные значения показателей фертильности эякулята /
Reference values of the ejaculate fertility indicators**

Характеристики эякулята	Значение параметров спермограммы	Единицы измерения
Объем	>1,5	мл
Вязкость эякулята	<2,0	см
Общее количество сперматозоидов	>40,0	$\times 10^6$
Концентрация сперматозоидов	>15,0	$\times 10^6/\text{мл}$
Активно подвижные сперматозоиды (категория «a»)	>25,0	%
Прогрессивно подвижные сперматозоиды (категория «a+b»)	>50,0	%
Жизнеспособность сперматозоидов (витальная окраска и/или HOS-тест)	>58,0	%
Нормальные формы сперматозоидов	>4,0	%
pH	$\geq 7,2$	-
Лейкоциты	<1,0	$\times 10^6/\text{мл}$
Неспецифическая агрегация сперматозоидов	Отсутствует	-
Агглютинация сперматозоидов	Отсутствует	-
MAR-тест (или IBD-тест)	<50,0	%
HBA-тест	>80,0	%
SDF-тест	<15,0	%
Цинк	>150,0	мкг/эякулят
Лимонная кислота	>10,0	мг/эякулят
Фруктоза	>2,4	мг/эякулят
Нейтральная альфа-глюкозидаза	>20,0	мМЕ/эякулят
Акрозин	от 50,0 до 250,0	мкМЕ/ 10^6 сперматозоидов
Гликоделин-S	от 20,0 до 200,0	мкг/мл
ROS (активные формы кислорода)	Уровень-1 (низкий)	-

Fructose Test (FertiPro, Бельгия). Оптическую плотность определяли при длине волны 492 нм [29].

Активность нейтральной α -глюкозидазы определяли спектрофотометрическим методом с р-нитро-фенил- α -D-глюкопиранозидом в качестве субстрата. Для исследования использовали коммерческий набор EpiScreen Plus (FertiPro, Бельгия). Оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм [29].

Для определения степени фрагментации ДНК сперматозоидов использовали непрямой метод оценки дисперсии хроматина (Sperm Chromatin Dispersion, SCD), в основе которого лежит восприимчивость ДНК сперматозоидов к кислотной денатурации. Неповрежденные цепи ДНК раскрываются после денатурации и экстракции ядерных белков, в то время как при фрагментации ДНК дисперсии не происходит или она бывает минимальной. Метод SCD основан на способности неповрежденного хроматина сперматозоидов образовывать ореолы

дисперсии (halo) после воздействия кислоты и лизирующего раствора. Ореолы (halo) соответствуют развернутым петлям ДНК, которые прикреплены к остаточным структурам ядра, образующимся после удаления ядерных белков. Разрывы ДНК, поскольку они подвержены денатурации, препятствуют образованию ореолов (halo). Детекцию образующихся ореолов проводили с использованием световой микроскопии [29]. В работе использовали коммерческие наборы GoldCyto DNA (Guangzhou Jinsaita Trading, Китай) и Halosperm G2 (Halotech DNA, Испания).

Тест HBA (Hyaluronan Binding Assay) проводили на слайдах с иммобилизованной гиалуроновой кислотой по стандартной методике с использованием коммерческого набора HBA Assay (Biocoat Inc., США) [29].

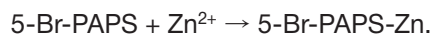
Активность акрозина определяли стандартным спектрофотометрическим методом с N- α -бензоил-

DL-аргинин-р-нитроанидидом (BAPNA) в качестве субстрата при помощи коммерческого набора AcroScreen (Bioscreen Inc., США). Оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм [29].

Определение гликоделина в спермоплазме проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа в «сэндвич»-модификации с использованием коммерческого набора «АМГФ Фертитест-М» (ООО «Диатекс-ЭМ», Россия).

Для определения активных форм кислорода (Reactive Oxygen Species, ROS) использовали колориметрический метод с нитросиним тетразолием (НСТ). Метод основан на способности супероксидного анион-радикала восстанавливать водорастворимый НСТ до нерастворимого в воде формазана. Кристаллы формазана имеют интенсивную синюю окраску [29]. В работе использовали коммерческий набор OxiSperm (Halotech DNA, Испания).

Определение уровня цинка в спермоплазме проводили стандартным спектрофотометрическим методом [29], при котором хромоген 5-Br-PAPS [2-(5-нитро-2-пиридилазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенол], связываясь с цинком, меняет цвет:



Комплекс 5-Br-PAPS-Zn поглощает свет с длиной волны 560 нм (550–580). Оптическая плотность образующегося стабильного комплекса пропорциональна содержанию цинка в пробе.

В работе использовали коммерческий набор Zinc Sp-DAC.Lq (DAC-SpectroMed s.r.l., Республика Молдова). Оптическую плотность определяли при длине волны 570 нм. Границы линейности — 0–10,0 мкг/мл (эквивалентно 1000,0 мкг/мл в цельном образце). Внутрисерийный коэффициент вариации (воспроизводимость в пределах периода) — CV ≤3,0%. Межсерийный коэффициент вариации (воспроизводимость от периода к периоду) — CV ≤6,5%.

Этическая экспертиза

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками от 2013 года. От всех обследованных лиц получено информированное согласие на проведение исследования и использование анонимизированных данных о состоянии их здоровья в научных целях.

Статистический анализ

Исходя из поставленной цели, для статистического анализа использовали t-критерий Стьюдента, коэффициент линейной корреляции (формула Пирсона), программный пакет MedCalc Ver.19.8 (MedCalc Software Ltd., Бельгия). В качестве порогового уровня статистической значимости принято значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

Всего обследовано 510 пациентов, соответствующих критериям включения и невключения, из них у 24 (4,7%) установлена азооспермия, и в соответствии с заявленными критериями эякуляты этих пациентов были исключены из дальнейшей работы.

Оставшиеся 486 мужчин в возрасте от 17 до 68 лет приняли участие в дальнейшем исследовании, из них 407 субфертильных пациентов и 79 условно здоровых с подтвержденной фертильностью (дети в возрасте до полутора лет). Более подробная характеристика приведена в табл. 3.

Основные результаты исследования

При определении концентрации цинка в спермоплазме выявлена достоверная отрицательная корреляция с возрастом мужчин ($p < 0,001$). Несмотря на значительные индивидуальные различия, у мужчин моложе 30 лет уровень цинка в спермоплазме

Таблица 3 / Table 3

Характеристика обследованной группы пациентов /
Characteristics of the examined group of patients

Характеристика	Все обследованные	Фертильные	Субфертильные
Число пациентов, n	486	79	407
Средний возраст, лет	33,07±3,03	33,12±3,06	33,06±3,02
Минимальный возраст, лет	17	20	17
Максимальный возраст, лет	68	68	58

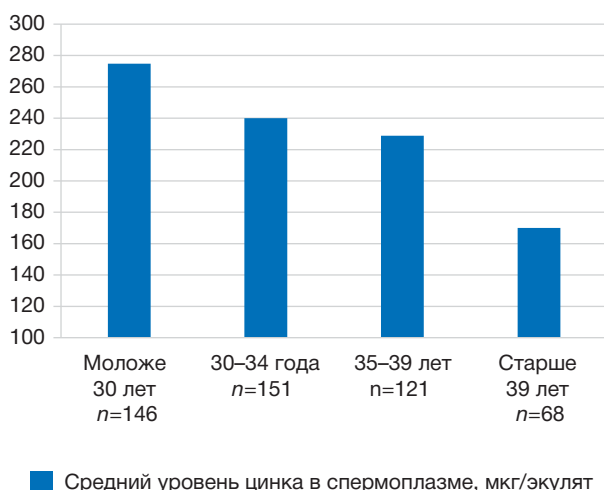


Рис. 2. Средний уровень цинка в спермоплазме у мужчин разных возрастных групп.

Fig. 2. The average level of zinc in the spermoplasm in men of different age groups.

в среднем был значительно выше, чем у мужчин в возрасте 40 лет и старше (рис. 2).

Анализ физико-химических свойств эякулята в сопоставлении с уровнем цинка в спермоплазме показал очень слабые отрицательные корреляции со временем разжижения и с вязкостью спермы ($r=-0,0984$ и $r=-0,0917$ соответственно при $p < 0,05$); табл. 4.

Что касается основных характеристик оплодотворяющей способности спермы, то уровень цин-

ка в спермоплазме показал слабую, но достоверную корреляцию ($r=0,1345$; $p < 0,01$) с количеством сперматозоидов в эякуляте; корреляция с подвижностью сперматозоидов была более сильной ($r=0,3825$; $p < 0,00001$); см. табл. 4.

Наряду с количеством и подвижностью, одной из важных характеристик фертильности сперматозоидов является их морфология, однако при анализе уровня цинка в спермоплазме эякулятов с различным содержанием морфологически нормальных и дефективных форм сперматозоидов нам не удалось обнаружить достоверной коррелятивной связи.

С жизнеспособностью сперматозоидов уровень цинка в спермоплазме коррелировал слабоположительно (см. табл. 4).

Некоторое количество лейкоцитов в норме всегда присутствует в сперме, но если концентрация лейкоцитов составляет более 10^6 /мл, это считается лейкоспермией и, как правило, свидетельствует о воспалительном процессе (часто инфекционной природы) в органах мужской репродуктивной системы. В проведенном исследовании мы наблюдали достоверную слабоотрицательную корреляцию уровня лейкоцитов и уровня цинка ($r=-0,1180$; $p < 0,05$).

При анализе наличия антиспермальных антител разных классов (IgA, IgG, IgM) на поверхности сперматозоидов (MAR-тест) значимой корреляции с уровнем цинка в спермоплазме не наблюдалось.

Таблица 4 / Table 4

**Корреляция уровня цинка в спермоплазме и показателей спермограммы /
Correlation between the zinc level in the spermoplasm and the spermogram parameters**

Корреляция уровня цинка в спермоплазме (мкг/эякулят), $n=486$	Коэффициент линейной корреляции (формула Пирсона), r	p
Возраст пациента	-0,1625	<0,001
Количество сперматозоидов	0,1345	<0,01
Подвижность сперматозоидов	0,3825	<0,00001
Морфология сперматозоидов	Не коррелирует	Недостоверно
Вязкость эякулята	-0,0917	<0,05
Время разжижения эякулята	-0,0984	<0,05
pH эякулята	Не коррелирует	Недостоверно
Жизнеспособность сперматозоидов	0,1381	<0,01
Концентрация лейкоцитов в эякуляте	-0,1180	<0,01
MAR-тест (IgA)	Не коррелирует	Недостоверно
MAR-тест (IgG)	Не коррелирует	Недостоверно
MAR-тест (IgM)	Не коррелирует	Недостоверно
SDF-тест	-0,1907	<0,0001
HBA-тест	0,1201	<0,01

Дальнейшее исследование, выходящее за рамки стандартной спермограммы, показало, что степень нарушения целостности ДНК сперматозоидов (выявленная при проведении SDF-теста) отрицательно коррелирует с уровнем цинка в спермоплазме (см. табл. 4).

Тест на связывание с гиалуроновой кислотой (Hyaluronan Binding Assay, HBA-тест) позволяет оценить характер взаимодействия сперматозоидов с прозрачной оболочкой яйцеклетки (*zona pellucida*), что играет важную роль в оценке оплодотворяющей способности спермы. Обнаружена слабая положительная корреляция результатов HBA-теста с уровнем цинка в спермоплазме ($r=0,1201$; $p < 0,01$).

Исследование корреляций биохимических параметров эякулята с уровнем цинка позволило установить достоверные положительные корреляции «цинк–лимонная кислота» ($p < 0,001$) и «цинк–активность акрозина» ($p < 0,00001$) и слабоотрицательную корреляцию «цинк–ROS» ($p < 0,01$); табл. 5.

По полученным нами данным, уровень цинка в спермоплазме не коррелировал с концентрацией фруктозы, уровнем гликоделина и активностью нейтральной альфа-глюкозидазы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные о достоверной отрицательной корреляции уровня цинка в эякуляте с возрастом мужчин подтверждают ранее полученные данные [9]. Однако до сих пор в отдельных работах взаимосвязь уровня цинка в спермоплазме с возрастом не прослеживается. Например, в относительно свежей работе Н.А. Bazid и соавт. [26] достоверной корреляции уровня цинка в сперме с возрастом не выявлено, на наш взгляд, из-за недостаточного объема выборки ($n=70$). Полученный нами коэффициент корреляции оказался низким ($r=-0,0984$; $p < 0,001$; $n=486$), но характеризовался

достаточно высокой достоверностью, что подтверждает вывод о снижении с возрастом среднего уровня цинка в спермоплазме (см. рис. 2).

При анализе литературы выяснилось, что исследования взаимосвязей уровня спермоплазменного цинка со временем разжижения и вязкостью спермы крайне немногочисленны. Несильные, но достоверные ($p < 0,05$) отрицательные корреляции уровня цинка в спермоплазме со временем разжижения эякулята и с вязкостью спермы, полученные нами в ходе проведенного исследования в целом, согласуются с ранее полученными данными [19]. Пролонгированное время разжижения эякулята на фоне сниженного уровня цинка, вероятно, обусловлено некоторым снижением активности цинкзависимых металлоферментов, которые принимают участие в процессе разжижения коагулировавшей после эякуляции спермы.

Заявленная D. Dissanayake и соавт. [19] корреляция уровня цинка в спермоплазме с pH эякулята ($r=-0,193$; $p < 0,05$; $n=152$) при исследовании нами в 3 раза большего количества образцов ($n=486$) не была подтверждена.

Большинство исследовательских работ сосредоточено на исследовании взаимосвязи уровня цинка в спермоплазме с наиболее значимыми характеристиками фертильности эякулята: количеством, двигательной активностью и морфологией сперматозоидов. Именно с этими параметрами связаны наиболее противоречивые результаты. Наблюдаемые противоречия связаны, на наш взгляд, с недостаточной репрезентативностью: во многих работах число наблюдений не превышает 200 образцов спермы (см. табл. 1), а иногда и меньше 100: $n=99$ [18], $n=72$ [17], $n=70$ [25], $n=70$ [26], $n=52$ [21]. В пяти представленных в качестве примера работах исследовано в общей сложности всего 363 образца эякулята, и получены противоречивые

Таблица 5 / Table 5

**Корреляция уровня цинка и других биохимических компонентов спермоплазмы /
Correlation between the level of zinc and other biochemical components of the spermoplasm**

Корреляция уровня цинка в спермоплазме (мкг/эякулят), $n=486$	Коэффициент линейной корреляции (формула Пирсона), r	p
Концентрация лимонной кислоты	0,1541	$<0,001$
Концентрация фруктозы	Не коррелирует	Недостоверно
Концентрация гликоделина-S	Не коррелирует	Недостоверно
Активность нейтральной альфа-глюкозидазы	Не коррелирует	Недостоверно
Активность акрозина	0,2137	$<0,00001$
Уровень ROS (активных форм кислорода)	-0,1212	$<0,01$

данные. Такой объем выборки представляется недостаточным для выявления слабых корреляций и вызывает путаницу при интерпретации полученных результатов.

По нашим данным ($n=486$), уровень цинка в спермоплазме слабоположительно коррелирует с количеством сперматозоидов ($p < 0,01$), что, вероятно, обусловлено участием цинка в процессе сперматогенеза при митозе сперматогоний и мейозе сперматоцитов, например, через регуляцию одного из ключевых ферментов — рибонуклеазы [7, 30]. Полученные нами данные согласуются с достаточно презентативным исследованием ($n=1618$), показавшим, что уровень цинка в спермоплазме пациентов с олигозооспермией в среднем более чем на 20% ниже, чем у пациентов с нормозооспермией [4].

Проведенный метаанализ взаимосвязи уровня цинка в спермоплазме с двигательными характеристиками сперматозоидов показал большую неоднородность данных, но в целом было показано, что при астенозооспермии уровень цинка в спермоплазме более низкий в сравнении с эякулятами с нормальной подвижностью сперматозоидов [31]. Известно, что тестикулярные и эпидидимальные сперматозоиды содержат меньше интрацеллюлярного цинка, чем эякулированные сперматозоиды ($2,56 \pm 0,51$ и $12,58 \pm 3,16$ против $40,48 \pm 12,71$ нг Zn на 10^6 сперматозоидов соответственно) [32]. Цинк присутствует в митохондриях сперматозоидов и вдоль жгутиков [12]. Поддержание баланса экстра- и интрацеллюлярного цинка осуществляется системой рецепторов и белков-переносчиков, один из транспортно-регуляторных путей включает следующий каскад: GPR39 (G protein-coupled receptor 39 type; zinc-sensing receptor) – аденилилциклаза – циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – протеинкиназа A – тирозинкиназа SRC – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) – фосфолипаза C [33]. При этом передача сигналов вторичных мессенджеров (цАМФ) организована в сперматозоидах в субклеточных доменах (головка, основная часть жгутика, концевая часть жгутика) [34], что позволяет эффективно регулировать подвижность сперматозоидов, включая и своевременную стимуляцию гиперактивности за счет поддержания оптимального баланса цинка внутри сперматозоидов [35], что невозможно без достаточного уровня цинка в спермоплазме. Что и подтверждается наблюдавшейся нами значимой корреляцией уровня цинка с подвижностью сперматозоидов ($p < 0,00001$). Схожие регуляторные

механизмы, вероятно, объясняют и корреляцию уровня цинка в спермоплазме с активностью акрозина, так как рецептор GPR39 обнаружен не только на жгутике, но и на акросоме сперматозоида [33], и цинк может стимулировать акросомальный экзоцитоз сперматозоидов млекопитающих [12, 36].

В отличие от некоторых других исследователей, достоверной корреляции уровня цинка в спермоплазме с морфологией сперматозоидов мы не наблюдали. Вероятно, выявленные другими исследователями зависимости уровня спермоплазменного цинка и морфологии сперматозоидов обусловлены недостаточным объемом выборки (например, $n=70$ [25], $n=52$ [21]) или неслучайным характером выборки (например, наличие у пациентов урогенитального хламидиоза) [22].

Положительная корреляция уровня цинка в спермоплазме с жизнеспособностью сперматозоидов, на наш взгляд, может быть обусловлена участием этого микроэлемента в стабилизации мембран сперматозоидов как путем регуляции фазового состояния мембранных липидов [7, 15], так и за счет участия в антиоксидантной защите [6, 37]. Не исключено, что определенную роль может играть участие цинка в регуляции процесса ферроптоза сперматозоидов [38].

В работе белорусских коллег была показана достаточно сильная корреляция ($r=0,40$; $p < 0,05$; $n=144$) между уровнем цинка в спермоплазме и общей антиоксидантной активностью спермоплазмы [23]. Действительно, мы наблюдали достоверную ($p < 0,01$) отрицательную корреляцию уровня цинка в спермоплазме с уровнем активных форм кислорода в эякуляте. Участие цинка в системе антиоксидантной защиты может реализоваться как через цинксодержащие ферменты, например супероксиддисмутазу, так и через неферментативные механизмы, что подтверждается другими исследователями [7].

Слабоотрицательная корреляция уровня цинка в спермоплазме с концентрацией лейкоцитов в эякуляте, которую мы наблюдали, подтверждает ранее полученные данные [39]. В ряде случаев снижение уровня цинка в сперме отражает нарушение функциональной активности предстательной железы при простатитах, которые часто становятся причиной лейкоспермии [40, 41]. Урогенитальные инфекции, наиболее частые причины лейкоспермии, также могут сопровождаться снижением уровня цинка в спермоплазме, но не во всех случаях. Например, при урогенитальном хламидиозе уровень цинка в спермоплазме, по данным О.Р. Зиганшина и соавт. [22], был достоверно снижен, в то

же время, по нашим данным, при урогенитальном уреаплазмозе значимого изменения уровня цинка в спермоплазме не наблюдалось [42]. Следует также отметить, что системные воспалительные процессы могут влиять на уровень цинка в спермоплазме. Например, после COVID-19 в отдельных исследованиях отмечалось снижение уровня цинка в спермоплазме ($p \leq 0,05$; $n=17$) на фоне фрагментации ДНК сперматозоидов 15% и выше [43]. В проведенном нами исследовании ($n=144$) после бессимптомных и легких форм COVID-19 достоверного изменения уровня цинка в спермоплазме не отмечено [44]. Указанные выше противоречия, на наш взгляд, объясняются особенностями воздействия разных патогенов на макроорганизм и различной тяжестью протекания инфекционного процесса.

Наблюдавшаяся отрицательная корреляция уровня цинка в спермоплазме и степени фрагментации ДНК сперматозоидов полностью согласуется с ранее полученными данными [45]. Цинк участвует в образовании связей типа S–Zn–S в структуре протамина, действует как регулятор дисульфидных поперечных связей в ядре сперматозоида [7], улучшает метилирование ДНК и целостность хроматина при токсических воздействиях [46].

Корреляция уровня цинка в спермоплазме с результатами НВА-теста, на наш взгляд, может быть обусловлена свойством цинка регулировать степень сродства рецепторов через механизм конформационных изменений, модулируя таким образом процесс взаимодействия сперматозоидов с *zona pellucida* [47, 48].

Положительная корреляция уровня в спермоплазме цинка и лимонной кислоты обусловлена общим местом биосинтеза — предстательной железой [40]; кроме того, секреция цинка происходит частично в комплексе с лимонной кислотой, которая выступает в роли лиганда [7].

В отличие от некоторых других исследователей [49], мы не обнаружили какой-либо корреляции уровня цинка в спермоплазме с активностью нейтральной альфа-глюкозидазы (имеющей эпидидимальное происхождение), а также с уровнем в спермоплазме фруктозы и гликоделина (секретируемых семенными пузырьками).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана корреляция уровня цинка в спермоплазме с рядом физиологических и биохимических характеристик спермы. Полученные данные позволяют рекомендовать определение цинка в спер-

моплазме не только для оценки функциональной активности предстательной железы, но и для диагностики фертильности эякулята, а также оптимизировать терапию цинксодержащими препаратами и улучшить контроль над эффективностью проводимого лечения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ /

ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. Д.Л. Луцкий — концепция и дизайн исследования, статистический анализ данных, написание рукописи; Р.М. Махмудов — статистический анализ данных; А.М. Луцкая — сбор и обработка материала, написание рукописи, Е.В. Палкина, А.И. Полуни — сбор и обработка материала, редактирование рукописи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. D.L. Lutsky — research concept and design, statistical data analysis, manuscript writing; R.M. Makhmudov — statistical data analysis; A.M. Lutskaya — collection and processing of material, manuscript writing; E.V. Palkina, A.I. Polunin — collection and processing of the data, manuscript editing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Funding source. The study had no sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wong WY, Flik G, Groenen PM, et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol*. 2001;15(2):131–136. doi: 10.1016/S0890-6238(01)00113-7
2. Palani AF, Alshatteri AH. Impact of trace elements in the seminal plasma on sperm quality in infertile men. *ZJPAS*. 2017;29(4): 150–156. doi: 10.21271/ZJPAS.29.s4.18

3. Hashemi MM, Behnampour N, Nejabat M, et al. Impact of seminal plasma trace elements on human sperm motility parameters. *J Intern Med*. 2018;56(1):15–20. doi: 10.1515/rjim-2017-0034
4. Khan MS, Zaman S, Sajjad M, et al. Assessment of the level of trace element zinc in seminal plasma of males and evaluation of its role in male infertility. *Int J Appl Basic Med Res*. 2011;1(2): 93–96. doi: 10.4103/2229-516X.91152
5. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: WHO Press; 2021. 276 p.
6. Skalny AV, Aschner M, Tinkov AA. Zinc. *Adv Food Nutr Res*. 2021;96:251–310. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.01.003
7. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar A. Zinc is an essential element for male fertility: A review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *J Reprod Infertil*. 2018;19(2):69–81.
8. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. Москва: Медицина, 1991. 496 с. [Avtsyn AP, Zhavoronkov AA, Rish MA, Strochkova LS. Human microelementoses: etiology, classification, organopathology. Moscow: Medicina; 1991. 496 p. (In Russ).]
9. Brown KH, Rivera JA, Bhutta Z, et al. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull*. 2004;25(1 Suppl 2):S99–203.
10. Сальникова Е.В. Потребность человека в цинке и его источники // *Микроэлементы в медицине*. 2016. Т. 17, № 4. С. 11–15. [Salnikova EV. Human needs for zinc and its sources. *Trace elements med*. 2016;17(4):11–15. (In Russ).] doi: 10.19112/2413-6174-2016-17-4-11-15
11. Полунин А.И., Мирошников В.М., Николаев А.А., и др. Использование препарата цинка в лечении мужской субфертильности // *Микроэлементы в медицине*. 2001. Т. 2, № 4. С. 44–46. [Polunin AI, Miroshnikov VM, Nikolaev AA, et al. The use of zinc preparation in the treatment of male subfertility. *Trace elements med*. 2001;2(4):44–46. (In Russ).]
12. Allouche-Fitoussi D, Breitbart H. The role of zinc in male fertility. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7796. doi: 10.3390/ijms21207796
13. Осадчук Л.В., Даниленко А.Д., Осадчук А.В. Влияние цинка на мужскую фертильность // *Урология*. 2021. № 5. С. 84–93. [Osadchuk LV, Danilenko AD, Osadchuk AV. The effect of zinc on male fertility. *Urologiya*. 2021;5(5):84–93. (In Russ).] doi: 10.18565/urology.2021.5.84-93
14. Fuse H, Kazama T, Ohta S, Fujiuchi Y. Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol*. 1999;31(3):401–408. doi: 10.1023/a:1007190506587
15. Chia SE, Ong CN, Chua LH, et al. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl*. 2000;21(1):53–57.
16. Zhao RP, Xiong CL. [Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic patients.] *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2005; 11(9):680–682. (In Chinese).
17. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res*. 2009;29(2):82–88. doi: 10.1016/j.nutres.2008.11.007
18. Abdul-Rasheed OF. The relationship between seminal plasma zinc levels and high molecular weight zinc binding protein and sperm motility in Iraqi infertile men. *Saudi Med J*. 2009;30(4):485–489.
19. Dissanayake D, Wijesinghe P, Ratnasooriya W, Wimalasena S. Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. *J Hum Reprod Sci*. 2010;3(3):124–128. doi: 10.4103/0974-1208.74153
20. Atig F, Raffa M, Habib BA, et al. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urology*. 2012;12(6):1–8. doi: 10.1186/1471-2490-12-6
21. Sundaram V, Srinivas M, Gurunathan J, et al. Influence of trace elements and their correlation with semen quality in fertile and infertile subjects. *Turk J Med Sci*. 2013;43(6):1000–1007. doi: 10.3906/sag-1211-54
22. Зиганшин О.Р., Гизингер О.А., Францева О.В. Снижение цинка в семенной жидкости как фактор нарушения фертильности у пациентов с хламидийным поражением мочеполовой системы // *Клиническая дерматология и венерология*. 2016. Т. 15, № 4. С. 42–47. [Ziganshin OR, Gizinger OA, Frantseva OV. Decrease in zinc level in the semen as a factor of impaired fertility in patients with Chlamydial infection of the genitourinary system. *Clin Dermatol Venereol*. 2016;15(4):42–47. (In Russ).] doi: 10.17116/klinderma201615442-47
23. Ниткин Д.М., Ракевич М.В., Коледа А.Г., и др. Характеристики репродуктивного потенциала эякулята в зависимости от антропометрического статуса и метаболического состояния организма мужчин фертильного возраста // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2018;7(4):517–526. [Nitkin DM, Rakevich MV, Koleda AG, et al. Characteristics of the reproductive potential of ejaculate depending on anthropometric status and metabolic condition of the organism of fertile men. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2018;7(4): 517–526. (In Russ).]
24. Milostić-Srb A, Včev A, Tandara M, et al. Importance of zinc concentration in seminal fluid of men diagnosed with infertility. *Acta Clin Croat*. 2020;59(1):154–160. doi: 10.20471/acc.2020.59.01.19
25. Aljaser F, Tabassum H, Fatima S, et al. Effect of trace elements on the seminal oxidative status and correlation to sperm motility in infertile Saudi males. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(8):4455–4460. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.04.042
26. Bazid HA, Attia AM, Yousef AM, et al. Evaluating the serum and seminal plasma levels of zinc and cadmium in smokers and their relation to the semen parameters. *Biol Trace Elem Res*. 2022;200(3):1002–1009. doi: 10.1007/s12011-021-02720-3
27. Johnsen O, Eliasson R. Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *Int J Androl*. 1987;10(2):435–440. doi: 10.1111/j.1365-2605.1987.tb00216.x
28. Ших Е.В., Махова А.А., Мандыч Д.В. Влияние лекарственных средств на мужскую фертильность. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 128 с. [Shikh EV, Makhova AA, Mandych DV. Influence of medicinal products on male fertility. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. 128 p. (In Russ).]
29. Луцкий Д.Л., Николаев А.А., Луцкая А.М. Руководство по исследованию эякулята человека: монография. Астрахань: Астраханский государственный медицинский университет, 2022. 215 с. [Lucky DL, Nikolaev AA, Luckaya AM. Guide to the study of human ejaculate: Monograph. Astrakhan: Astrakhan State Medical University; 2022. 215 p. (In Russ).]
30. Elgazar V, Razanov V, Stoltenberg M, et al. Zinc-regulating proteins, ZnT-1, and metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(7):905–912. doi: 10.1369/jhc.4A6482.2005
31. Taravati A, Tohidi F. Association between seminal plasma zinc level and asthenozoospermia: A meta-analysis study. *Andrologia*. 2016;48(6):646–653. doi: 10.1111/and.12494
32. Foresta C, Garolla A, Cosci I, et al. Role of zinc trafficking in male fertility: From germ to sperm. *Hum Reprod*. 2014;29(6): 1134–1145. doi: 10.1093/humrep/deu075
33. Allouche-Fitoussi D, Bakhshi D, Breitbart H. Signaling pathways involved in human sperm hyperactivated motility stimulated by Zn. *Mol Reprod Dev*. 2018;85(6):543–556. doi: 10.1002/mrd.22996
34. Balbach M, Beckert V, Hansen JN, Wachten D. Shedding light on the role of cAMP in mammalian sperm physiology. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;468:111–120. doi: 10.1016/j.mce.2017.11.008
35. Allouche-Fitoussi D, Bakhshi D, Breitbart H. Signaling pathways involved in human sperm hyperactivated motility stimulated by Zn. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(5):502–515. doi: 10.1002/mrd.23128

36. Michailov Y, Ickowicz D, Breitbart H. Zn²⁺-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. *Dev Biol.* 2014;396(2):246–255. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.10.009
37. Roy B, Baghel RP, Mohanty TK, Mondal G. Zinc and male reproduction in domestic animals: A review. *Indian J Anim Nutr.* 2013;30(4):339–350.
38. Николаев А.А., Кузнецова М.Г. Ферроптоз в репродуктивной системе // *Проблемы репродукции.* 2022. Т. 28, № 5. С. 65–71. [Nikolaev AA, Kuznetsova MG. Ferroptosis in the reproductive system. *Russ J Human Reproduction.* 2022; 28(5):65–71. (In Russ).] doi: 10.17116/repro20222805165
39. Луцкий Д.Л., Луцкая А.М., Махмудов Р.М. Исследование эякулята и его компонентов в диагностике воспалительных заболеваний мужской репродуктивной системы. Часть 1 // *Проблемы репродукции.* 2011. Т. 17, № 1. С. 83–87. [Lutsky DL, Makhmudov RM, Lutskaya AM. Parameters of ejaculate in men with inflammatory diseases of reproductive system. Part 1. *Russ J Human Reproduction.* 2011;17(1):83–87. (In Russ).]
40. Полунин А.И., Мирошников В.М., Луцкий Д.Л., Николаев А.А. Хронический неспецифический простатит и уретрит: современные вопросы диагностики и лечения. Астрахань: АГМА, 2001. 194 с. [Polunin AI, Miroshnikov VM, Lutsky DL, Nikolaev AA. Chronic nonspecific prostatitis and urethritis: Modern issues of diagnosis and treatment. Astrakhan: AGMA; 2001. 194 p. (In Russ).]
41. Cui D, Han G, Shang Y, et al. The effect of chronic prostatitis on zinc concentration of prostatic fluid and seminal plasma: A systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2015;31(9):1763–1769. doi: 10.1185/03007995.2015.1072707
42. Луцкий Д.Л., Луцкая А.М., Выборнов С.В., Махмудов Р.М. Биохимическое и морфофункциональное исследование спермы мужчин, инфицированных антибиотико-резистентными штаммами *Ureaplasma urealyticum* // *Клиническая практика.* 2021. Т. 12, № 2. С. 21–29. [Lutsky DL, Lutskaya AM, Vybornov SV, Makhmudov RM. A biochemical and morphofunctional study of the sperm of men infected with antibiotic-resistant strains of ureaplasma. *J Clin Practice.* 2021;12(2):21–29. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract71584
43. Shcherbitskaia AD, Komarova EM, Milyutina YP, et al. Oxidative stress markers and sperm DNA fragmentation in men recovered from COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):10060. doi: 10.3390/ijms231710060
44. Луцкий Д.Л., Махмудов Р.М., Луцкая А.М., и др. Влияние бессимптомного и легкого течения COVID-19 на характеристики спермы // *Клиническая практика.* 2022. Т. 13, № 3. С. 17–24. [Lutsky DL, Makhmudov RM, Lutskaya AM, et al. The impact of asymptomatic and mild COVID-19 on sperm characteristics. *J Clin Practice.* 2022;13(3):17–24. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract109001
45. Nguyen TT, Trieu TS, Tran TO, Luong TL. Evaluation of sperm DNA fragmentation index, Zinc concentration and seminal parameters from infertile men with varicocele. *Andrologia.* 2019; 51(2):e13184. doi: 10.1111/and.13184
46. Khadivi F, Razavi S, Hashemi F. Protective effects of zinc on rat sperm chromatin integrity involvement: DNA methylation, DNA fragmentation, ubiquitination and protamination after bleomycin etoposide and cis-platin treatment. *Theriogenology.* 2020;142:177–183. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.039
47. Kerns K, Zigo M, Drobnis EZ, et al. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nat Commun.* 2018;9(1):2061. doi: 10.1038/s41467-018-04523-y
48. Kerns K, Sharif M, Zigo M, et al. Sperm cohort-specific zinc signature acquisition and capacitation-induced zinc flux regulate sperm-oviduct and sperm-zona pellucida interactions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):2121. doi: 10.3390/ijms21062121
49. Mankad M, Sathawara NG, Doshi H, et al. Seminal plasma zinc concentration and alpha-glucosidase activity with respect to semen quality. *Biol Trace Elem Res.* 2006;110(2):97–106. doi: 10.1385/BTER:110:2:97

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Луцкий Дмитрий Леонидович, д.м.н., доцент;
адрес: Россия, 414056, Астрахань, ул. Татищева, д. 17-45;
e-mail: dmitry.lutsky@bk.ru; eLibrary SPIN: 8826-1441;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1412-3322>

Соавторы:

Луцкая Аделя Мукминовна, к.м.н., ассистент;
e-mail: amm80@bk.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7094-6331>

Махмудов Рамиль Мукминович,
e-mail: ramilmahmudov@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8565-4788>

Палкина Елена Валентиновна,
e-mail: krdlab@rambler.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8316-7989>

Полунин Андрей Иванович, к.м.н.,
e-mail: v.pankratenkova@yandex.ru;
eLibrary SPIN: 3218-6090;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3491-8349>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Dmitry L. Lutsky, MD, PhD, Assistant Professor;
address: 17-45 Tatischeva street, 414056 Astrakhan, Russia;
e-mail: dmitry.lutsky@bk.ru; eLibrary SPIN: 8826-1441;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1412-3322>

Co-authors:

Adela M. Lutskaya, MD, PhD, Assistant;
e-mail: amm80@bk.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7094-6331>

Ramil M. Mahmudov,
e-mail: ramilmahmudov@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8565-4788>

Elena V. Palkina,
e-mail: krdlab@rambler.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8316-7989>

Andrej I. Polunin, MD, PhD;
e-mail: v.pankratenkova@yandex.ru;
eLibrary SPIN: 3218-6090;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3491-8349>

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОСВЯЗИ ИЗМЕНЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК β 1- И β 2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ β 2-АГОНИСТОВ С КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМИ ПАРАМЕТРАМИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Е.В. Смолякова^{1,2}, Ю.С. Скоблов³, Н.А. Скоблова³, А.В. Рвачева^{1,4}, О.В. Бондарец¹,
А.В. Еременко^{1,2}, И.А. Келехсаев¹, И.Е. Чазова⁴, К.А. Зыков^{1,2}

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва, Российская Федерация

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Российская Федерация

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Наличие коморбидной сердечно-сосудистой и бронхообструктивной патологии ухудшает течение и прогноз у пациентов и вызывает сложности в подборе медикаментозной терапии. Основой лечения пациентов с бронхообструктивной патологией являются β 2-агонисты, а их эффективность напрямую зависит от активности β -адренорецепторного звена, ввиду чего, с клинической точки зрения, необходимо подробное изучение функционального состояния β -адренорецепторов. **Цель исследования** — оценить взаимосвязь изменений характеристик β 1- и β 2-адренорецепторов на фоне использования коротко- и длительно действующих β 2-агонистов у больных сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями с клинически значимыми параметрами. **Методы.** В пилотное одноцентровое проспективное исследование включено 45 пациентов, из них 15 с сердечно-сосудистыми и 30 с бронхообструктивными заболеваниями. Длительность исследования составила 2,5 года. Всем пациентам проводился сбор жалоб и данных анамнеза, а также полный комплекс лабораторно-инструментальных исследований. Модифицированным радиолигандным анализом на Т-лимфоцитах периферической крови человека с применением I^{125} цианопиндолола и немеченых высокоселективных лигандов (ICI 118551, CGP 20712) исходно и после выполнения острой пробы с β 2-агонистом короткого и длительного действия определяли активность связывания β 1- и β 2-адренорецепторов. **Результаты.** Проведенный корреляционный анализ между клиническими данными и изменением индекса специфического связывания β 1- и β 2-адренорецепторов подтвердил клиническую релевантность данной величины, выявив тесную связь с клинически значимыми параметрами. При проведении пробы с сальбутамолом и формотеролом у пациентов с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями повышение индекса специфического связывания β 1-адренорецепторов ассоциировано с клиническими, лабораторными и инструментальными параметрами благоприятного течения заболевания, а повышение индекса специфического связывания β 2-адренорецепторов — с отрицательными. У пациентов группы сердечно-сосудистых патологий без бронхообструктивных заболеваний при назначении сальбутамола повышение индекса специфического связывания β 1-адренорецепторов ассоциировалось с неблагоприятными параметрами течения заболевания, в то время как повышение индекса специфического связывания β 2-адренорецепторов не имело четкой ассоциативной связи с данными клинической характеристики пациентов. **Заключение.** Выявлена связь изменений индекса специфического связывания β 1- и β 2-адренорецепторов у больных сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями с клинически значимыми параметрами при проведении острых проб с β 2-агонистами короткого и длительного действия, что в дальнейшем поможет выявлять пациентов с неблагоприятным течением заболевания.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания; кардиореспираторная патология; бронхообструктивные заболевания; β -адренорецепторы; β 2-агонисты.

Для цитирования: Смолякова Е.В., Скоблов Ю.С., Скоблова Н.А., Рвачева А.В., Бондарец О.В., Еременко А.В., Келехсаев И.А., Чазова И.Е., Зыков К.А. Пилотное исследование по изучению взаимосвязи изменения характеристик β 1- и β 2-адренорецепторов на фоне применения β 2-агонистов с клинически значимыми параметрами у пациентов с сердечно-сосудистой патологией. Клиническая практика. 2023;14(1):66–76. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract117542>

Поступила 15.12.2022

Принята 03.03.2023

Опубликована 31.03.2023

A PILOT STUDY TO DETERMINE THE RELATIONSHIP OF CHANGES IN THE CHARACTERISTICS OF β 1- AND β 2-ADRENORECEPTORS AGAINST THE BACKGROUND OF THE USE OF β 2-AGONISTS WITH CLINICALLY SIGNIFICANT PARAMETERS IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

E.V. Smolyakova^{1,2}, Y.S. Skoblov³, N.A. Skoblova³, A.V. Rvacheva^{1,4}, O.V. Bondarets¹, A.V. Eremenko^{1,2}, I.A. Kelekhsaev¹, I.E. Chazova⁴, K.A. Zykov^{1,2}

¹ Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russian Federation

² Pulmonology Scientific Research Institute, Moscow, Russian Federation

³ Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

⁴ National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

Background: Comorbid cardiovascular and bronchoobstructive diseases worsens disease course and prognosis and causes difficulties in therapy. Effectiveness β 2-agonists (cornerstone of bronchoobstructive pathology treatment) depends on β -adrenoreceptors state. Therefore, a detailed study of the functional state of beta-adrenoreceptors is necessary. **Aim:** to evaluate the relationship of changes in the characteristics of β 1- and β 2-adrenoreceptors, against the background of the use of β 2-agonists in patients with cardiovascular and bronchoobstructive diseases with clinically significant parameters. **Methods:** In the pilot single-center prospective study during 2.5 years 45 patients (15 with cardiovascular and 30 with bronchoobstructive diseases) were included. Anamnestic data and complaints were collected and laboratory and instrumental studies were performed. Modified radioligand analysis on blood T-lymphocytes using radiolabeled Cyanopindolol and unlabeled selective ligands (ICI 118551, CGP 20712) before and after salbutamol and formoterol was performed and the binding activity of β 1- and β 2-adrenoreceptors was determined. **Results:** The correlation analysis between clinically significant parameters and changes in the specific binding index of β 1- and β 2-adrenoreceptors confirmed its clinical relevance. In test with beta-agonists in cardiovascular and bronchoobstructive diseases patients, an increase in the specific binding index of β 1-adrenoreceptors is associated with clinical, laboratory and instrumental parameters of a favorable course of the disease, and an increase in the specific binding index of β 2-adrenoreceptors is associated with negative. In the cardiovascular group without bronchoobstructive diseases with salbutamol an increase in the specific binding index of β 1-adrenoreceptors was associated with parameters of unfavorable disease course, while an increase in the specific binding index of β 2-adrenoreceptors did not have a clear associative relationship with clinical characteristics. **Conclusions:** The association of changes in the specific binding index of β 1- and β 2-adrenoreceptors in patients with cardiovascular and bronchoobstructive diseases with clinically significant parameters during acute tests with short- and long-acting β 2-agonists was revealed, which in the future may provide an opportunity to identify patients with an unfavorable course of the disease.

Keywords: cardiovascular diseases; cardiorespiratory pathology; bronchoobstructive diseases; β -adrenergic receptors; β 2-agonists.

For citation: Smolyakova EV, Skoblov YS, Skoblova NA, Rvacheva AV, Bondarets OV, Eremenko AV, Kelekhsaev IA, Chazova IE, Zykov KA. A Pilot Study to Determine the Relationship of Changes in the Characteristics of β 1- and β 2-adrenoreceptors Against the Background of the Use of β 2-agonists with Clinically Significant Parameters in Patients with Cardiovascular Pathology. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):66–76. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract117542>

ОБОСНОВАНИЕ

В клинической практике отмечается значительный рост как сердечно-сосудистых и бронхообструктивных заболеваний, так и их сочетаний¹. Это обусловлено наличием общих факторов риска [1–3] и схожестью механизмов патогенеза [4–6]. Наличие сочетанной кардиореспираторной патологии не только ухудшает течение и прогноз у пациентов, но и вызывает большие сложности в подборе медикаментозной терапии. Так, β_2 -агонисты являются краеугольным камнем в лечении пациентов с бронхообструктивной патологией [7], однако, несмотря на большое количество проведенных исследований, доказавших их эффективность, до настоящего времени существуют противоречивые данные относительно безопасности использования бронходилататоров при сердечно-сосудистых заболеваниях [8].

Назначение β_2 -агонистов у некоторых пациентов может приводить к увеличению частоты сердечных сокращений, снижению концентрации калия, повышению риска развития аритмий и ишемии миокарда при сердечно-сосудистых заболеваниях по сравнению с плацебо [9–11]. Авторами обсуждалась дозозависимость побочных реакций принимаемых препаратов, при этом, возможно, появление нежелательных кардиоваскулярных эффектов было связано со снижением экспрессии и аффинности β_2 -адренорецепторов на фоне применения высоких дозировок короткодействующих β_2 -агонистов [12] и перекрестным влиянием препаратов на схожие по строению и близкие по расположению β_1 -адренорецепторы. Другой возможной причиной являются межрецепторные взаимодействия на уровне вторичных мессенджеров. Можно предположить, что более подробное изучение изменений, происходящих на уровне адренорецепторов, позволит выявлять развитие побочных эффектов на фоне приема назначаемой терапии, а также прогнозировать течение и исход заболевания пациентов с сочетанной кардиореспираторной патологией.

Наиболее точным методом, позволяющим изучать экспрессию и аффинность β -адренорецепторов, является классический радиолигандный анализ. Принимая во внимание сложности проведения данного метода, использование его в клинической практике не представлялось возможным, поэтому

на его основе нами был разработан и запатентован новый модифицированный радиолигандный анализ. Данный метод позволяет регистрировать активность связывания β -адренорецепторов на Т-лимфоцитах периферической крови с использованием I^{125} цианопиндолола. Под активностью связывания β -адренорецепторов понимается способность рецептора связывать регистрируемое количество меченого лиганда в строго определенных условиях (выраженное в имп./мин на 10^6 клеток) [13, 14]. По сути, это представляет собой функциональный интегральный параметр, изменение которого отражает реакцию адренорецепторной системы на воздействие специфических лигандов (препаратов).

В своей работе мы определяли изменения интегрального параметра в острых пробах с β_2 -агонистами. При этом важным являлся вопрос о клинической релевантности этого параметра, для оценки которой требуется проведение широко-масштабного корреляционного анализа изменений активности связывания под влиянием препаратов с клинически значимыми анамнестическими и клинико-лабораторными параметрами пациентов с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями.

Цель исследования — оценить взаимосвязь изменений характеристик β_1 - и β_2 -адренорецепторов на фоне использования коротко- и длительно действующих β_2 -агонистов у больных с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями с клинически значимыми параметрами.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Пилотное одноцентровое проспективное.

Критерии соответствия

Критерии включения: пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями в состоянии компенсации и без острой патологии на момент включения; пациенты с бронхообструктивными заболеваниями вне обострения и после исключения тяжелой степени течения заболевания.

Критерии не включения: противопоказания к назначению селективных бета1-адреноблокаторов и бета2-агонистов; тяжелые сердечно-сосудистые заболевания (острое нарушение мозгового кровообращения и инфаркт миокарда менее 6 месяцев до включения в исследование, нестабильная стенокардия, нарушения ритма сердца высоких градаций); обострение бронхиальной астмы, хрони-

¹ World Health Organization, 2022 (<https://www.who.int>); Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (GOLD), 2020 (https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1.2-03Dec19_WMV.pdf).

ческая обструктивная болезнь легких менее чем за 1 месяц до включения в исследование; онкологические заболевания; беременность или грудное вскармливание; клинические состояния, препятствующие, по мнению врача, участию в исследовании; одновременное участие в другом клиническом исследовании.

Условия проведения

Исследование проведено на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России (отделение гипертонии) и лаборатории иммунопатологии сердечно-сосудистых заболеваний отдела нейрогуморальных и иммунологических исследований совместно с ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН в подразделении изотопного блока.

Продолжительность исследования составила 2,5 года.

Описание медицинского вмешательства

Включенные в исследование пациенты ($n=45$) были разделены на две группы: с сердечно-сосудистой патологией без бронхообструктивных заболеваний ($n=15$; $67\pm 8,54$ года; 9 мужчин и 6 женщин; группа 1) и с коморбидной сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологией ($n=30$; $66,97\pm 9,84$ года; 18 мужчин и 12 женщин; группа 2).

Всем пациентам проводилось обследование, включающее сбор данных: антропометрических, анамнестических (длительность течения и стадия заболевания, наличие сопутствующей патологии и ее длительность, влияние внешних факторов, курение), инструментальных (электрокардиографических, суточного мониторирования артериального давления и электрокардиограммы, эхокардиографических, показателей функции внешнего дыхания) и лабораторных (общий и биохимический анализы крови, определение С-реактивного белка и эозинофильного катионного белка, а также оксида азота в выдыхаемом воздухе).

При проведении инициального бронходилатационного теста использовался сальбутамол (400 мкг), после чего пациентам с бронхообструктивными заболеваниями назначался длительный прием формотерола в дозе 24 мкг/сут.

Забор крови проводился исходно на чистом фоне и после проведения острой пробы с β_2 -агонистом короткого (через 30 мин) и длительно (через 1 час) действия. Т-лимфоциты выде-

ляли с помощью набора Pan T Cell Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotec, Германия). Полученные Т-лимфоциты для повышения достоверности инкубировались в триплетах с немечеными лигандами CGP20712 (β_1 -адренорецепторы), ICI118551 (β_2 -адренорецепторы) и с добавлением раствора [125I]цианопиндолола в каждую пробу. После проведения всех этапов инкубации клеточный осадок просчитывали на γ -счетчике Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer, США) с измерением количества радиоактивного материала в каждой пробе, на основании чего рассчитывались значения активности связывания β -адренорецепторов [13, 14].

Абсолютные значения активности связывания β -адренорецепторов имеют очень большой разброс, в связи с чем понятие «нормальных значений» ввести не представляется возможным. Для расчетов использовался индекс специфического связывания — безразмерная величина, отражающая долю специфического связывания рецепторов от общего специфического связывания (абсолютные значения активности связывания β -адренорецепторов (имп./мин.) / значения общего специфического связывания) [13, 14]. Таким образом, полученные данные оказываются в единой системе координат, что дает возможность сравнивать их между собой. Принимая во внимание, что разброс в параллелях эксперимента не должен превышать 7–10%, то для исключения погрешности в методике использовали «серую зону» в диапазоне $\pm 7\%$, учитывающую величину допустимого разброса. В статистических расчетах достоверным считалось только повышение или снижение индекса специфического связывания $> 7\%$.

Исходы исследования

Конечной точкой нашего исследования было определение изменения индекса специфического связывания на фоне назначения β_2 -агонистов.

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено независимым этическим комитетом клинических исследований ФГБУ НМИЦК Минздрава России по вопросам этики в клинической кардиологии (протокол № 220 от 31 октября 2016 года). Все пациенты подписывали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистический анализ

Исследование носило пилотный характер, в связи с чем мощность выборки не определялась.

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием свободного программного обеспечения PSPP 1.2.0 (Проект GNU, разработчик Ben Pfaff). Для количественных переменных в случае нормального распределения использовали среднее±стандартное отклонение ($M\pm SD$) или медиану и перцентили [25; 75] для непараметрических показателей. Корреляционный анализ проводили с использованием ранговой корреляции Спирмена при непараметрическом распределении или для качественных признаков. Для определения линейных связей между показателями рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

Обследовано 45 пациентов, разделенных на группы: в первую вошли 15 человек с сердечно-сосудистыми заболеваниями без бронхообструктивных патологий ($67\pm 8,54$ года, 9 мужчин и 6 женщин),

во вторую — 30 пациентов с коморбидной сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологией ($66,97\pm 9,84$ года, 18 мужчин и 12 женщин).

Пациенты второй группы отличались достоверно большим стажем курения и более высоким уровнем эозинофилов крови (в %), эозинофильного катионного протеина, С-реактивного белка и более низкими показателями объема форсированного выдоха за 1 секунду (% от должного) (табл. 1).

Основные результаты исследования

В ходе проведенного корреляционного анализа между массивом клинических данных и изменением индекса специфического связывания β_1 - и β_2 -адренорецепторов при проведении острой пробы с β_2 -агонистами (формотерол, сальбутамол) были получены следующие данные (табл. 2 и 3).

В табл. 2 продемонстрированы данные пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями с/без бронхообструктивных патологий, с изменением индекса специфического связывания β -адренорецепторов

Таблица 1 / Table 1

Клиническая характеристика пациентов /
Clinical characteristics of patients

Характеристика	Группа 1 (n=15)	Группа 2 (n=30)
Курение в анамнезе, %	6,7	60,0*
САД/ДАД, мм рт.ст.	133/81±8/4	128/79±10/4,7
ЧСС, уд./мин	67,3±4,3	69,9±9,5
АО, см	3,3±0,3	3,4±0,4
ЛП, см	3,9±0,3	3,9±0,5
ИММЛЖ, г/м ²	93,4±20,3	102,5±31,6
ФВ, %	58,7±2,9	57,9±6,9
ОФВ ₁ , % от должного	104±14,2	76,0±14,8*
Холестерин, ммоль/л	4,6±0,9	4,3±1,2
Триглицериды, ммоль/л	1,7±0,6	1,31±0,6
Глюкоза, ммоль/л	6±1,3	5,6±1,7
Калий, ммоль/л	4,7±0,4	4,7±0,5
Эозинофилы, %	1,6±1,7	3±3,2*
СОЭ, мм/ч	8,6±8,9	9,5±12
СРБ, мг/л	0,8±1,9	1,8±6,2*
ЭКП, мкг/л	10,1±7,3	15,3±13,6*

Примечание. * $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M\pm SD$ и % от общего числа пациентов. САД/ДАД — систолическое/диастолическое артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений; АО — аорта; ЛП — левое предсердие; ИММЛЖ — индекс массы миокарда левого желудочка; ФВ — фракция выброса; ОФВ₁ — объем форсированного выдоха за первую секунду; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; СРБ — С-реактивный белок; ЭКП — эозинофильный катионный протеин.

Note: * $p < 0,05$. Data are presented as $M\pm SD$ and % of the total number of patients. САД/ДАД — systolic/diastolic blood pressure; ЧСС — heart rate; АО — aorta; ЛП — left atrium; ИММЛЖ — left ventricular myocardial mass index; ФВ — ejection fraction; ОФВ₁ — forced expiratory volume in the first second; СОЭ — erythrocyte sedimentation rate; СРБ — C-reactive protein; ЭКП — eosinophilic cationic protein.

Таблица 2 / Table 2

Корреляция между исследуемыми параметрами и изменением индекса специфического связывания β 1-, β 2-адренорецепторов на фоне приема сальбутамола у наблюдаемых пациентов /
Correlation between the studied parameters and changes in the specific binding index of β 1-, β 2-adrenoreceptors in patients

Параметры	ССЗ (n=11)	ССЗ (n=10)	ССЗ и БОЗ (n=19)	ССЗ и БОЗ (n=21)
	Изменение ИСС β 1-АР	Изменение ИСС β 2-АР	Изменение ИСС β 1-АР	Изменение ИСС β 2-АР
	Коэффициент корреляции			
АД, мм рт.ст.	0,69	-	-	-
ЧСС, уд./мин	0,77	0,55	-	0,55
ФЖЕЛ, л	-	0,55	-	-0,47
ОФВ ₁ , л	-	0,69	-	-0,45
САТ (суммарно)	-0,62	0,53	-	-
АСТ (суммарно)	-	-0,78	0,53	-
mMRC (суммарно)	-	-	-	0,53
Длительность ИБС, лет	0,75	-	-	-
ИБС в анамнезе	-	-	-0,64	-
Длительность АГ, лет	0,56	0,52	-0,47	-
Стадия АГ	-	-	-0,47	-
Длительность ХОБЛ, лет	-	-	-0,42	-
Моноциты, %	0,68	-0,47	-0,42	-
Базофилы, тыс./мкл	0,69	-	-	-
Лейкоциты, тыс./мкл	-	-0,50	-	-
Тромбоциты, 10^9 /л	-	-	-	0,49
Лимфоциты, %	-	-	-	0,41
Глюкоза, ммоль/л	-	-	-0,46	-

Примечание. Уровень значимости (p) для всех критериев $<0,05$. Количество пациентов в группах соответствует числу больных с изменением ИСС β 1,2-АР $>7\%$ от исходного уровня. ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания; БОЗ — бронхообструктивные заболевания; ИСС — индекс специфического связывания; β 1-АР/ β 2-АР — β 1-/ β 2-адренорецепторы; АД — артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений; ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких; ОФВ₁ — объем форсированного выдоха за первую секунду; САТ (COPD Assessment Test) — оценочный тест по хронической обструктивной болезни легких; АСТ (Asthma Control Test) — тест по контролю над астмой; mMRC (modified Medical Research Council) — шкала одышки Комитета медицинских исследований; ИБС — ишемическая болезнь сердца; АГ — артериальная гипертензия; ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких.

Note: The level of significance for all criteria was $p < 0.05$. The number of patients in the groups corresponds to the number of patients with a change in the specific binding index of β 1,2-AR $>7\%$ of the baseline level. CC3 — cardiovascular diseases; BO3 — bronchoobstructive diseases; ICC — specific binding index; β 1-AR/ β 2-AR — β 1-/ β 2-adrenoreceptors; АД — blood pressure; ЧСС — heart rate; ФЖЕЛ — forced vital capacity of the lungs; ОФВ₁ — forced expiratory volume in the first second; САТ (COPD Assessment Test) — evaluation test for chronic obstructive pulmonary lung diseases; АСТ (Asthma Control Test) — asthma control test; mMRC (modified Medical Research Council) — shortness of breath scale of the Medical Research Committee; ИБС — coronary heart disease; АГ — arterial hypertension; ХОБЛ — chronic obstructive pulmonary disease.

$>7\%$ от исходного уровня на фоне приема сальбутамола. В группу с сердечно-сосудистыми заболеваниями без бронхообструктивных патологий с изменением индекса специфического связывания β 1-адренорецепторов вошло 11 человек, а с изменением индекса специфического связывания β 2-адренорецепторов — 10. В этой группе повышение индекса специфического связывания β 1-адренорецепторов имело четкую ассоциатив-

ную связь с неблагоприятными клинико-лабораторными и инструментальными параметрами, в то время как по изменениям индекса специфического связывания β 2-адренорецепторов однозначно судить нельзя.

Количество пациентов в группе с коморбидной сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологией с изменением индекса специфического связывания β 1-адренорецепторов составило 19 человек,

Таблица 3 / Table 3

Корреляция между исследуемыми параметрами и изменением индекса специфического связывания β 1-, β 2-адренорецепторов на фоне приема формотерола у наблюдаемых пациентов /
Correlation between the studied parameters and changes in the specific binding index of β 1-, β 2-adrenoreceptors in patients

Параметры	ССЗ и БОЗ (n=20)	ССЗ и БОЗ (n=21)
	Изменение ИСС β 1-АР	Изменение ИСС β 2-АР
	Коэффициент корреляции	
АД, мм рт.ст.	-0,87	0,55
ЧСС, уд./мин	-0,66	0,60
НЖЭС, количество	-0,84	-
ЖЭС, количество	-	0,77
САТ, 3-й вопрос (ощущение сдавленности в грудной клетке)	-0,81	-
САТ, 6-й вопрос (уверенность при выходе из дома)	-0,81	-
АСТ, 1-й вопрос (воздействие астмы на повседневную жизнь)	-	-0,73
mMRC	-0,43	-
ОФВ ₁ , л	-	-0,62
ФЖЕЛ, %	-	-0,67
НРС в анамнезе	-	0,87
Длительность АГ, лет	-0,67	-
Стадия ХОБЛ	-0,62	-
Курение в анамнезе	-0,61	0,79
Лейкоциты, 10^9 /л	-0,75	0,61
Нейтрофилы, тыс./мкл	-0,46	0,71
СОЭ, мм/ч	-0,55	0,52
СРБ, мг/л	-	0,52

Примечание. Уровень значимости (p) для всех критериев $<0,05$. Количество пациентов в группах соответствует числу больных с изменением ИСС β 1,2-АР $>7\%$ от исходного уровня. ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания; БОЗ — бронхообструктивные заболевания; ИСС — индекс специфического связывания; β 1-АР/ β 2-АР — β 1-/ β 2-адренорецепторы; АД — артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений; НЖЭС — наджелудочковая экстрасистолия; ЖЭС — желудочковая экстрасистолия; САТ (COPD Assessment Test) — оценочный тест по хронической обструктивной болезни легких; АСТ (Asthma Control Test) — тест по контролю над астмой; mMRC (modified Medical Research Council) — шкала одышки Комитета медицинских исследований; ОФВ₁ — объем форсированного выдоха за первую секунду; ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких; НРС — нарушение ритма сердца; АГ — артериальная гипертензия; ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; СРБ — С-реактивный белок.

Note: The level of significance for all criteria was $p < 0.05$. The number of patients in the groups corresponds to the number of patients with a change in the specific binding index of β 1,2-AR $>7\%$ of the baseline level. CC3 — cardiovascular diseases; BO3 — bronchial obstructive diseases; ISS — specific binding index; β 1-AR/ β 2-AR — β 1-/ β 2-adrenoreceptors; АД — blood pressure; ЧСС — heart rate; НЖЭС — supraventricular extrasystole; ЖЭС — ventricular extrasystole; CAT (COPD Assessment Test) — evaluation test for chronic obstructive pulmonary disease; ACT (Asthma Control Test) — asthma control test; mMRC (modified Medical Research Council) — the scale of dyspnea of the Medical Research Committee; ОФВ₁ — forced expiratory volume in the first second; ФЖЕЛ — forced vital capacity of the lungs; НРС — cardiac arrhythmia; АГ — arterial hypertension; ХОБЛ — chronic obstructive pulmonary disease; СОЭ — erythrocyte sedimentation rate; СРБ — C-reactive protein.

а с изменением индекса специфического связывания β 2-адренорецепторов — 21. Повышение индекса специфического связывания β 1-адренорецепторов в данной группе было ассоциировано с клиническими, лабораторными и инструментальными параметрами, отражающими благоприятное течение заболевания, в то время как повышение индекса специфического связывания β 2-адренорецепторов

было ассоциировано преимущественно с отрицательными маркерами.

В табл. 3 включены данные пациентов группы сердечно-сосудистых и бронхообструктивных заболеваний с изменением индекса специфического связывания β -адренорецепторов $>7\%$ от исходного уровня при назначении формотерола. Пациентов с изменением индекса специфического

связывания β_1 -адренорецепторов было 20 человек, с изменением индекса специфического связывания β_2 -адренорецепторов — 21. При проведении острой пробы с формотеролом в группе коморбидной патологии повышение индекса специфического связывания β_1 -адренорецепторов было ассоциировано с положительным прогностическим значением клинических и инструментально-лабораторных данных, в то время как повышение индекса специфического связывания β_2 -адренорецепторов — с отрицательным [15].

Нежелательные явления

Нежелательных явлений в ходе проведения исследования не отмечено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание, что любые клинические симптомы являются результатом рецепторных взаимодействий, их оценка потребовала создания нового метода, применимого в ежедневной практике, — модифицированного радиолигандного анализа для характеристики β -адренорецепторов на поверхности клеток.

В ходе проведенного анализа выявлены тесные корреляционные связи между клинически значимыми параметрами и динамикой индекса специфического связывания. Зафиксировано также, что наличие коморбидной сердечно-сосудистой и бронхообструктивной патологии в значительной степени меняет рецепторные взаимодействия, а именно: повышенный индекс специфического связывания

β_1 -адренорецепторов у пациентов с сердечно-сосудистой патологией без бронхообструктивных заболеваний показал себя как маркер неблагоприятного течения заболевания, так как ассоциирован с худшими клиническими проявлениями, в то время как у пациентов с коморбидной сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологией повышение индекса специфического связывания β_1 -адренорецепторов было ассоциировано с маркерами более благоприятного течения (рис. 1, 2). Данный факт подчеркивает важность своевременного выявления бронхообструктивных заболеваний у пациентов с сердечно-сосудистой патологией и еще раз демонстрирует, что β -адренорецепторное звено играет важную роль в патогенезе данных заболеваний, и обсуждать происходящие на рецепторном уровне изменения на фоне назначения β_2 -агонистов необходимо с учетом коморбидной патологии.

Важный вопрос, на который отвечает наша работа, — одинаковое ли действие оказывают короткодействующие и пролонгированные β_2 -агонисты на адренорецепторное звено.

Установлено, что у пациентов с коморбидной сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологией при приеме коротко- и длительно действующих β_2 -агонистов характер изменений однонаправленный: повышение индекса специфического связывания β_1 -адренорецепторов можно рассматривать как положительный маркер, в то время как повышение индекса специфического связывания β_2 -адренорецепторов, т.е. увеличение вклада в общее специфическое связывание, — как отрицательный.

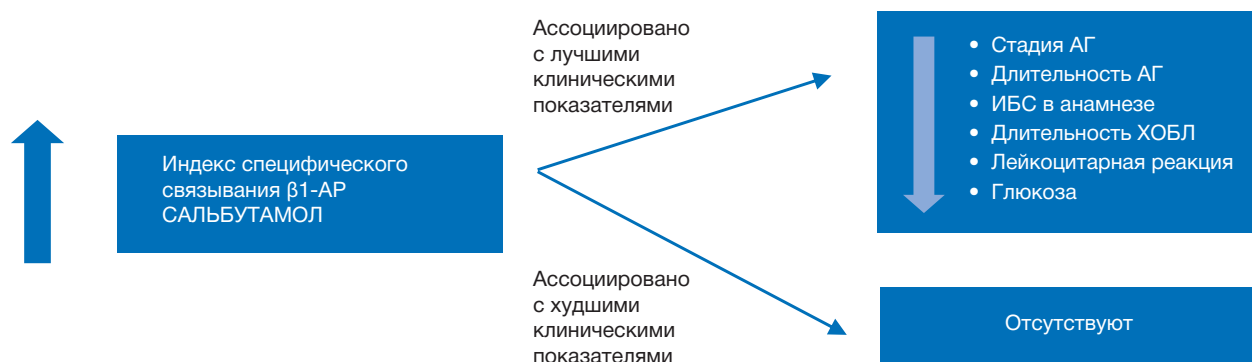


Рис. 1. Взаимосвязь повышения индекса специфического связывания β_1 -адренорецепторов и клинических параметров на фоне приема сальбутамола у пациентов с кардиореспираторной патологией.

Примечание. β_1 -АР — β_1 -адренорецепторы; АГ — артериальная гипертензия; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких.

Fig. 1. Correlation between the increase in specific binding index β_1 -adrenoreceptors and clinical parameters while taking salbutamol in patients with cardiovascular and bronchoobstructive diseases.

Note: β_1 -АР — β_1 -adrenoreceptors; АГ — arterial hypertension; ИБС — coronary heart disease; ХОБЛ — chronic obstructive pulmonary disease.

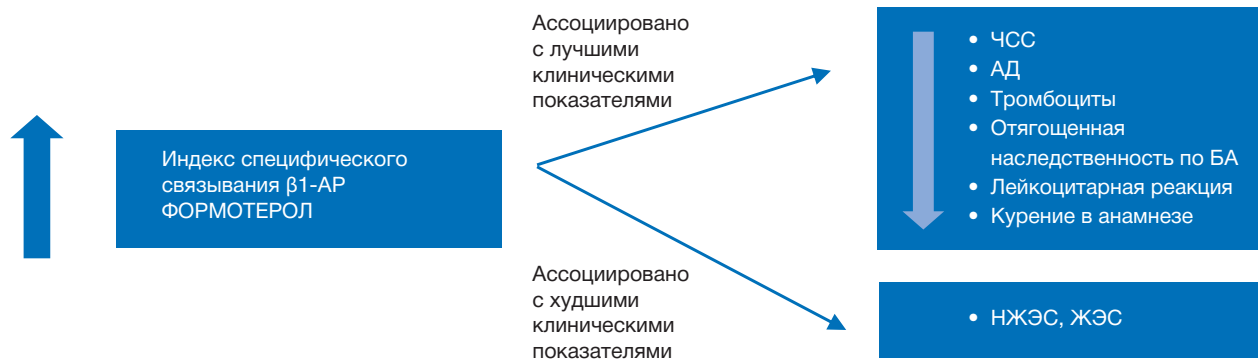


Рис. 2. Взаимосвязь повышения индекса специфического связывания $\beta 1$ -адренорецепторов и клинических параметров на фоне приема формотерола у пациентов с кардиореспираторной патологией.

Примечание. $\beta 1$ -АР — $\beta 1$ -адренорецепторы; ЧСС — частота сердечных сокращений; АД — артериальное давление; БА — бронхиальная астма; НЖЭС — наджелудочковая экстрасистолия; ЖЭС — желудочковая экстрасистолия.

Fig. 2. Correlation between the increase in specific binding index $\beta 1$ -adrenoreceptors and clinical parameters while taking formoterol in patients with cardiovascular and bronchoobstructive diseases.

Note: $\beta 1$ -АР — $\beta 1$ -adrenoreceptors; ЧСС — heart rate; АД — arterial pressure; БА — bronchial asthma; НЖЭС — supraventricular extrasystole; ЖЭС — ventricular extrasystole.

Наши результаты согласуются с предшествующими исследованиями, где было показано, что повышенная $\beta 2$ -стимуляция желудочков сердца носит выраженный аритмогенный характер, потенцируя тяжелые нарушения ритма сердца, включая жизнеугрожающие желудочковые тахикардии [16].

В ходе работы нами отмечено, что при назначении $\beta 2$ -агонистов происходили изменения в динамике индекса специфического связывания на уровне $\beta 1$ -адренорецепторов. Это может быть обусловлено процессами, приводящими к изменению экспрессии и (в меньшей степени) аффинности β -адренорецепторов на поверхности клетки, с одной стороны, и рецепторным взаимодействием на уровне внутриклеточных мессенджеров, с помощью которых реализуются эффекты β -адренергической стимуляции, — с другой [17].

Таким образом, при проведении исследования были доказаны клиническая релевантность определения индекса специфического связывания и возможность его применения в условиях практики у пациентов с коморбидной сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологией.

Ограничения исследования

Ограничением является малая выборка пациентов, что обусловлено пилотным характером исследования. При этом следует отметить, что и при небольшой выборке на этом этапе были получены достоверно значимые результаты, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования в этой области с адекватной статистической мощностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что наличие коморбидной сердечно-сосудистой и бронхообструктивной патологии вносит изменения в характеристики $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов. При оценке клинической значимости изменений характеристик (индекс специфического связывания) $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов при применении $\beta 2$ -агонистов короткого и длительного действия у больных с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями были выявлены тесные корреляционные связи с клинически значимыми параметрами (симптомы; длительность и тяжесть заболевания; результаты лабораторных анализов: лейкоцитарная реакция, С-реактивный белок, уровень эозинофилов; данные электрокардиограммы, показатели суточного мониторирования электрокардиограммы и артериального давления, параметры функции внешнего дыхания).

Результаты демонстрируют возможность применения предложенного параметра (индекса специфического связывания) у пациентов как с сердечно-сосудистой, так и с коморбидной кардиореспираторной патологией, в роли биологического маркера для выявления пациентов с неблагоприятным течением заболевания.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. Е.В. Смолякова — набор пациентов, проведение радиолигандного анализа, обработка результатов, написание текста статьи; Ю.С. Скоблов — разработка методики радиоли-

гандного анализа, мечение цианопиндолола радиоактивным йодом; Н.А. Скоблова — разработка методики радиолигандного анализа, А.В. Рвачева, О.В. Бондарец — обсуждение результатов исследования; А.В. Еременко, И.А. Келехсаев — проведение радиолигандного анализа; И.Е. Чазова — руководство лечением пациентов и обсуждение результатов исследования; К.А. Зыков — руководство лечением пациентов и обсуждение результатов исследования, написание текста статьи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. E.V. Smolyakova — recruitment of patients, conducting radioligand analysis, processing the results, writing the text of the article; Yu.S. Skoblov — development of a method for radioligand analysis, labeling of cyanopindolol with radioactive iodine; N.A. Skoblova — development of radioligand analysis technique; A.V. Rvacheva, O.V. Bondarets — discussion of the results of the study; A.V. Eremenko, I.A. Kelekhsaev — conducting radioligand analysis; I.E. Chazova — management of the treatment of patients and discussion of the results of the study; K.A. Zykov — managing the treatment of patients and discussing the results of the study, writing the text of the article. The authors confirm that their authorship complies with the international ICMJE criteria (all authors made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Funding source. The study had no sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- André S, Conde B, Fragoso E, et al.; GI DPOC-Grupo de Interesse na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. COPD and Cardiovascular Disease. *Pulmonology*. 2019;25(3):168–176. doi: 10.1016/j.pulmoe.2018.09.006
- Ingebrigtsen TS, Marott JL, Vestbo J, et al. Coronary heart disease and heart failure in asthma, COPD and asthma-COPD overlap. *BMJ Open Respir Res*. 2020;7(1):e000470. doi: 10.1136/bmjresp-2019-000470
- Zewari S, Hadi L, van den Elshout F, et al. Obesity in COPD: Comorbidities with practical consequences? *COPD*. 2018; 15(5):464–471. doi: 10.1080/15412555.2018.1509951
- Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(10):582–593. doi: 10.1038/ncpneph0283
- Rabe KF, Hurst JR, Suissa S. Cardiovascular disease and COPD: Dangerous liaisons? *Eur Respir Rev*. 2018;27(149):180057. doi: 10.1183/16000617.0057-2018
- Ritchie AJ, Wedzicha JA. Definition, causes, pathogenesis, and consequences of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Clin Chest Med*. 2020;41(3):421–438. doi: 10.1016/j.ccm.2020.06.007
- Hsu E, Bajaj T. Beta 2 agonists. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- Liu X, Chen Z, Li S, Xu S. Association of chronic obstructive pulmonary disease with arrhythmia risks: a systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:732349. doi: 10.3389/fcvm.2021.732349
- Gershon A, Croxford R, Calzavara A, et al. Cardiovascular safety of inhaled long-acting bronchodilators in individuals with chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA Intern Med*. 2013;173:1175–1185. doi: 10.1001/jamainternmed.2013.1016
- Salpeter SR, Ormiston TM, Salpeter EE. Cardiovascular effects of β -agonists in patients with asthma and COPD: A meta-analysis. *Chest*. 2004;125:2309–2321. doi: 10.1378/chest.125.6.2309
- Wilchesky M, Ernst P, Brophy JM, et al. Bronchodilator use and the risk of arrhythmia in COPD. Part 1: Saskatchewan cohort study. *Chest*. 2012;142:298–304. doi: 10.1378/chest.10-2499
- Au DH, Curtis JR, Every NR, et al. Association between inhaled beta-agonists and the risk of unstable angina and myocardial infarction. *Chest*. 2002;121(3):846–851. doi: 10.1378/chest.121.3.846
- Арапова О.Ю. Характеристика активности β -адренорецепторов при применении специфических агонистов и антагонистов у пациентов с бронхиальной астмой с сочетанной сердечно-сосудистой патологией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2016. 32 с. [Agapova OY. Characteristics of the activity of beta-adrenergic receptors in the use of specific agonists and antagonists in patients with bronchial asthma with combined cardiovascular pathology [dissertation abstract]. Moscow; 2016. 32 p. (In Russ).]
- Agapova OY, Skoblov YS, Tkachev GA, et al. Changes in the receptor activity of β_2 -adrenoreceptors of human T-lymphocytes under the effect of β_2 -agonists. *Mol Biol (Mosk)*. 2016;50(6):999–1006. doi: 10.7868/S0026898416050025
- Смолякова Е.В. Влияние терапии селективным бета1-адреноблокатором и бета2-агонистом на изменение характеристик бета-адренорецепторов у пациентов с кардиореспираторной патологией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2019. 28 с. [Smolyakova EV. Effect of therapy with selective beta1-adrenoblocker and beta 2-agonist on the change in the characteristics of beta-adrenergic receptors in patients with cardiorespiratory pathology [dissertation abstract]. Moscow; 2019. 28 p. (In Russ).]
- Lang D, Holzem K, Kang C, et al. Arrhythmogenic remodeling of β_2 versus β_1 adrenergic signaling in the human failing heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8(2):409–419. doi: 10.1161/CIRCEP.114.002065
- Matera MG, Page C, Rinaldi B. β_2 -Adrenoceptor signalling bias in asthma and COPD and the potential impact on the comorbidities associated with these diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;40:142–146. doi: 10.1016/j.coph.2018.04.012

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Смолякова Екатерина Владимировна, к.м.н.;
адрес: Россия, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20/1;
e-mail: smolyakovak@mail.ru; eLibrary SPIN: 1751-0230;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1904-5319>

Соавторы:

Скоблов Юрий Самойлович, д.м.н.;
e-mail: uskoblov@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3659-3939>

Скоблова Наталия Александровна;
e-mail: uskoblov@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2413-1051>

Рвачева Анна Валерьевна, к.м.н.;
e-mail: arvatcheva@mail.ru; eLibrary SPIN: 5267-9598;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9277-2291>

Бондарец Ольга Валентиновна, к.м.н.;
e-mail: o.v.bondarets@gmail.com;
eLibrary SPIN: 7785-0655;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1555-1449>

Еременко Анна Владимировна;
e-mail: a_nn87@list.ru; eLibrary SPIN: 2813-1638;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9333-0022>

Келехсаев Иван Андреевич;
e-mail: kelexsaev1996@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6439-4745>

Чазова Ирина Евгеньевна, д.м.н.,
профессор, академик РАН;
e-mail: chazova@hotmail.com; eLibrary SPIN: 6175-6138;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9822-4357>

Зыков Кирилл Алексеевич, д.м.н.,
профессор, чл.-корр. РАН;
e-mail: kirillaz@inbox.ru; eLibrary SPIN: 6269-7990;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3385-2632>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Ekaterina V. Smolyakova, MD, PhD;
address: 20/1 Delegatskaya street, 127473 Moscow, Russia;
e-mail: smolyakovak@mail.ru; eLibrary SPIN: 1751-0230;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1904-5319>

Co-authors:

Yuri S. Skoblov, MD, PhD;
e-mail: uskoblov@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3659-3939>

Natalia A. Skoblova;
e-mail: uskoblov@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2413-1051>

Anna V. Rvacheva, MD, PhD;
e-mail: arvatcheva@mail.ru; eLibrary SPIN: 5267-9598;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9277-2291>

Olga V. Bondarets, MD, PhD;
e-mail: o.v.bondarets@gmail.com;
eLibrary SPIN: 7785-0655;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1555-1449>

Anna V. Eremenko;
e-mail: a_nn87@list.ru; eLibrary SPIN: 2813-1638;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9333-0022>

Ivan A. Kelekhsaev;
e-mail: kelexsaev1996@mail.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6439-4745>

Irina E. Chazova, MD, PhD, Professor, Academician
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: chazova@hotmail.com; eLibrary SPIN: 6175-6138;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9822-4357>

Kirill A. Zykov, MD, PhD, Professor, Corresponding Member
of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: kirillaz@inbox.ru; eLibrary SPIN: 6269-7990;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3385-2632>

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПЛОСКОВАЛЬГУСНОЙ ДЕФОРМАЦИИ СТОП У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

С.Е. Транковский^{1, 2}, В.Г. Процко^{1, 3}, А.А. Ахпашев²

¹ Федеральный научно-клинический центр детей и подростков, Москва, Российская Федерация

² Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий», Москва, Российская Федерация

³ Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Плосквальгусная деформация стоп является частой причиной обращения к ортопеду. В детской ортопедии используются технологии, не нарушающие физиологического роста пациента, в частности подтаранный артрозрез. **Цель исследования** — провести анализ результатов хирургического лечения деформации стоп у детей и оценить эффективность подтаранного артрозреза в коррекции плосквальгусной деформации. **Методы.** В период с 2013 по 2022 г. по поводу плосквальгусной деформации стопы прооперировано 482 пациента. Операция по методике подтаранного артрозреза в различных комбинациях выполнена в 405 случаях. **Результаты.** Наблюдая пациентов в течение 9 лет после хирургического лечения, в большинстве случаев отмечался стойкий положительный эффект, а именно: отсутствие жалоб на болевой синдром, отсутствие клинико-рентгенологической картины плосквальгусной деформации стопы; активный образ жизни, включая занятия спортом. В среднем через 17,7 месяцев в 66 случаях (16,1%) потребовалась замена подтаранного импланта в связи с физиологическим ростом пациентов. В 125 случаях (31,2%) имплант был удален в среднем через 31,2 мес после установки. Неудовлетворительные результаты отмечены в 14 (3,4%) случаях. **Заключение.** Методика подтаранного артрозреза может быть охарактеризована как эффективная, малотравматичная, не препятствующая физиологическому росту скелета стопы, не ограничивающая физиологические нагрузки после хирургического лечения. Особенностью подтаранного артрозреза у пациента с физиологическим ростом скелета стопы является высокая вероятность замены подтаранного импланта.

Ключевые слова: плоско-вальгусная деформация стоп; артрозрез; хирургическая коррекция; дети; подтаранный имплант.

Для цитирования: Транковский С.Е., Процко В.Г., Ахпашев А.А. Анализ результатов хирургического лечения плосквальгусной деформации стоп у детей и подростков. Клиническая практика. 2023;14(1):77–83. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract110806>

Поступила 06.09.2022

Принята 03.10.2022

Опубликована 07.02.2023

ОБОСНОВАНИЕ

В настоящее время сохраняет свою актуальность лечение и наблюдение пациентов с плосквальгусной деформацией стоп (ПВДС). ПВДС является частой причиной обращения к ортопеду: по данным литературы, частота встречаемости плоскостопия у детей составляет от 6,9 до 81,2% случаев [1]. Под термином «плосквальгусная деформация стопы» (в англоязычной литературе: flat foot, plano-valgus foot) мы понимаем многокомпонентную деформацию, характеризующуюся пронацией пяточной кости, вертикальным положением таранной кости, снижением высоты продольных сводов стопы, отведением среднего и переднего отдела стопы, супинацией переднего отдела стопы по отно-

шению к заднему. Некоторые авторы к описанию ПВДС относят перерастяжение сухожилия задней большеберцовой мышцы и ее функциональную недостаточность, укорочение ахиллова сухожилия [2, 3]. ПВДС может быть как самостоятельным диагнозом, так и сопровождать ряд заболеваний и симптомов, таких как детский церебральный паралич, синдром гипермобильности суставов, вялые парезы, генетические заболевания и пороки развития. Учитывая детский возраст, необходимо отметить анатомо-физиологические особенности растущего организма и анатомо-функциональную характеристику стоп [1, 3]. Говоря о ПВДС, надо учитывать форму плоскостопия — мобильную или ригидную форму деформации стопы [4–6].

ANALYSIS OF THE RESULTS OF THE SURGICAL TREATMENT OF PLANO-VALGUS FOOT DEFORMITY IN CHILDREN AND ADOLESCENT

S.E. Trankovskiy^{1, 2}, V.G. Protsko^{1, 3}, A.A. Akhpashev²

¹ Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

² Academy of Postgraduate Education Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Background: Plano-valgus deformity of the feet is a common reason for contacting an orthopedist. Pediatric orthopedics uses technologies, in particular, subtalar arthroeresis, that do not violate the physiological growth of the patient. **Aim:** to choose the optimal methods for the correction of foot deformity in children and adolescents. **Analysis of the results of the surgical treatment.** **Methods:** In the period from 2013 to 2022, 482 patients were operated on for flat-foot deformity. Subtalar arthroeresis surgery was performed in 405 cases in various combinations. **Results:** The 9-year-long observation of the patients after the surgical treatment showed that in most cases there was a persistent positive effect, namely: no complaints of pain syndrome, no clinical and radiological pictures of a plano-valgus foot, patients led an active lifestyle, including sports. On average, after 17.7 months, 66 cases (16.1%) required replacement of the subtalar implant due to the physiological growth of patients. In 125 cases (31.2%) the implant was removed on average 31.2 months after placement. Unsatisfactory results were noted in 14 patients (3.4%). **Conclusions:** The technique of subtalar arthroeresis, as a low-traumatic one, does not interfere with the physiological growth of the foot skeleton, does not limit physiological loads after the surgical treatment, and is actively used in the childhood and adolescence. The peculiarity of the subtalar arthroeresis in a patient with the physiological growth of the foot skeleton is a high probability of the subtalar implant replacement. **Keywords:** plano-valgus foot deformation; subtalar arthroereisis; surgical correction; children; a subtalar implant. **For citation:** Trankovskiy SE, Protsko VG, Akhpashev AA. Analysis of the Results of the Surgical Treatment of Plano-Valgus Foot Deformity in Children and Adolescent. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1): 77–83. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract110806>

Submitted 06.09.2022

Revised 03.10.2022

Published 07.02.2023

Цель исследования — провести анализ результатов хирургического лечения деформации стоп у детей и оценить эффективность подтаранного артроэреза в коррекции плоскостопной деформации.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Открытое, когортное, проспективное.

Критерии соответствия

Критерии отбора на хирургическое лечение: жалобы на деформацию стоп; сложность в ношении обуви (потертости–мозоли по медиальной поверхности в проекции ладьевидно-таранного сочленения); жалобы на боли и тяжесть в ногах, усиливающиеся после длительной ходьбы и физических нагрузок. В анамнезе родители указывали на длительность

жалоб с дошкольного возраста, неоднократные курсы массажа, ношение коррекционной обуви и стелек без значимого клинического результата.

Условия проведения

Исследование проводилось в ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детей и подростков» Федерального медико-биологического агентства России в отделении травматологии и ортопедии в период с 2013 г. по июнь 2022 г. Прооперировано 482 пациента с диагнозом ПВДС, из них мальчиков 303 (62,8%), девочек — 179 (37,1%). Возраст оперируемых — от 4 до 17 (средний 12,35) лет. Подтаранный артроэрез выполнен в 405 случаях.

Описание медицинского вмешательства

При клиническом осмотре обращали внимание на общее строение костно-мышечного скелета,

наличие синдрома гипермобильности суставов, наличие сопутствующей патологии, в том числе неврологической; проводили оценку походки. В положении стоя оценивали нарушение внутреннего продольного свода стопы, в том числе линии Фейса, вальгус пяток, симптом подглядывающих пальцев (в англоязычной литературе «too many toes»), динамику подометрического индекса, «рычажного теста I пальца» (тест «лебедки», он же тест Jack), пробы Шриттера (тест «вставания на цыпочки») и пробы стояния на наружном отделе стопы. Проводили оценку формы и архитектоники стопы в положении без нагрузки (сидя, лежа), а также амплитуды движений в голеностопном суставе и пальцев стоп. Осмотр выполняли при помощи плантографа с оценкой плантограмм. При наличии показаний к хирургическому лечению всем пациентам выполняли рентгенограммы стоп в прямой и боковой проекциях в нагрузке. При подозрении на тарзальную коалицию дополнительно выполняли компьютерную томографию.

В отделении травматологии и ортопедии ФГБУ «ФНКЦ детей и подростков» ФМБА России при активном участии д.м.н. В.Г. Процко внедрена и освоена методика хирургической коррекции ПВДС — подтаранный артоэрез (ПТАЭ). Методика хирургического лечения ПТАЭ заключается во введении в межкостный канал (*sinus tarsi*) импланта, который блокирует патологическую подвижность — ротацию таранной кости относительно пяточной, препятствуя пронации пяточной кости. Оставаясь в полости *sinus tarsi*, имплант позволяет расти структурам стопы в (физиологически) правильном соотношении между таранной и пяточной костью. «Пионерами» методики являются E.F. Chambers (1946 г.) и D.S. Grice (1952 г.). ПТАЭ, как и большинство других хирургических методик, в детскую практику «перекочевала» из взрослой ортопедии. Так, S.D. Smith в 1983 г. установил 53 импланта 27 детям.

К преимуществам методики ПТАЭ при хирургической коррекции ПВДС следует отнести:

- а) малую травматичность, т.е. имплант ставится из разреза 10–15 мм;
- б) не страдают суставные поверхности костей стопы;
- в) нет препятствия физиологическому росту скелета стопы;
- г) нет ограничений функциональных нагрузок, что особенно важно в детском и подростковом возрасте.

Методика ПТАЭ несложна в освоении. Для проведения хирургической коррекции по методике ПТАЭ использовали импланты ФУТДОКТОР (Footdoctor, Россия), с 2021 г. также стали использовать импланты компании Arthrex (США). За период с 2013 г. по июнь 2022 г. методика ПТАЭ использована в 405 хирургических вмешательствах, в том числе для коррекции ПВДС использовали другие методики: остеотомию пяточной кости по Эвансу (в 9 случаях), операции Смита–Грайса (в 18 случаях), слайд-остеотомию пяточной кости (в 9 случаях), трехсуставной артродез стопы (в 6 случаях), двухсуставной пяточно-кубовидный и таранно-пяточный артродез стопы (в 19 случаях), другие операции (в 206 случаях).

Изолированно ПТАЭ выполнен 34/405 (8,3%) пациентам, что объясняется недостаточной коррекцией высоты медиального продольного свода при изолированном ПТАЭ, что мы связываем с функциональной недостаточностью сухожилия задней большеберцовой мышцы. Изолированно ПТАЭ проводили также у пациентов с элементом «подгибания» стоп с характерным прерыванием отпечатка стоп на плантограмме («сводчатый» тип плантограммы), который в немецкой литературе носит название Knickfuss). В связи с этим у 234/405 пациентов ПТАЭ был дополнен тенodesом задней большеберцовой мышцы. Под тенодесом задней большеберцовой мышцы мы понимаем сборение (гофрирование–натяжение) и перемещение места прикрепления сухожилия задней большеберцовой мышцы с наружной поверхности ладьевидной кости на вентральную поверхность ладьевидной кости. Нередко при выделении места прикрепления сухожилия задней большеберцовой мышцы удаляли добавочную большеберцовую кость (*os tibialis externum*). В 137 случаях ПТАЭ и тенodes задней большеберцовой мышцы были дополнены переносом (тенодез) сухожилия длинного сгибателя пальцев на ладьевидную кость. Медиализирующая слайд-остеотомия пяточной кости в сочетании с ПТАЭ была выполнена в 9 случаях. Основания для выбора объема ПТАЭ подробно изложены в диссертации А.В. Олейник [1].

Помимо основных указанных комбинаций, ПТАЭ выполнялся в сочетании с такими видами операций, как удлинение ахиллова сухожилия, операция Страйера, устранение тарзальной коалиции, удаление *os tibialis externum*, тенodes сухожилия длинной малоберцовой мышцы, тенodes передней большеберцовой мышцы и другими операциями.

Функциональный результат хирургического лечения по методике ПТАЭ позволяет прооперированным пациентам активно заниматься спортом, в частности футболом. К особенностям применения методики ПТАЭ у пациентов детского и подросткового возраста мы относим также высокую вероятность замены подтаранного импланта в процессе роста пациента. Учитывая особенности растущего организма пациентов детского и подросткового возраста, рост костного скелета, в частности анатомического образования *sinus tarsi*, у части пациентов может возникнуть «потеря коррекции», что чаще проявляется изолированной вальгизацией пятки с одной или двух сторон без рецидива снижения внутреннего продольного свода. Рецидив вальгуса пятки устраняли заменой подтаранного импланта на подтаранный имплант большего размера (табл. 1).

Этическая экспертиза

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «ФНКЦ детей и подростков» ФМБА России, выписка от 17 мая 2021 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациентов осматривают при снятии иммобилизации в отделении реабилитации, проводят рентгеноконтроль положения имплантов. Контрольные осмотры — в течение 6 мес после операции, затем 1 раз в год. Оценивая результаты проведенного лечения, мы учитываем те же показатели, что и при отборе на хирургическое лечение, из них наиболее важными считаем отсутствие жалоб на болевой синдром и отсутствие жалоб на деформацию стоп.

В рентгенограммах стоп в прямой и боковой проекциях в нагрузке оцениваем взаимоотношение костных структур и положение подтаранного

импланта. К хорошим результатам мы относим отсутствие жалоб пациента на болевой синдром; коррекцию всех элементов ПВДС, как клинических, так и рентгенологических; отсутствие функциональных ограничений (пациенты ведут обычный образ жизни без ограничений по физической активности).

Наблюдение в катамнезе в пределах до 9 лет демонстрирует стойкий положительный эффект: отсутствие жалоб, отсутствие клинико-рентгенологической картины ПВДС.

При сохранении коррекции деформации у пациентов старше 14 лет подтаранные импланты удаляются.

К неудовлетворительным результатам, соответственно, относим жалобы на боль в прооперированных стопах, сохраняющуюся деформацию стоп, а также отрицательное отношение к проведенной операции со стороны пациента и его родителей [1].

Нежелательные явления

В нашей практике отмечались следующие неудовлетворительные результаты.

1. Синдромом таранного синуса с болевым синдромом (у 4 пациентов).

В этих случаях пациентам проводился режим разгрузки (ограничение ходьбы, физических нагрузок) в сочетании с физиотерапевтическим лечением, лечебной физкультурой, массажем. В случае сохранения жалоб имплант удалялся без замены; выполненного при ПТАЭ тенодеза было достаточно для удержания стопы в правильном положении. После удаления подтаранного импланта жалоб на болевой синдром не было.

2. Миграция подтаранного импланта.

Такое осложнение в детском возрасте имеет свою особенность. Как описывалось выше,

Таблица 1/Table 1

**Длительность пользования подтаранным имплантом до его замены или удаления /
The duration of a subtalar implant's performance before the need for its replacement or removal**

Показатели		Замена имплантов (66 операций)	Удаление имплантов (125 операций)
Возраст, лет	max	15	17
	min	8	8
Средний возраст, лет		12,27	14,75
Продолжительность эксплуатации, мес	max	52	72
	min	1	5
Средняя продолжительность эксплуатации, мес		17,7	31,2

у ряда пациентов (у 66/405) отмечалась потеря коррекции ПВДС в средний срок 17,7 мес после операции, что было связано с ростом пациента, увеличением анатомических размеров *sinus tarsi*, что определило свободное положение импланта в синусе, а в отдельных случаях смещение импланта в проекции синуса подкожно. Проводилась замена подтаранного импланта на больший размер.

3. Глубокая установка импланта за анатомические пределы *sinus tarsi* (к медиальной лодыжке) у 2 пациентов.

В этих случаях потребовались удаление порочно установленного импланта и корректная установка. Данная ошибка характерна для этапа освоения методики, типично также, что в обоих случаях использовались импланты меньшим размеров, чем *sinus tarsi*. Во избежание глубокой установки подтаранного импланта рекомендуется использовать имплант, подобранный с учетом измерительных разверток (поставляются в наборе), а также контролировать положение импланта с помощью электронно-оптического преобразователя.

4. Отсутствие ожидаемого эффекта от выполненной операции (5 пациентов).

В срок от 6 мес до 1 года отмечался рецидив деформации. Пациенты были повторно прооперированы, импланты удалены, выполнены различные остеотомии пяточных костей, в том числе по Эвансу. При этом 3 случая характеризовались выраженным синдромом гипермобильности суставов в сочетании с малой мотивацией к активному образу жизни, активным движениям; 2 пациента имели значительный лишний вес.

5. Авторы остались неудовлетворены результатами ПТАЭ у 3 пациентов с сопутствующими диагнозами (детский церебральный паралич, спастическая диплегия, гемипаретическая форма детского церебрального паралича). В двигательном статусе пациенты передвигались самостоятельно: согласно системе классификации больших моторных функций (Gross Motor Function Classification System, GMFCS) — GMFCS II (ходьба с ограничениями). Пациенты длительно восстанавливались после ПТАЭ, при этом достигнуть полной коррекции ПВДС не удалось. В последующем всем пациентам выполнены удаление подтаранных имплантов, артродез суставов стопы.

Таким образом, осложнений и неудовлетворительных результатов — 14/405 (3,4%).

ОБСУЖДЕНИЕ

По литературным данным, осложнения ПТАЭ отмечены в 4,8–18,6%. Имеются данные, что частота незапланированного удаления имплантов составила 7,1–19,3% [1, 7]. Из литературных источников, наиболее распространенными осложнениями являются боль в проекции стояния импланта или среднего отдела стопы, что связывают с местным раздражением в области локации протеза; разрушение подтаранного импланта в таранном синусе; гиперкоррекция деформации (варусная установка стопы, перелом таранной кости); миграция подтаранного импланта [1, 6, 7]. В нашем исследовании разрушений подтаранного импланта в таранном синусе (с учетом моделей используемых конструкций) не было. Гиперкоррекции деформации после операции в нашей практике не отмечалось, что, вероятно, является спецификой детского возраста (т.е. если и была гиперкоррекция, то по мере роста она редуцировалась).

Полученные результаты позволяют нам рекомендовать методику ПТАЭ ПВДС у пациентов детского и подросткового возраста как малоинвазивную, не нарушающую анатомического взаимоотношения суставных поверхностей, и функциональную, позволяющую в послеоперационном периоде вести активный образ жизни. При отборе пациентов на хирургическое лечение по методике ПТАЭ мы информируем пациента и родителей, что при активном росте может понадобится замена подтаранного импланта на больший размер.

Анализируя причины, влияющие на возможную замену подтаранного импланта, следует выделить возраст проведения хирургического вмешательства и последующие за ним «скачки роста» (ростовой спурт); антропометрические показатели родителей ребенка, такие как высокорослость и большой размер стопы (следует ожидать, что ребенок также будет высокорослым); особенность психотипа ребенка, в том числе желание вести подвижный образ жизни. Каждый из перечисленных факторов в отдельности и суммирование этих факторов потенциально могут привести к необходимости замены подтаранного импланта на больший размер.

Сложность патологии ПВДС такова, что методика ПТАЭ не исключает использования других методов хирургической коррекции стоп, связанных с остеотомией костей стопы или же артроде-

за сустава/суставов стопы, а также комбинаций сухожильно-мышечных пластик. Негативный опыт использования методики ПТАЭ у пациентов с поражением центральной нервной системы по спастическому типу не позволяет нам рекомендовать данную методику при спастических формах детского церебрального паралича. Такими же наблюдениями делятся и другие авторы [6]. Анализ проведенных нами операций при ПВДС не позволяет согласиться с утверждением, что укорочение ахиллова сухожилия является структурной характеристикой ПВДС [2, 3]. При выполнении нами хирургической коррекции ПВДС операции на ахилловом сухожилии или апоневрозе икроножной мышцы были выполнены в 25/482 (5,18%) случаях.

На основании наших собственных результатов и данных литературы можно заключить, что методика ПТАЭ не является универсальной: в частности, авторы не удовлетворены использованием данной методики при спастической форме детского церебрального паралича. Для коррекции ПВДС у детей со спастическими формами детского церебрального паралича мы используем и предлагаем использовать иные методики: внесуставной артрорез по Смитсу–Грайсу, остеотомию пяточной кости по Эвансу, двойной и тройной артрорез стопы. С осторожностью рекомендуем использовать методику ПТАЭ и у пациентов с выраженным синдромом гипермобильности суставов в сочетании с малой мотивацией к активному образу жизни, активным движениям, страдающих ожирением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика ПТАЭ в детском и подростковом возрасте может быть охарактеризована как эффективная, малотравматичная, органосохраняющая (нет препятствия физиологическому росту скелета стопы), не ограничивающая физиологические нагрузки после хирургического лечения, несложная в освоении и исполнении.

При применении методики ПТАЭ у растущего пациента может потребоваться замена подтаранного импланта, что является признаком физиологического роста скелета стопы, а не осложнением методики ПТАЭ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. С.Е. Транковский, В.Г. Процко — лечение пациентов, обработка и обсуждение результатов исследования, написание текста

статьи; А.А. Ахпашев — поисково-аналитическая работа, обсуждение результатов исследования, написание текста статьи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. S.E. Trankovsky, V.G. Protsko — treatment of patients, processing and discussion of the results of the study, writing the manuscript; A.A. Akhpashev — search and analytical work, discussion of the results of the study, writing the manuscript. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Funding source. The study had no sponsorship.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Олейник А.В. Подтаранный артрорез в лечении плоскостопия деформации стоп у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2019. 28 с. [Oleinik AV. Sub-rammed arthroeresis in the treatment of flat-foot deformity in children [dissertation abstract]. Moscow; 2019. 28 p. (In Russ).]
2. Mosca VS. Calcaneal lengthening for valgus deformity of the hind foot Results in children who had severe, symptomatic flatfoot and skewfoot. *J Bone Joint Surg.* 1995;77(4):500–512. doi: 10.2106/00004623-199504000-00002
3. Лашковский В.В., Мармыш А.Г. Детская и подростковая педиатрия: современные подходы к диагностике и лечению заболеваний стоп // *Новости хирургии.* 2011. № 2. С. 94–100. [Lashkovsky VV, Marmysh AG. Pediatric and adolescent pediatrics: Modern approaches to the diagnosis and treatment of foot diseases. *News of Surgery.* 2011;(2):94–100. (In Russ).]
4. Димитриева А.Ю. Мобильное плоскостопие у детей младшего школьного возраста: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2020. 34 с. [Dimitrieva AYU. Mobile flat feet in children of primary school age [dissertation abstract]. Moscow; 2020. 34 p. (In Russ).]
5. Кенис В.М., Лапкин Ю.А., Хусайнов Р.Х., Сапоговский А.В. Мобильное плоскостопие у детей (обзор литературы) // *Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста.* 2014. № 2. С. 44–54. [Kenis VM, Lapkin YuA, Khushainov RH, Sapogovsky AV. Mobile flat feet in children

- (literature review). *Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery*. 2014;(2):44–54. (In Russ).]
6. Шабалдин Н.А., Титов Ф.В., Гибадуллин Д.Г., Маликова Л.Г. Анализ результатов хирургического лечения ригидной плосковальгусной деформации стоп у детей методом подтаранного артроза // *Политравма*. 2019. № 1. С. 47–52. [Shabaldin NA, Titov FV, Gibadullin DG, Malikova LG. Analysis of the results of surgical treatment of rigid planovalgus deformity of the feet in children by the method of rammed arthroeresis. *Polytrauma*. 2019;(1):47–52. (In Russ).]
 7. Процко В.Г., Тамоев С.К., Загородный Н.В., и др. Анализ осложнений после подтаранного артроза у пациентов с плосковальгусной деформацией стоп // *Травматология и ортопедия России*. 2011. № 4. С. 37–43. [Protsko VG, Tamoev SK, Zagorodny NV, et al. Analysis of complications after a rammed arthroeresis in patients with flat-foot deformity. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2011;(4):37–43. (In Russ).]

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Транковский Сергей Евгеньевич;

адрес: 115409, Москва, ул. Москворечье, д. 20;

e-mail: doctseort@yandex.ru; eLibrary SPIN: 5017-4839;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7118-8528>

Соавторы:

Процко Виктор Геннадьевич, д.м.н.;

e-mail: 89035586679@mail.ru; eLibrary SPIN: 4628-7919

Ахпасhev Александр Анатольевич, к.м.н.;

e-mail: akhpashev@gmail.com; eLibrary SPIN: 9965-1828;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2938-5173>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Sergey E. Trankovskiy;

address: 20 Moskvorechye street, 115409 Moscow, Russia;

e-mail: doctseort@yandex.ru; eLibrary SPIN: 5017-4839;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7118-8528>

Co-authors:

Victor G. Protsko, MD, PhD;

e-mail: 89035586679@mail.ru; eLibrary SPIN: 4628-7919

Alexander A. Akhpashev, MD, PhD;

e-mail: akhpashev@gmail.com; eLibrary SPIN: 9965-1828;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2938-5173>

ВНУТРИПРОТОКОВАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И ЕЕ КОМБИНАЦИЯ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ХИМИОИНФУЗИЕЙ В ЛЕЧЕНИИ НЕОПЕРАБЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЮ КЛАЦКИНА

А.В. Козлов, А.А. Поликарпов, П.Г. Таразов, А.В. Моисеенко, М.В. Юткин, С.В. Шаповал, А.С. Турлак, Д.А. Гранов

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Обоснование. Паллиативное, или симптоматическое, лечение показано 70–80% больных опухолью Клацкина из-за ее распространенности и тяжести состояния пациентов. Рентгеноэндоваскулярные технологии — химиоинфузия в печеночную артерию, химиоэмболизация, радиоэмболизация — успешно применяются в лечении гепатоцеллюлярного рака и метастазов печени. **Цель исследования** — оценить ближайшие и отдаленные результаты фотодинамической терапии (ФДТ) и ее комбинации с артериальной химиоинфузией у неоперабельных больных опухолью Клацкина. **Методы.** За период 2010–2021 гг. проведено 83 сеанса (от 1 до 8, в среднем 2,4) паллиативной ФДТ у 82 пациентов в виде самостоятельного метода лечения и в комбинации с регионарной химиотерапией. Во всех случаях предварительно было выполнено наружно-внутреннее чрескожное чреспеченочное холангиодренирование без предшествующей специфической терапии. В группы исследования включены 48 пациентов, стратифицированных по состоянию ECOG 2–3 и числу проведенных сеансов ФДТ (не больше двух). Основная группа комбинированной терапии состояла из 24 больных (13 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 38 до 85 (средний 63) лет, ECOG 2–3 (среднее 2,4), у которых ФДТ сочетали с химиоинфузией в общую печеночную артерию по схеме GemCis (Gemcitabine+Cisplatin). В среднем выполнили 1,4 сеанса ФДТ, лечение начинали на 89-е (27–225) сутки от установки чрескожного чреспеченочного холангиодренажа. Химиоинфузию проводили на 2–3-и сутки после фотовоздействия. В контрольной группе 24 больным (13 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 51 до 83 (средний 66) лет, ECOG 2–3 (среднее 2,6) на этапе освоения методики выполняли только ФДТ. В среднем выполнили 1,4 сеанса ФДТ, которые начинали на 106-е (32–405) сутки от холангиодренирования. **Результаты.** Нежелательных явлений, связанных с выполнением ФДТ, не было. Проявления токсичности регионарной химиотерапии наблюдались у 13 (54,2%) из 24 пациентов и включали гематологические I–II степени у 4 больных, желудочно-кишечные I–II степени у 6, оба осложнения возникли у 3 пациентов и были купированы с помощью медикаментозной терапии. Осложнения чрескожного чреспеченочного холангиодренирования у 3 (12,5%) пациентов контрольной группы (гемобилия у 2 и сепсис у 1) оценены как III степени тяжести по классификации CIRSE (2017) и купированы консервативными методами. Средняя продолжительность жизни от момента чрескожного чреспеченочного холангиодренирования и медиана в основной группе были выше и составили $327,9 \pm 39,8$ сут (10,9 мес) и 275 сут против $246,9 \pm 31,2$ сут (8,2 мес) и 244 сут в контрольной, но разница не достигла статистической значимости ($p=0,12$). **Заключение.** ФДТ является безопасным методом паллиативного лечения тяжелых больных опухолью Клацкина (ECOG 2–3), однако при изолированном использовании обладает ограниченной эффективностью. Комбинация ФДТ с химиоинфузией не вызывает осложнений и может увеличить показатели выживаемости.

Ключевые слова: внепеченочная холангиокарцинома; опухоль Клацкина; внутрипротоковая фотодинамическая терапия; регионарная химиотерапия; артериальная химиоинфузия.

Для цитирования: Козлов А.В., Поликарпов А.А., Таразов П.Г., Моисеенко А.В., Юткин М.В., Шаповал С.В., Турлак А.С., Гранов Д.А. Внутрипротоковая фотодинамическая терапия и ее комбинация с артериальной химиоинфузией в лечении неоперабельных больных опухолью Клацкина. Клиническая практика. 2023;14(1):84–94. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract114961>

Поступила 28.11.2022

Принята 01.12.2022

Опубликована 31.03.2023

INTRADUCTAL PHOTODYNAMIC THERAPY AND ITS COMBINATION WITH INTRA-ARTERIAL CHEMOINFUSION IN THE TREATMENT OF INOPERABLE PATIENTS WITH KLATSKIN TUMOR

A.V. Kozlov, A.A. Polikarpov, P.G. Tarazov, A.V. Moiseenko, M.V. Jutkin, S.V. Shapoval, A.S. Turlak, D.A. Granov

Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russian Federation

Background: A palliative or symptomatic treatment is indicated for 70–80% of patients with Klatskin's tumor because of the advanced lesion volume and the patient's grave condition. Hepatic arterial infusion chemotherapy, chemoembolization, radioembolization are successfully used in the treatment of hepatocellular carcinoma and liver metastases. **Aim:** to estimate the immediate and long-term results of photodynamic therapy (PDT) and its combination with hepatic arterial infusion in inoperable patients with Klatskin tumors. **Methods:** Between 2010 and 2021, 83 palliative PDT sessions (from 1 to 8, average 2.4) were performed in 82 patients as a single treatment or in combination with hepatic arterial infusion. In all cases, percutaneous transhepatic biliary drainage was previously performed; no chemotherapy was applied. Two groups of 48 patients were stratified according to the ECOG status (2–3) and the numbers of PDT sessions (no more than two). The treatment group of the combination therapy consisted of 24 patients (13 male, 11 female) aged 38 to 85 (mean 63) years with the ECOG status of 2–4 (mean 2.4). This group received PDT with hepatic arterial infusion using a GemCis regimen. On average, 1.4 PDT sessions were performed, the treatment started on the 89th (27–225) day after the biliary drainage. The hepatic arterial infusion was performed on the 2d–3th day after the PDT. The control group received only PDT and consisted of 24 patients (13 male, 11 female) aged 51 to 83 (66 on average) years, with the ECOG status of 2–3 (mean 2.6). On average, 1.4 PDT sessions were performed, starting on the 106th (32–405) day after the biliary drainage. **Results:** There were no serious adverse events associated with PDT in both groups. Toxic complications of hepatic arterial infusion were observed in 13 of 24 patients (54%): I–II grade hematological (54%) and gastrointestinal (69%); all were eliminated with medical therapy. Complications of the percutaneous transhepatic biliary drainage in three patients (hemobilia, $n=2$, and sepsis, $n=1$) were estimated as grade III by the CIRSE classification (2017) and successfully treated without surgery. In the combination treatment group, the overall mean survival and median survival were higher than those in the control group: 327.9 ± 39.8 days (10.9 mo) versus 246.9 ± 31.2 days (8.2 mo) and 275 days versus 244 days. However, these differences did not reach the statistical significance ($p=0.12$). **Conclusions:** PDT is a safe method of a palliative treatment of critically ill patients with Klatskin tumor (ECOG 2–3). PDT alone has limited clinical efficacy. A combination of PDT and hepatic arterial infusion does not cause serious complications and may increase the survival rates.

Keywords: extrahepatic cholangiocarcinoma; Klatskin tumor; intraductal photodynamic therapy; regional chemotherapy; intra-arterial chemoinfusion.

For citation: Kozlov AV, Polikarpov AA, Tarazov PG, Moiseenko AV, Jutkin MV, Shapoval SV, Turlak AS, Granov DA. Intraductal Photodynamic Therapy and its Combination with Intra-Arterial Chemoinfusion in the Treatment of Inoperable Patients with Klatskin Tumor. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1): 84–94. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract114961>

Submitted 28.11.2022

Revised 01.12.2022

Published 31.03.2023

ОБОСНОВАНИЕ

Внепеченочный холангиоцеллюлярный рак у половины пациентов локализуется в зоне ворот печени (опухоль Клацкина) и подлежит паллиативному, или симптоматическому, лечению в 70–80% случаев [1, 2].

По данным современных авторов, внутрипротоковая фотодинамическая терапия (ФДТ) позволяет

уменьшить стеноз желчных протоков, улучшить качество жизни и продлить выживаемость больных раком желчных протоков, причем гипербилирубинемия и холангит не являются противопоказаниями к ее применению [3, 4].

Рентгеноэндоваскулярные технологии — химиоинфузия в печеночную артерию, химиоэмболиза-

ция, радиоэмболизация — успешно применяются в лечении гепатоцеллюлярного рака и метастазов печени [5]. В то же время их место в лечении внепеченочного холангиоцеллюлярного рака в настоящее время не установлено.

Цель исследования — определить безопасность и эффективность комбинации ФДТ и артериальной химиоинфузии у больных опухолью Клацкина.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Одноцентровое нерандомизированное контролируемое ретроспективное.

Критерии соответствия

Критерии включения: неоперабельные больные опухолью Клацкина (внепеченочная холангиокарцинома); состояние тяжести пациента по шкале ECOG 2–3 (Eastern Cooperative Oncology Group — Восточная совместная группа по изучению онкологических заболеваний).

Критерии исключения: холангит тяжелой степени по Токийскому руководству (TG-18) [6] (Grade >2); наличие метастазов в другие органы, за исключением печени; печеночная недостаточность (альбумин <25 мг/л, протромбиновое время <50%); асцит II (умеренно выраженный) или III (выраженный напряженный) степени; острая или хроническая в стадии обострения язва желудка и двенадцатиперстной кишки; сопутствующая соматическая патология в стадии суб- или декомпенсации.

Критерии исключения из группы комбинированного лечения ФДТ и артериальной химиоинфузии: механическая желтуха (общий билирубин >60 мкмоль/л).

Условия проведения

Исследование выполнено в ФГБУ «РНЦРХТ им. академика А.М. Гранова» Минздрава России (Санкт-Петербург).

Продолжительность исследования

Исследование проведено в период с 2010 по 2021 г.

Описание медицинского вмешательства

Внутрипротоковая фотодинамическая терапия

В день облучения больному вводили фотосенсибилизатор Фотолон (2,5–3 мг/кг) или Радахлорин

(0,5–2,4 мг/кг) внутривенно за 3 ч до терапии. С этого времени пациент находился в солнцезащитных очках в течение последующих 24 ч для профилактики фототоксических осложнений. Внутрипротоковую ФДТ проводили через имеющийся доступ от ранее установленного наружно-внутреннего чрескожного чреспеченочного холангиодренажа. С целью профилактики осложнений, связанных с травматизацией пункционного канала, ФДТ осуществляли не ранее чем через 7 сут после первичного дренирования.

Процедуру начинали под местной анестезией. Дальнейшее анестезиологическое пособие потребовалось в 32% случаях. Первым этапом устанавливали проводник в тонкую кишку и удаляли холангиодренаж (или оба при билобарном дренировании). Интродьюсер 7–10F (2,3–3,0 мм) проводили в желчные протоки проксимальнее места обструкции и выполняли холангиографию с введением контрастного вещества Ультравист, Омнипак, Оптирей. Оценивали локализацию, протяженность и распространенность опухолевой стриктуры по классификации Висмута–Корлетта (Bismuth–Corlette).

После диагностического этапа выполняли ФДТ. Использовали световод с прямым выходом излучения, проведенный на глубину 3 мм в светоптический гель проксимальной части цилиндрического диффузора. Таким образом, торцевой поток света преобразовывался в сферический и обеспечивал равномерное облучение всей внутренней поверхности опухолевой стриктуры. Диффузор устанавливали в желчные протоки по пункционному каналу, параллельно проводнику. Если геометрия доступа не позволяла провести систему облучения в место обструкции, то по проводнику заводили интродьюсер 11F, и диффузор проводили через него (рис. 1).

ФДТ выполняли на аппарате «ЛАТУС-Т» (Аткус, Россия) в импульсном режиме излучения в течение 1000 мс с интервалом 250 мс. Длина волны излучения составляла 650 ± 20 нм, диаметр светового пятна 600 мкм, удельная мощность излучения 1 Вт, удельная доза излучения 200 Дж/см^2 . При билобарном дренировании процедуру повторяли из другого доступа. По окончании сеанса облучения оптоволокну с диффузором удаляли. Повторно устанавливали наружно-внутренний холангиодренаж, который оставляли на отток желчи для оценки возможных патологических примесей (гемобилии) в течение 1–2 сут.

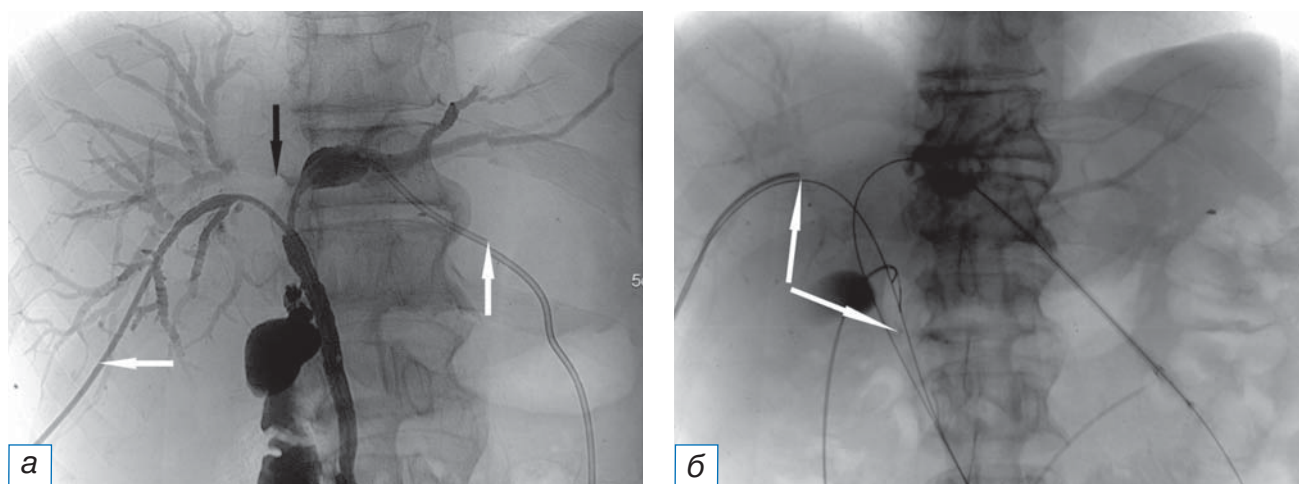


Рис. 1. Холангиография у пациента с опухолью Клацкина, Bismuth IV: а — визуализируются стриктура общего печеночного и обоих долевых желчных протоков (черная стрелка), установлены два билатеральных наружно-внутренних холангиодренажа (белые стрелки); б — дренажи удалены по проводникам; проводится внутрипротоковая фотодинамическая терапия правым доступом. Рабочая часть диффузора находится в зоне стриктуры (стрелки).

Fig. 1. Patient with Klatskin tumor, Bismuth IV, cholangiography: а — stricture of the right and left hepatic ducts (black arrow); in the projection of the bile ducts, two external-internal cholangiodrainages are visualized (white arrow); б — drainages are removed on the guides; photodynamic therapy with right access is performed. The working part of the diffuser is located in the stricture zone (arrow).

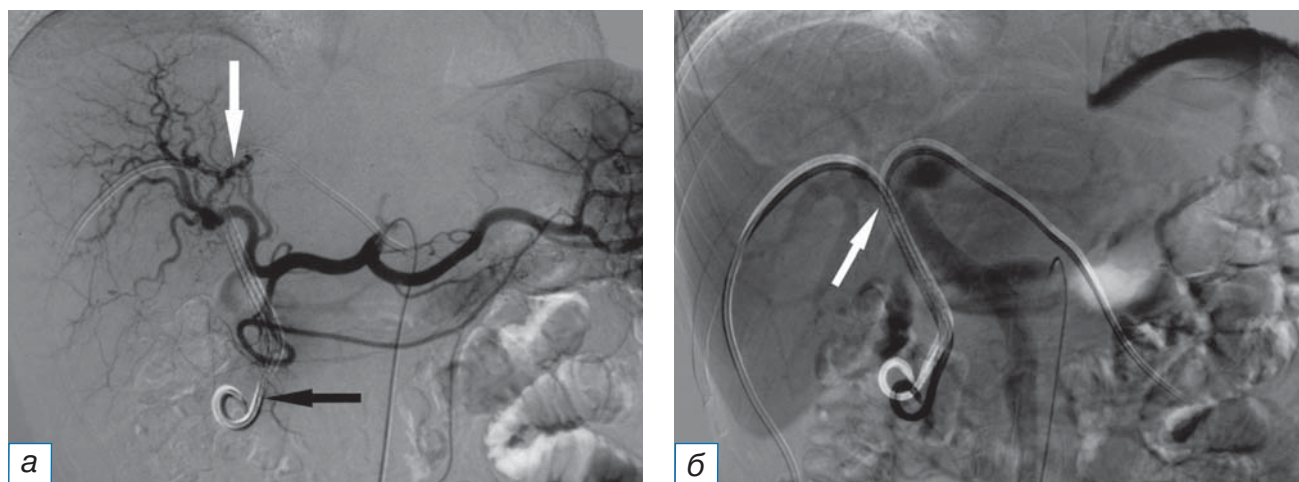


Рис. 2. Ангиограммы того же пациента через 3 сут после фотодинамической терапии: а — целиакография катетером hook: определяется узурация ветвей левой печеночной артерии (белая стрелка), в проекции желчных протоков визуализируются два наружно-внутренних холангиодренажа (черная стрелка); б — возвратная порто-мезентерикография: сдавление опухолью ствола воротной вены (стрелка).

Fig. 2. Angiograms of the same patient 3 days after photodynamic therapy: а — common hepatic artery selective angiography with a "cobra" catheter (tumor invades branches of left hepatic artery — white arrow; two external-internal biliary drainages are seen — black arrow); б — late phase of superior mesenteric angiography (tumor compression of the portal vein — arrow).

Регионарная химиотерапия

Диагностическую ангиографию выполняли по стандартной методике на столе дигитальных ангиографических комплексов Angiostar (Siemens, Германия) или Toshiba Infinix (Toshiba, Япония) через 2–4 сут после ФДТ. Осуществляли катетеризацию

бедренной артерии по Сельдингеру и ангиографию гепатопанкреатобилиарной зоны с введением контрастного вещества автоматическим шприцем (рис. 2). Использовали современные висцеральные катетеры диаметром 4–5F и проводники различной степени жесткости.

Катетер устанавливали в общей печеночной артерии и после внутривенной гидратации в объеме 2 л проводили химиоинфузию в дозировке 1/2 от системной. Начинали с внутриартериального введения цисплатина 35 мг/м² в течение 120 мин. Выполняли постгидратацию 400 мл 0,9% раствором натрия хлорида или 5% раствором декстрозы, затем осуществляли химиоинфузию гемцитабином 500 мг/м² в течение 30 мин (схема GemCis: Gemcitabine+Cisplatin), после чего катетер удаляли. Циклы повторяли каждые 30 сут.

Результаты оценивали по данным магнитно-резонансной (МРТ) и/или компьютерной (КТ) томографии, используя критерии ответа солидных опухолей на лечение (Response assessment in solid tumours: version 1.1, RECIST 1.1). Прогрессированием заболевания считали увеличение продольного размера опухоли, рецидив желтухи вследствие повышения стадии по классификации Bismuth–Corlette. Осложнения интервенционных вмешательств оценивали по классификации Европейского общества сердечно-сосудистой и интервенционной радиологии (Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe, CIRSE, 2017) [7], токсичность и переносимость химиотерапии — по таблицам Национального института рака Канады (Clinical Trial Center-National Cancer Institute of Canada, CTC-NCIC).

Исходы исследования

Среднюю продолжительность жизни пациентов и медиану рассчитывали от выполнения первого холангиодренирования до момента смерти. Продолжительность жизни считали до конечной точки исследования 01.09.2022. Для оценки показателей общей выживаемости на всем протяжении наблюдения использовали метод построения таблиц дожития методом Каплана–Мейера.

Этическая экспертиза

Проводимые методики были одобрены (повторно) локальным этическим комитетом ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, протокол № 03-04/2022 от 28 апреля 2022 г. Выполнение диагностических и лечебных процедур, сбор данных, материала и опрос проводили после добровольного письменного согласия больных.

Статистический анализ

Для оценки достоверности разности показателей использовали t-критерий Стьюдента. Анализ полученных данных осуществляли с применением

пакета программ статистической обработки данных MedCalc версия 19.1.3. (2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты (участники) исследования

За период 2010–2021 гг. проведено 83 сеанса (от 1 до 8, в среднем 2,4) паллиативной ФДТ у 82 пациентов в виде самостоятельного метода лечения и в комбинации с артериальной химиоинфузией. Во всех случаях предварительно было выполнено наружно-внутреннее чрескожное чреспеченочное холангиодренирование без предшествующей специфической терапии.

В группы исследования включены 48 пациентов, стратифицированных по состоянию ECOG 2–3 и числу проведенных сеансов ФДТ (не больше двух).

Основная группа комбинированной терапии состояла из 24 больных (13 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 38 до 85 (средний 63) лет, ECOG 2–3 (среднее 2,4), у которых ФДТ сочетали с химиоинфузией в общую печеночную артерию по схеме Gem/Cis. В среднем выполнили 1,4 сеанса ФДТ, лечение начинали на 89-е (27–225) сутки от установки чрескожного чреспеченочного холангиодренажа. Химиоинфузию проводили на 2–3 сутки после фотозодействия.

В контрольной группе у 24 больных (13 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 51 до 83 (средний 66) лет, ECOG 2–3 (среднее 2,6), выполняли только ФДТ. В среднем выполнили 1,4 сеанса ФДТ, которые начинали на 106-е (32–405) сутки от холангиодренирования. Гипербилирубинемия сохранялась у 15 (62,5%) больных во время фотозодействия.

Основные результаты исследования

По результатам контрольного обследования (КТ или МРТ), частичный ответ на лечение не был получен. После первого цикла комбинации ФДТ с химиоинфузией стабилизация отмечена у 20 (83,3%), прогрессирование у 4 (16,7%) против 15 (62,5%) и 9 (37,5%) больных с ФДТ. К окончанию исследования 01.09.2022 живы в основной группе 8 (33,3%) пациентов в сроки от 64 до 393 сут, в контрольной — 8 (33,3%) больных в сроки от 96 до 265 сут (табл. 1, 2).

Средняя продолжительность жизни от момента чрескожного чреспеченочного холангиодренирования и медиана в основной группе были выше и составили 327,9±39,8 сут (10,9 мес) и 275 сут против 246,9±31,2 сут (8,2 мес) и 244 сут в контрольной, но разница не достигла статистической значимости ($p=0,12$).

Таблица 1 / Table 1

Результаты фотодинамической терапии,
комбинированной с артериальной химиоинфузией,
у больных опухолью Клацкина /

Results of photodynamic therapy combined
with arterial infusion in patients with Klatskin tumor

Пол, возраст, лет	Число циклов ФДТ + РХТ	Ответ на лечение	Выжива- емость, сут
Ж, 62	1	SD	371
М, 70	1	SD	405
Ж, 68	1	SD	жива 393
М, 52	1	SD	511
Ж, 77	1	SD	678
Ж, 64	1	PD	жива 94
М, 83	1	PD	134
М, 65	2	SD	278
М, 47	1	SD	176
Ж, 76	2	SD	451
М, 49	2	SD	270
М, 38	2	SD	жив 135
Ж, 61	2	SD	270
М, 49	2	SD	жив 267
Ж, 76	2	SD	379
М, 48	1	PD	546
Ж, 85	1	SD	жива 64
Ж, 83	2	SD	191
М, 61	1	SD	157
М, 63	2	SD	жив 145
М, 61	1	SD	жив 126
М, 75	1	PD	272
Ж, 49	2	SD	157
Ж, 58	1	SD	жива 227

Примечание. ФДТ — фотодинамическая терапия; РХТ — регионарная химиотерапия; SD (stable disease) — стабилизация болезни; PD (progressive disease) — прогрессирование болезни.

Note: ФДТ — photodynamic therapy; PXT — regional chemotherapy; SD — stable disease; PD — progressive disease.

Общая выживаемость и медиана при комбинированном лечении также были выше: 347,9 (95% ДИ 271,5–424,4) и 278 (95% ДИ 191–451) суток против 271,2 (95% ДИ 213,5–329,0) и 258 (95% ДИ 179–341) суток соответственно ($p=0,09$) (рис. 3).

Нежелательные явления

Летальных исходов, связанных с выполнением ФДТ и регионарной химиотерапии, не было. Неже-

Таблица 2 / Table 2

Результаты фотодинамической терапии
у больных опухолью Клацкина /

Results of photodynamic therapy in patients
with Klatskin tumor

Пол, возраст, лет	Число циклов ФДТ	Ответ на лечение	Выжива- емость, сут
Ж, 82	1	SD	478
М, 82	1	PD	136
Ж, 60	2	SD	470
М, 62	1	SD	249
Ж, 78	1	SD	298
М, 71	2	SD	239
М, 58	2	PD	179
М, 70	1	PD	жив 101
М, 67	1	PD	90
М, 63	1	SD	341
Ж, 61	1	SD	жива 98
М, 54	1	SD	372
Ж, 55	2	PD	190
Ж, 70	2	SD	312
Ж, 79	2	SD	жива 265
М, 51	1	PD	жив 137
Ж, 57	1	SD	жива 96
Ж, 78	1	PD	103
Ж, 83	2	SD	жива 234
Ж, 72	2	SD	258
М, 59	1	SD	жив 176
М, 59	1	PD	103
М, 52	1	PD	132
М, 66	2	SD	жив 253

Примечание. ФДТ — фотодинамическая терапия; SD (stable disease) — стабилизация болезни; PD (progressive disease) — прогрессирование болезни.

Note: ФДТ — photodynamic therapy; SD — stable disease; PD — progressive disease.

лательных явлений ФДТ не отмечено. Проявления токсичности регионарной химиотерапии наблюдались у 13 (54,2%) из 24 пациентов и включали гематологические I–II степени (у 4), желудочно-кишечные I–II степени (у 6), оба осложнения одновременно (у 3). Лейкопения и тромбоцитопения не требовали лечения; при тошноте и рвоте назначали ондансетрон по 8–32 мг/сут и инфузионную коррегирующую терапию.

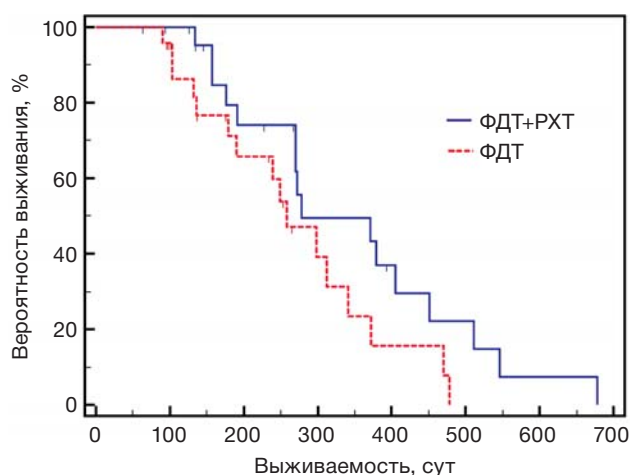


Рис. 3. Общая выживаемость при комбинированной фотодинамической терапии с регионарной химиотерапией (ФДТ+РХТ) и фотодинамической терапии в монорежиме (ФДТ).

Fig. 3. Overall survival for the combination of photodynamic therapy with regional chemotherapy (ФДТ+РХТ) and photodynamic therapy only (ФДТ).

Осложнения, связанные с чрескожным чреспеченочным холангиодренированием, отмечены у 3 (12,5%) пациентов контрольной группы (гемобилия у 2 и сепсис у 1), расценены как III степени тяжести по классификации CIRSE (2017) (требуется дополнительная послеоперационная терапия или пролонгация госпитализации >48 ч; отсутствие последствий в послеоперационном периоде). Эти состояния были купированы консервативными методами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты диагностики и лечения пациентов с опухолью Клацкина по-прежнему остаются неудовлетворительными, что связано с распространенными стадиями и осложнениями заболевания: радикальная операция возможна в ограниченных случаях, а из-за тяжести холангита и механической желтухи больные имеют противопоказания к проведению паллиативного химиолучевого лечения и, по сути, являются инкурабельными [8]. По данным многоцентрового исследования 1144 пациентов с внепеченочной холангиокарциномой J. Khan с соавт. [9] отметили, что специфическая терапия не предлагалась подавляющему большинству ($n=835$, 73%; $p < 0,001$). В остальных случаях проводили лучевую терапию ($n=148$, 52,7%; $p < 0,001$), радикальную операцию ($n=79$, 28,1%; $p \leq 0,001$) и комбинацию облучения с хирургическим методом ($n=54$, 19,2%; $p < 0,001$). Показатели выживаемости

больных с паллиативным лечением не превышают 1,5 лет: медиана при местнораспространенном раке составляет 13,8–16,7 мес, при метастатическом — 7,5–9,3 мес [10].

К сожалению, общепринятого протокола лечения больных внепеченочной холангиокарциномой в настоящее время нет [3, 11]. Проведение лучевой терапии после холангиодренирования ограничено критерием отбора пациентов. Для системной химиотерапии используют следующие схемы: GemCis (сочетание гемцитабина и цисплатина с наб-паклитакселом) или S1 (тегафур+гимерацил+отерацил), FOLFIRINOX (5-фторурацил+лейковорин+оксалиплатин+ириротекан), однако доказана эффективность только первой линии [2]. Причина исключения больных опухолью Клацкина из протокола специфического лечения связана с некупируемой желтухой, рецидивирующим холангитом, тяжестью общего самочувствия пациентов (ECOG 2–3).

В настоящее время перспективным противоопухолевым методом является внутривидеовидеовая ФДТ, которую можно проводить при гипербилирубинемии. Доказана ее эффективность у неоперабельных больных внепеченочной холангиокарциномой; при получении положительного операционного края после R1-резекции и у пациентов с местным рецидивом, а также при достижении снижения стадии (down stage) изначально нерезектабельной опухоли [12].

Механизм ФДТ заключается в относительно селективном накоплении опухоли и зоной перифокального воспаления фотосенсибилизатора, который активируется с помощью света. Следующим этапом запускается каскад внутриклеточных реакций, приводящий к гибели раковых клеток. Метод также обладает выраженным антибактериальным и иммуномодулирующим эффектом. Все эти процессы не приводят к формированию рубцовых билиарных стриктур [3]. Однако в настоящее время отсутствуют четкие показания к назначению ФДТ и ее комбинации с другими методами у больных опухолью Клацкина. Не выработаны единые режимы дозиметрии и параметры облучения. В нашем исследовании мы применяли в качестве фотосенсибилизатора Фотолон и Радохлорин. Длина волны лазерного излучения составляла 650 ± 20 нм, удельная мощность излучения 1 Вт. Похожие параметры были применены Т.Е. Lee с соавт. [13], но с использованием другого препарата (Фотофрин); табл. 3.

К нежелательным явлениям ФДТ относят острый холангит, панкреатит, гемобилию, абсцессы пе-

чени и фототоксическую реакцию, однако только последняя является специфическим осложнением фотовоздействия с частотой возникновения, не превышающей 11% [3, 12]. Все остальные состояния

связаны с холангиодренированием и в большинстве случаев купируются консервативно или с помощью минимально инвазивных методик (табл. 4). В нашем исследовании мы успешно заменили дре-

Таблица 3 / Table 3

Параметры фотодинамической терапии у больных опухолью Клацкина /
Characteristic photodynamic therapy in patients with Klatskin tumor

Автор	Препарат	Длина волны, нм	Импульс/пауза, мс	Удельная мощность излучения	Удельная доза излучения, Дж/см ²	Время ФДТ, мин
РНЦРХТ, 2022	Фотолон, Радахлорин	650±20	1000/250	1000 мВт	200–300	10
Долгушин, 2016 [14]	Радахлорин	662	200–1000 (среднее 200)/100	19,1–288 мВт/см ² (среднее 64,5) 608 мВт	4,6–232,2 (среднее 29)	80 (20 мин одна точка)
Lee, 2016 [13]	Фотофрин	633	-	300–400 мВт/см ² max=2000 мВт	180–200	7,5 (от 6,7 до 10,0)
Wentrup, 2016 [11]	Фотофрин	630	-	241 мВт/см ² 2270 мВт	180	12,5
Li, 2021 [12]	Гематопорфирин	630	-	-	250	25

Примечание. ФДТ — фотодинамическая терапия; РНЦРХТ — Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова.

Note: ФДТ — photodynamic therapy; РНЦРХТ — Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies.

Таблица 4 / Table 4

Результаты фотодинамической терапии у больных опухолью Клацкина /
Results photodynamic therapy in patients with Klatskin tumor

Автор	Метод лечения	Осложнения, n	Медиана, мес	СПЖ, мес
РНЦРХТ, 2022 (≤2 ФДТ)	ФДТ (n=24)	Гемобилия (n=2) Сепсис (n=1)	8,1 (244 сут)	8,2 (247 сут)
	ФДТ+РХТ (n=24)	-	9,2 (275 сут)	10,9 (328 сут)
Долгушин, 2016 [14]	ФДТ (n=39)	Абсцесс (n=1) Эмпиема желчного пузыря (n=2)	31	-
Lee, 2016 [13]	ФДТ (n=37)	Холангит (n=3) Панкреатит (n=1) Холецистит (n=1) Фототоксичность (n=1)	1 ФДТ — 9,5 >1 ФДТ — 13,5	-
Wentrup, 2016 [11]	ФДТ (n=35)	Холангит (n=35)	-	12,5 (374 сут)
	ФДТ+СХТ (n=33)	Холангит (n=33)	-	17,3 (520 сут)
Li, 2021 [12]	ФДТ (n=33)	Холангит (n=9) Панкреатит (n=7) Абсцесс (n=1) Гемобилия (n=1)	14,2	-

Примечание. РНЦРХТ — Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова; ФДТ — фотодинамическая терапия; РХТ — региональная химиотерапия; СХТ — системная химиотерапия; СПЖ — средняя продолжительность жизни.

Note: РНЦРХТ — Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies; ФДТ — photodynamic therapy; РХТ — regional chemotherapy; СХТ — systemic chemotherapy; СПЖ — average life expectancy.

нажную трубку на более широкую при гемобилии и провели интенсивную терапию в отделении реанимации у пациента с сепсисом. Фототоксических реакций не отмечено в обеих группах.

Для лечения гепатоцеллюлярного рака, внутрипеченочной холангиокарциномы, метастазов в печени успешно применяются рентгеноэндоваскулярные технологии [5]. Основной механизм этих методов основан на двойном кровоснабжении паренхимы (70% из воротной вены и 30% из печеночной артерии) и практически только артериальном питании опухолей печени. В литературе встречаются лишь единичные работы, посвященные регионарной химиотерапии опухоли Клацкина. Это объясняется отсутствием четкой визуализации тканевого субстрата и, соответственно, невозможностью технического выполнения селективного введения лекарственных препаратов в множественные мелкие питающие сосуды опухоли. В то же время именно из ветвей общей печеночной артерии кровоснабжается верхняя и средняя треть общего желчного протока. Кроме того, известно, что холангиоцеллюлярный рак развивается ангиогенным путем, а усиление его неоваскуляризации свидетельствует о плохом прогнозе [15, 16]. Учитывая эти данные, артериальная химиоинфузия при опухоли Клацкина представляется теоретически обоснованной.

В доступной литературе мы обнаружили лишь две публикации о применении химиоинфузии в печеночную артерию при внепеченочной холангиокарциноме. M. Sinn с соавт. [17] проводили внутриартериальную химиоинфузию оксалиплатином, фоллиниевой кислотой (лейковорин) и 5-фторурацилом через имплантированный катетер: медиана выживаемости 6 больных составила 12,3 мес. Такие же доступ и схему применили X. Wang с соавт. [18]: ответ на лечение был отмечен у 68% из 37 пациентов, средняя продолжительность жизни — 20,5 мес. В обеих публикациях отмечено отсутствие тяжелых осложнений. Учитывая хорошие результаты, полученные в указанных работах, мы также провели исследование эффективности химиоинфузии у небольшой группы пациентов с опухолью Клацкина [19]. К сожалению, средняя продолжительность жизни 14 больных составила 9,6 мес, а медиана выживаемости — 9,4 мес, что свидетельствует об ограниченной эффективности химиоинфузии при ее изолированном применении.

По данным проведенных исследований, наблюдается достоверное увеличение сроков выживае-

мости пациентов, получивших внутривнутрипротоковую ФДТ, по сравнению с паллиативным холангиодренированием [3]. Так, по данным Z. Li с соавт. [12], медиана выживаемости в этих группах была 14,2 против 9,8 мес соответственно. T.Y. Lee с соавт. [13] пришли к выводу, что неоднократные циклы ФДТ увеличивают медиану выживаемости: при выполнении одного сеанса она составила 9,5 мес, а при нескольких — 13,5 мес (см. табл. 4). Обнадешающие результаты лечения неоперабельных больных были получены Б.И. Долгушиным с соавт. [14]. Авторами было проведено 118 сеансов (от 1 до 10, медиана 2,0) паллиативной внутривнутрипротоковой ФДТ у 39 пациентов с опухолью Клацкина IV типа по Bismuth–Corlette. Лазерное облучение выполняли в импульсном режиме, дозу подбирали индивидуально в зависимости от объема поражения протоков. Срок наблюдения за больными составил 2–47 мес. Осложнения развились у 3 пациентов: эмпиема желчного пузыря у 2, абсцессы печени у 1. Все явления были купированы с помощью минимально инвазивных вмешательств. Медиана выживаемости составила 16 мес (2–47) от первого сеанса облучения и 31 мес (5–69) со времени установления диагноза. Одно-, двух-, трех-, четырех-, пятилетняя актуальная выживаемость от момента установления диагноза составила 88, 68, 39, 14,8 и 5% соответственно. Авторы пришли к заключению, что внутривнутрипротоковая ФДТ представляется перспективным способом увеличения продолжительности и улучшения качества жизни неоперабельных больных [14].

Комбинация эндобилиарного фотовоздействия с системной химиотерапией также приводит к улучшению результатов лечения. Так, по данным R. Wentrup с соавт. [11], средняя продолжительность жизни у больных после ФДТ в монорежиме составила 374 сут, а при комбинации с различными схемами химиотерапии — 520 сут. В группах не было различий по частоте развития холангита. Кроме того, авторы не обнаружили повышенного риска при использовании какой-либо схемы химиотерапии, хотя размеры выборок в этих подгруппах были небольшими.

В нашем исследовании мы решили сравнить безопасность и эффективность ФДТ и регионарной химиотерапии у тяжелых пациентов с ECOG 2–3. В основной группе выполнили комбинацию ФДТ с химиоинфузией в общую печеночную артерию. Используемая схема GemCis оказалась безопасной, как и ранее в режиме монотерапии [19]: по-

бочных эффектов выше II степени токсичности не наблюдалось. Средняя продолжительность жизни составила 10,9 мес в основной группе лечения против 8,2 мес в контрольной при выполнении одного-двух сеансов ФДТ. После апробации методики фотовоздействия и сравнения результатов в настоящее время мы стараемся проводить комбинированное лечение всем больным опухолью Клацкина. Предварительные результаты показывают, что с увеличением числа циклов ФДТ показатели выживаемости улучшаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФДТ является безопасным методом паллиативного лечения тяжелых больных опухолью Клацкина (ECOG 2–3), однако при изолированном использовании обладает ограниченной эффективностью. Комбинация с химиоинфузией не вызывает осложнений, при этом наблюдается тенденция к увеличению продолжительности жизни.

Требуют изучения режимы и параметры фотовоздействия, а также комбинации ФДТ с различными схемами химиотерапии и другими методиками на большем числе наблюдений.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. А.В. Козлов — анализ литературы, написание статьи, набор клинических данных; А.А. Поликарпов, Д.А. Гранов — общий дизайн исследования, рецензирование статьи; П.Г. Таразов — общий дизайн исследования, написание и рецензирование статьи; А.В. Моисеенко, М.В. Юткин, С.В. Шаповал — лечение пациентов, набор клинических данных; А.С. Турлак — статистический анализ данных исследования. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. A.V. Kozlov — analysis of literature, collection of clinical data, writing the article; A.A. Polikarpov, D.A. Granov — general study design, reviewing the article; P.G. Tarazov — general study design, writing and reviewing the article; A.V. Moiseenko, M.V. Jutkin, S.V. Shapoval — treatment of patients, collection of clinical data; A.S. Turlak — statistical analysis of the research data. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data

for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Статья написана в рамках Государственного задания № 056-00102-21 «Разработка методики внутривенной фотодинамической терапии и внутриаартериальной регионарной химиотерапии для лечения пациентов с нерезектабельными опухолями Клацкина».

Funding source. This study was carried out as a part of State Assignment № 056-00102-21 «Development of a technique of photodynamic therapy and intra-arterial chemotherapy for the treatment of patients with unresectable Klatskin tumors».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

Competing interests. The study had no sponsorship.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Алиева С.Б., Базин И.С., Бредер В.В., и др. Клинические рекомендации. Рак желчевыводящей системы. Москва, 2020. 51 с. [Aliieva SB, Bazin IS, Breder VV, et al. Clinical recommendations. Cancer of the biliary system. Moscow; 2020. 51 p. (In Russ).]
2. Inchingolo R, Acquafredda F, Ferraro V, et al. Non-surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Oncol.* 2021;13(11):1696–1708. doi: 10.4251/wjgo.v13.i11.1696
3. Францев Д.Ю., Сергеева О.Н., Долгушин Б.И. Лечение гиллюсной холангиокарциномы. Современное состояние вопроса // *Сибирский онкологический журнал.* 2019. Т. 18, № 1. С. 103–115. [Frantsev DY, Sergeeva ON, Dolgushin BI. Treatment of hylus cholangiocarcinoma. The current state of the issue. *Siberian Oncol J.* 2019;18(1):103–115. (In Russ).] doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-103-115
4. Chen P, Yang T, Shi P, et al. Benefits and safety of photodynamic therapy in patients with hilar cholangiocarcinoma: A meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;(37):102712. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102712
5. Таразов П.Г., Кагачева Т.И. Рентгеноэндоваскулярные вмешательства в лечении внутривенной холангиокарциномы (обзор литературы) // *Диагностическая и интервенционная радиология.* 2021. Т. 15, № 3. С. 55–66. [Tarazov PG, Kalacheva TI. X-ray endovascular interventions in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma (literature review). *Diagnostic interventional radiology.* 2021;15(3):55–66. (In Russ).] doi: 10.25512/DIR.2021.15.3.06
6. Mayumi T, Okamoto K, Takada T, et al. Tokyo Guidelines 2018: management bundles for acute cholangitis and cholecystitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2018;25(1):96–100. doi: 10.1002/jhpb.519
7. Filippiadis DK, Binkert C, Pellerin O, et al. CIRSE quality assurance document and standards for classification of complications: the CIRSE classification system. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2017;40(8):1141–1146. doi: 10.1007/s00270-017-1703-4
8. Гранов Д.А., Поликарпов А.А., Таразов П.Г., и др. Опухоль Клацкина, осложненная механической желтухой и холангитом, в реальной практике: нерезектабельная опухоль или incurable patient? // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова.* 2020. Т. 179, № 4. С. 9–16. [Granov DA, Polikarpov AA, Tarazov PG,

- et al. Klatskin's tumor, complicated by mechanical jaundice and cholangitis, in real practice: an unresectable tumor or an incurable patient? *Bulletin Surgery named after I.I. Grekov*. 2020;179(4):9–16. (In Russ.) doi: 10.24884/0042-4625-2020-179-4-9-16
9. Khan J, Ullah A, Matolo N, et al. Klatskin tumor in the light of ICD-O-3: A population-based clinical outcome study involving 1,144 patients from the surveillance, epidemiology, and end result (SEER) database (2001–2012). *Cureus*. 2021;13(10):e18941. doi: 10.7759/cureus.18941
 10. Bisello S, Buwenge M, Palloni A, et al. Radiotherapy or chemoradiation in unresectable biliary cancer: A retrospective study. *Anticancer Res*. 2019;39(6):3095–3100. doi: 10.21873/anticancer.13445
 11. Wentrup R, Winkelmann N, Mitroshkin A, et al. Photodynamic therapy plus chemotherapy compared with photodynamic therapy alone in hilar nonresectable cholangiocarcinoma. *Gut Liver*. 2016;10(3):470–475. doi: 10.5009/gnl15175
 12. Li Z, Jiang X, Xiao H, et al. Long-term results of ERCP- or PTCS-directed photodynamic therapy for unresectable hilar cholangiocarcinoma. *Surg Endosc*. 2021;35(10):5655–5664. doi: 10.1007/s00464-020-08095-1
 13. Lee TY, Cheon YK, Shim CS. Photodynamic therapy in patients with advanced hilar cholangiocarcinoma: Percutaneous cholangioscopic versus peroral transpapillary approach. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(4):50–56. doi: 10.1089/pho.2015.3989
 14. Долгушин Б.И., Сергеева О.Н., Францев Д.Ю., и др. Внутривенная фотодинамическая терапия при воротной холангиокарциноме у неоперабельных больных // *Анналы хирургической гепатологии*. 2016. Т. 21, № 3. С. 106–118. [Dolgushin BI, Sergeeva ON, Frantsev DY, et al. Intra-current photodynamic therapy in portal cholangiocarcinoma in inoperable patients. *Annals surgical hepatology*. 2016;21(3): 106–118. (In Russ.)]
 15. Desai GS, Pande PM. Gastroduodenal artery: Single key for many locks. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2019;26(7):281–291. doi: 10.1002/jhbp.636
 16. Morell CM, Fabris L, Strazzabosco M. Vascular biology of the biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(Suppl 1): 26–32. doi: 10.1111/jgh.12022
 17. Sinn M, Nicolaou A, Gebauer B, et al. Hepatic arterial infusion with oxaliplatin and 5-FU/folinic acid for advanced biliary tract cancer: A phase II study. *Dig Dis Sci*. 2013;58(8):2399–2405. doi: 10.1007/s10620-013-2624-y
 18. Wang X, Hu J, Cao G, et al. Phase II study of hepatic arterial infusion chemotherapy with oxaliplatin and 5-fluorouracil for advanced perihilar cholangiocarcinoma. *Radiology*. 2017; 283(2):580–589. doi: 10.1148/radiol.2016160572
 19. Козлов А.В., Таразов П.Г., Поликарпов А.А., и др. Артериальная химиоинфузия в лечении неоперабельных больных опухолью Клацкина: предварительные результаты // *Клиническая практика*. 2022. Т. 13, № 3. С. 25–31. [Kozlov AV, Tarazov PG, Polikarpov AA, et al. Arterial chemoinfusion in the treatment of inoperable patients with Klatskin's tumor: Preliminary results. *Journal of Clinical Practice*. 2022;13(3): 25–31. (In Russ.)] doi: 10.17816/clinpract109310

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Козлов Алексей Владимирович, д.м.н.;
адрес: Россия, 197758, Санкт-Петербург,
п. Песочный, ул. Ленинградская д. 70;
е-mail: av_kozlov@mail.ru; eLibrary SPIN: 3790-3030;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6878-6762>

Соавторы:

Поликарпов Алексей Александрович, д.м.н.;
е-mail: pol1110@mail.ru; eLibrary SPIN: 4641-0720;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7683-5042>

Таразов Павел Гадальгараевич, д.м.н., профессор;
е-mail: tarazovp@mail.ru; eLibrary SPIN: 7089-7542;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9190-116X>

Моисеенко Андрей Викторович;
е-mail: med_moiseenko@mail.ru; eLibrary SPIN: 5992-9441;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1011-4533>

Юткин Максим Викторович;
е-mail: yutkin-m@mail.ru; eLibrary SPIN: 3767-4655;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4566-1190>

Шаповал Сергей Владимирович, к.м.н.;
е-mail: gotina@yandex.ru; eLibrary SPIN: 9735-2998;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3743-393X>

Турлак Анастасия Сергеевна;
е-mail: a_turlak18@mail.ru; eLibrary SPIN: 8389-1364;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2207-767X>

Гранов Дмитрий Анатольевич, д.м.н.,
профессор, академик РАН;
е-mail: dmitriigranov@gmail.com; eLibrary SPIN: 5256-2744;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8746-8452>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Alexey V. Kozlov, MD, PhD;
address: 70 Leningradskaya street,
Pesochny, 197758 Saint Petersburg, Russia;
е-mail: av_kozlov@mail.ru; eLibrary SPIN: 3790-3030;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6878-6762>

Co-authors:

Aleksey A. Polikarpov, MD, PhD;
е-mail: pol1110@mail.ru; eLibrary SPIN: 4641-0720;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7683-5042>

Pavel G. Tarazov, MD, PhD, Professor;
е-mail: tarazovp@mail.ru; eLibrary SPIN: 7089-7542;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9190-116X>

Andrey V. Moiseenko, MD;
е-mail: med_moiseenko@mail.ru; eLibrary SPIN: 5992-9441;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1011-4533>

Maksim V. Jutkin, MD;
е-mail: yutkin-m@mail.ru; eLibrary SPIN: 3767-4655;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4566-1190>

Sergey V. Shapoval, MD, PhD;
е-mail: gotina@yandex.ru; eLibrary SPIN: 9735-2998;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3743-393X>

Anastasia S. Turlak, MD;
е-mail: a_turlak18@mail.ru; eLibrary SPIN: 8389-1364;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2207-767X>

Dmitrii A. Granov, MD, PhD, Professor,
Academician of the Russian Academy of Sciences;
е-mail: dmitriigranov@gmail.com; eLibrary SPIN: 5256-2744;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8746-8452>

ПОСТОПЕРАЦИОННАЯ БОЛЬ В РАННЕМ И ПОЗДНЕМ ПЕРИОДЕ ПРИ ОПЕРАТИВНОМ ВМЕШАТЕЛЬСТВЕ НА ШЕЙНОМ И ПОЯСНИЧНО-КРЕСТЦОВОМ ОТДЕЛЕ ПОЗВОНОЧНИКА

А.А. Солх Мохаммед, В.В. Белопасов

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Российская Федерация

Год от года синдром постоперационной боли при оперативном вмешательстве на шейном и поясничном отделах позвоночника представляется все более серьезной проблемой для клиницистов-вертебрологов. Лечение пациентов с этой формой патологии требует мультидисциплинарного подхода. Медикаментозная терапия не всегда дает желаемые результаты. В настоящее время востребованы немедикаментозные методы, например нейромодуляция с помощью имплантированного хирургически эпидурального нейростимулятора или неинвазивной чрескожной электростимуляции спинного мозга. Но, учитывая, что профилактика всегда лучше лечения, специалисты должны помнить о возможных неблагоприятных факторах, способствующих возникновению послеоперационной боли, среди которых не последнюю роль играет психоэмоциональное состояние пациента.

Ключевые слова: послеоперационный синдром позвоночника; повторная операция на позвоночнике; лечение хронической боли; мультимодальный пациентоориентированный персонализированный подход.

Для цитирования: Солх Мохаммед А.А., Белопасов В.В. Постоперационная боль в раннем и позднем периоде при оперативном вмешательстве на шейном и пояснично-крестцовом отделе позвоночника. Клиническая практика. 2023;14(1):95–100. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract166290>

Поступила 31.01.2023

Принята 06.02.2023

Опубликована 03.03.2023

FOLLOWING A POSTOPERATIVE PAIN IN THE EARLY AND LATE PERIOD DURING SURGICAL INTERVENTION ON THE CERVICAL AND LUMBOSACRAL SPINE

A.A. Solx Mohammed, V.V. Belopasov

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

From year to year, postoperative pain syndrome following a surgical intervention on the cervical and lumbar regions of the spine becomes an increasingly serious problem for spine surgeons. The treatment of such a pathology requires a multidisciplinary approach. Drug therapy does not always provide the desired outcome. Non-drug approaches, such as neuromodulation with a surgically implanted spinal cord stimulator or non-invasive transcutaneous electrical nerve stimulation, are currently in great demand. However, given the fact that prevention is always better than treatment, specialists have to always take into account the possible adverse factors which may contribute to the appearance of postoperative pain. The patient's psychoemotional state plays not the least important role among those factors.

Keywords: postoperative spinal syndrome; reoperation on the spine; treatment of chronic pain; multi-modal patient-oriented personalized approach.

For citation: Solx Mohammed AA, Belopasov VV. Following a Postoperative Pain in the Early and Late Period During Surgical Intervention On the Cervical and Lumbosacral Spine. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):95–100. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract166290>

Submitted 31.01.2023

Revised 06.02.2023

Published 03.03.2023

ВВЕДЕНИЕ

Считается, что многих пациентов пожизненно преследуют боли в шейном и поясничном отделах позвоночного столба: среди населения стран мира их распространенность составляет 60–80%. Этот факт делает вертебральную патологию источником самых частых жалоб на здоровье [1–4]. Примерно 10% людей, страдающих болями этой локализации, имеют симптомы длительностью более 3 месяцев [5]. В этой связи в России, ближнем и дальнем зарубежье значительно выросла доля лиц, которым была оказана хирургическая помощь.

С 1 января 2022 г. официально вступила в силу Международная классификация болезней 11-го пересмотра (МКБ-11; International Classification of Diseases 11th Revision, ICD-11). В разделе «Боль» появилась новая дефиниция — MG30 Хроническая боль. Этот фенотип боли выделяется экспертами как самостоятельная нозология и имеет отдельную рубрификацию. В новой классификации уделено также должное внимание подтипу хронической боли, в частности мышечно-скелетной боли той же локализации (MG30.3 Chronic secondary musculoskeletal pain). В отдельную рубрику вынесена послеоперационная боль (MG30.21 Chronic postsurgical pain) как причина хронической боли [6].

Современный консенсус (МКБ-11) будет способствовать лучшей диагностике хронической боли не только неврологами, но и хирургами, онкологами, врачами других специальностей, помогая им определиться с выбором персонализированного лечения пациентов.

ФАКТОРЫ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ БОЛИ

Диагностический термин «послеоперационный синдром позвоночника» наиболее точно описывает возникающие осложнения [7]. Общая частота неудачных оперативных вмешательств на поясничном и шейном отделах позвоночника колеблется от 10 до 46% [8]. Несмотря на совершенствование технологий и хирургических техник, тенденция к росту числа пациентов с послеоперационной болью сохраняется. Основная причина — недостаточный уровень знаний о механизмах ее развития [2]; кроме того, нет точной оценки распространенности конкретных типов и подтипов хронической боли среди прооперированных больных в связи с отсутствием регистра и катamnестических данных. Анализ частоты встречаемости этого состояния проводится после повторных поступлений больного в конкретный стационар в связи с его неудовлетворен-

ностью результатом предыдущего оперативного вмешательства.

Известно, что повторная операция на позвоночнике — вариант лечения с уменьшающейся отдачей. Хотя более 50% первичных операций на позвоночнике успешны, не более 30, 15 и 5% пациентов имеют положительный результат после второй, третьей и четвертой операции соответственно [9, 10]. Субъективная оценка рецидивирующей послеоперационной боли у пациентов после вмешательства на позвоночном столбе отличается от таковой у больных с хроническими заболеваниями мышечного и опорно-двигательного аппарата, которые испытывают более высокий уровень боли при более низком качестве жизни и нарушении физических функций по сравнению со страдающими остеоартрозом, ревматоидным артритом, синдромом комплексной регионарной боли и фибромиалгией [11, 12].

При обсуждении вариантов лечения послеоперационных болей необходимо учитывать и факторы, напрямую зависящие от личности пациента, его реакции на операционное вмешательство, течение послеоперационного периода, удовлетворенность полученным результатом. Неадекватная оценка, нестабильность в сфере психосоциального состояния пациента оказывают существенное негативное влияние на конечный результат его лечения [13]. При прогнозировании неблагоприятных исходов операций на позвоночнике необходимо всегда учитывать морфологические и социальные факторы риска [14]. Согласно литературным данным, худшие результаты были получены у пациентов с длительным болевым синдромом, маскированной соматической депрессией (невывявленной), большой массой тела, с лекарственной, в том числе опиоидной зависимостью, а также у лиц, получающих ранее пенсию по инвалидности в связи со стойкой болью в шее или спине [15–18].

Важными предикторами сохранения боли являются неправильный выбор уровня, метода и объема хирургического вмешательства, число, травматичность и длительность выполненных ранее операций. Одноуровневая декомпрессивная ламинэктомия при неизвестном многоуровневом поражении позвоночника вряд ли облегчит имеющиеся у пациента симптомы. Сходным образом декомпрессивные операции при неучтенных факторах риска вряд ли будут способствовать удовлетворительному исходу [1, 11, 12].

Результатом допущенных при проведении операции на позвоночном столбе ошибок являются

непрекращающиеся боли в одном и том же операционном участке, в том числе возможное появление новых источников боли. Каждая операция может вызвать новую сегментарную нестабильность и боль, связанную, например, с неправильно установленным имплантатом [12]. Анализ 105 случаев лечения поясничного спондилодеза с использованием транспедикулярных винтов показал, что частота послеоперационных осложнений или поломок при установке винтов или имплантатов при повторном вмешательстве составляет 6,5 и 12,0% соответственно, при этом риск развития серьезных неврологических осложнений у этих больных возрастает [19].

Пациенты, подвергнутые спондилодезу в области нескольких позвоночно-двигательных сегментов, подвержены риску потери сагиттального баланса. Кроме того, у пациентов с уменьшенным углом наклона крестца после спондилодеза может наблюдаться лордоз, который будет способствовать нагрузке на крестцово-подвздошные суставы [8].

Образование гематом в эпидуральном или субдуральном пространстве, псевдоменингоцеле, повреждения корешка, присоединение раневой инфекции сразу после операции могут представлять для пациента наибольшую опасность. Измененная биомеханика прооперированного позвоночника после поясничной дискэктомии становится фактором, инициирующим сегментарное напряжение мышц, фасций, возникновение боли после любой механической нагрузки, которая через несколько лет у 36% пациентов имеет все признаки хронической [12, 20].

ЛЕЧЕНИЕ ПОСТОПЕРАЦИОННЫХ БОЛЕЙ

Пациентам с болями в поясничном и шейном отделах позвоночного столба, которым не показано срочное хирургическое вмешательство, рекомендуется лечение, в программу которого входят физиотерапевтические процедуры и прием анальгетиков.

Все нестероидные противовоспалительные препараты превосходят плацебо при купировании не продолжительной боли в поясничном и шейном отделах позвоночного столба [21, 22].

Противосудорожные препараты габапентин (Нейронтин) и прегабалин (Лирика) хорошо зарекомендовали себя в лечении нейропатической боли, в том числе хронической, после операций на позвоночнике [23]. Прегабалин может успешно применяться для профилактики послеоперационной боли до и после хирургического вмешательства [24]. Вместе с тем эффективность применения га-

бапентина и прегабалина при стойкой боли в нижней части спины, корешковых нейропатических болевых синдромах, компрессии седалищного нерва ставится под сомнение [25, 26], к тому же прием габапентина характеризуется высоким риском развития побочных осложнений.

Использование опиоидов при хронической поясничной боли становится также спорным, и в настоящее время рекомендуется только для краткосрочной терапии в течение нескольких недель из-за отсутствия доказательств долгосрочного уменьшения боли при их назначении. Кроме того, все больше данных свидетельствует о значительных рисках, связанных с длительным употреблением опиоидов, включая привыкание, зависимость, передозировку и даже смерть [27].

Положительный результат в виде снижения интенсивности и стойкости боли в ближайшем послеоперационном периоде и после выписки больного из стационара может быть получен при использовании когнитивно-поведенческой терапии.

Физиотерапия является важной частью мультимодального подхода в программе лечения боли не только в стационаре, но и после на всех этапах реабилитации больного [27].

НЕЙРОМОДУЛЯЦИЯ

При стойкой, медикаментозно не купируемой боли электрическая стимуляция спинного мозга по праву считается наиболее эффективной формой малоинвазивного лечения [28]. При сравнительной оценке традиционной медикаментозной терапии со стимуляцией спинного мозга в мультицентровых рандомизированных плацебоконтролируемых исследованиях преимущества использования инновационного подхода были очевидны [29–31]. У прооперированных пациентов, испытывающих корешковые боли в шейном и поясничном отделах, удовлетворенность лечением достигнута в большинстве случаев: помимо уменьшения интенсивности боли, стимуляция спинного мозга оказалась более успешной, чем повторная операция ($p < 0,01$); меньшему числу пациентов потребовалось повторное оперативное вмешательство. Согласно результатам ретроспективного анализа 16 455 пациентов с болями в позвоночном столбе, повторная операция в отсроченном периоде (через 90 дней) давала большее число осложнений, чем имплантация электродов для стимуляции спинного мозга (14,4 против 6,5%) [32].

В клинических испытаниях апробированы различные варианты нейромодуляции, включая взрыв-

ную стимуляцию ганглиев дорсальных корешков и стимуляцию периферических нервов. На основании рандомизированного исследования S. Schu и соавт. [33] можно заключить, что существуют умеренные доказательства положительного влияния взрывной стимуляции в виде снижения выраженности боли, более высокой удовлетворенности пациентов при ее использовании по сравнению с традиционной стимуляцией. Проспективное исследование L. Liem и соавт. [34] свидетельствует, что стимуляция дорсальных корешковых ганглиев в одинаковой степени воздействует при болях в ногах и шее. При лечении возникшего и сохраняющегося болевого синдрома преимущества высокочастотной взрывной стимуляции спинного мозга, по сравнению с низкочастотной, очевидны [35, 36].

Отбор пациентов на имплантацию электродов для стимуляции спинного мозга требует всесторонней оценки, при которой подтверждается, что намеченное повторное хирургическое вмешательство не принесет дополнительной пользы. Альтернативным решением может стать чрескожная электростимуляция. Этот метод активно разрабатывается группой ученых под руководством член-корреспондента РАН Ю.П. Герасименко и имеет очевидные преимущества, поскольку является неинвазивным и не требует установки дорогостоящего нейростимулятора [37]. Метод показал свою результативность в предварительных исследованиях по электростимуляции спинного мозга у больных с нарушениями локомоции после спинальной травмы [38]. Эффективность чрескожной электростимуляции при болевых синдромах в настоящее время изучается.

К другим перспективным технологиям лечения хронической боли относятся малоинвазивные нейрохирургические подходы. Получены положительные результаты при использовании химической и радиочастотной абляции, интрадисковой электротермальной терапии [1], стимуляции периферических нервов [32], антиалгической стимуляции унилатеральных задних корешков и спинальных ганглиев [39], различных современных технологий физиотерапии, в том числе с биологической обратной связью [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подход к лечению послеоперационных болей в шейном и пояснично-крестцовом отделах позвоночного столба должен учитывать не только показания, но и ограничения возможного хирургического вмешательства, различные факторы, ассоциированные с пациентом, которые могут

привести к неблагоприятным исходам, развитию хронического болевого синдрома.

Обязательным является участие компетентной междисциплинарной команды в разработке алгоритма и последовательности лечения таких больных. Взаимодействие между неврологами, нейрохирургами, психологами, физиотерапевтами, нейрофизиологами и другими смежными специалистами имеет важное значение для улучшения результатов лечения, предотвращения трансформации послеоперационной боли в хроническую.

Стимуляция спинного мозга является наиболее предпочтительным вариантом ее лечения при отсутствии хирургической альтернативы. Применение современных малоинвазивных технологий лечения боли, возникшей при структурной патологии на шейном и поясничном уровне позвоночника, позволяет снизить число случаев инвалидизации и существенно повысить качество жизни прооперированных больных.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. А.А. Солх Мохаммед — подбор литературы, написание обзора; В.В. Белопасов — концепция обзора, анализ литературы, написание и редактирование рукописи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. A.A. Solx Mohammed — search and analytical work, manuscript writing; V.V. Belopasov — concept of the review, literature analysis, manuscript writing and editing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении поисково-аналитической работы.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Яриков А.В., Денисов А.А., Докиш М.Ю., и др. Миниинвазивные методы лечения дискогенной боли и фасеточного синдрома в поясничном отделе позвоночника: обзор литературы и собственный опыт // *Клиническая практика*. 2019. Т. 10, № 3. С. 61–71. [Yarikov AV, Denisov AA, Dokish MYu, et al. Minimally invasive methods of treatment of discogenic pain and facet syndrome in the lumbar spine: literature review and own experience. *Journal of Clinical Practice*. 2019;10(3):61–71. (In Russ).] doi: 10.17816/clinpract10361-71
2. Подчуфарова Е.В. Боль в спине: доказательная медицина и клиническая практика // *Трудный пациент*. 2010. Т. 8, № 3. С. 18–24. [Podchufarova EV. Back pain evidence-based medicine and clinical practice. *Difficult patient*. 2010;8(3):18–24. (In Russ).]
3. Maldonado-Naranjo AL, Golubovsky JL, Frizon LA, et al. The role of additional spine surgery in the management of failed back surgery syndrome, complex regional pain syndrome, and intractable pain in the setting of previous or concurrent spinal cord stimulation: Indications and outcomes. *World Neurosurg*. 2019;125:e416–e423. doi: 10.1016/j.wneu.2019.01.091
4. Mons MR, Edelbroek C, Zuidema X, et al. Study protocol: Effects of active versus passive recharge burst spinal cord stimulation on pain experience in persistent spinal pain syndrome type 2: A multicentre randomized trial (BURST-RAP study). *Trials*. 2022;23(1):749. doi: 10.1186/s13063-022-06637-7
5. Diebels OR, Baheri B, Gios J, et al. The importance of initial epidurography prior to any drug administration in three-day adhesiolysis procedure. *Int Med Case Rep J*. 2022;15:615–620. doi: 10.2147/IMCRJ.S370185
6. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics (Version: 01/2023) [Internet]. Режим доступа: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>. Дата обращения: 15.12.2022.
7. Hamm-Faber TE, Gültuna I, van Gorp EJ, Aukes H. High-dose spinal cord stimulation for treatment of chronic low back pain and leg pain in patients with FBSS, 12-month results: A prospective pilot study. *Neuromodulation*. 2020;23(1):118–125. doi: 10.1111/ner.12940
8. Kurt E, Noordhof RK, van Dongen R, et al. Spinal cord stimulation in failed back surgery syndrome: An integrative review of quantitative and qualitative studies. *Neuromodulation*. 2022;25(5):657–670. doi: 10.1016/j.neurom.2021.11.013
9. Daniell JR, Osti OL. Failed back surgery syndrome: A review article. *Asian Spine J*. 2018;12(2):372–379. doi: 10.4184/asj.2018.12.2.372
10. Brickman B, Tanios M, Patel D, Elgafy H. Clinical presentation and surgical anatomy of sympathetic nerve injury during lumbar spine surgery: a narrative review. *J Spine Surg*. 2022;8(2):276–287. doi: 10.21037/jss-22-2
11. Радченко В.А., Продан А.И., Рябов О.В. Осложнения микродискектомии при поясничном остеохондрозе // *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2003. № 2. С. 12–15. [Radchenko VA, Prodan AI, Ryabov OV. Complications of microdiscectomy in lumbar osteochondrosis. *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*. 2003;(2):12–15. (In Russ).]
12. Ricciardi L, Piazza A, Capobianco M, et al. Lumbar interbody fusion using oblique (OLIF) and lateral (LLIF) approaches for degenerative spine disorders: A meta-analysis of the comparative studies. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2023;33(1):1–7. doi: 10.1007/s00590-021-03172-0
13. Кушнаренко Т.И. Психорелаксационная терапия у больных с болевым синдромом после операции на межпозвоночных дисках: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2011. 31 с. [Kushnarenko TI. Psychorelaxation therapy in patients with pain syndrome gackt intervertebral disc surgery [dissertation abstract]. Moscow: 2011. 31 p. (In Russ).]
14. Falowski SM, Moore GA, Cornidez EG, et al. Improved psychosocial and functional outcomes and reduced opioid usage following burst spinal cord stimulation. *Neuromodulation*. 2021;24(3):581–590. doi: 10.1111/ner.13226
15. Head J, Mazza J, Sabourin V, et al. Waves of pain relief: A systematic review of clinical trials in spinal cord stimulation waveforms for the treatment of chronic neuropathic low back and leg pain. *World Neurosurg*. 2019;131:264–274.e3. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.167
16. Jabłońska R, Ślusarz R, Królikowska A, et al. Depression, social factors, and pain perception before and after surgery for lumbar and cervical degenerative vertebral disc disease. *J Pain Res*. 2017;10:89–99. doi: 10.2147/JPR.S121328
17. Amirdelfan K, Webster L, Poree L, et al. Treatment options for failed back surgery syndrome patients with refractory chronic pain: An evidence based approach. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017; 42 Suppl 14:S41–S52. doi: 10.1097/BRS.0000000000002217
18. Costelloe C, Burns S, Yong RJ, et al. An analysis of predictors of persistent postoperative pain in spine surgery. *Curr Pain Headache Rep*. 2020;24(4):11. doi: 10.1007/s11916-020-0842-5
19. Manchikanti L, Knezevic NN, Sanapati SP, et al. Is percutaneous adhesiolysis effective in managing chronic low back and lower extremity pain in post-surgery syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Curr Pain Headache Rep*. 2020;24(6):30. doi: 10.1007/s11916-020-00862-y
20. Edinoff AN, Kaufman S, Alpaugh ES, et al. Burst spinal cord stimulation in the management of chronic pain: Current perspectives. *Anesth Pain Med*. 2022;12(2):e126416. doi: 10.5812/aapm-126416
21. Saragiotto BT, Machado GC, Ferreira ML, et al. Paracetamol for low back pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2016(6):CD012230. doi: 10.1002/14651858.CD012230
22. Enthoven WT, Roelofs PD, Deyo RA, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for chronic low back pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2(2):CD012087. doi: 10.1002/14651858.CD012087
23. Fu JL, Perloff MD. Pharmacotherapy for spine-related pain in older adults. *Drugs Aging*. 2022;39(7):523–550. doi: 10.1007/s40266-022-00946-x
24. Bala R, Kaur J, Sharma J, Singh R. Comparative evaluation of pregabalin and clonidine as preemptive analgesics for the attenuation of postoperative pain following thoracolumbar spine surgery. *Asian Spine J*. 2019;13(6):967–975. doi: 10.31616/asj.2019.0031
25. Enke O, New HA, New CH, et al. Anticonvulsants in the treatment of low back pain and lumbar radicular pain: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2018;190(26):E786–E793. doi: 10.1503/cmaj.171333
26. Giménez-Campos MS, Pimenta-Fermission-Ramos P, Díaz-Cambronero JL, et al. A systematic review and meta-analysis of the effectiveness and adverse events of gabapentin and pregabalin for sciatica pain. *Aten Primaria*. 2022;54(1):102144. doi: 10.1016/j.aprim.2021.102144
27. Waelkens P, Alsabbagh E, Sauter A, et al.; PROSPECT Working group of the European Society of Regional Anaesthesia and Pain therapy (ESRA). Pain management after complex spine surgery: A systematic review and procedure-specific postoperative pain management recommendations. *Eur J Anaesthesiol*. 2021;38(9):985–994. doi: 10.1097/EJA.0000000000001448
28. Odonkor C, Kwak R, Ting K, et al. Fantastic four: Age, spinal cord stimulator waveform, pain localization and history of spine surgery influence the odds of successful spinal cord stimulator trial. *Pain Physician*. 2020;23(1):E19–E30.
29. Kumar K, Taylor RS, Jacques L, et al. Spinal cord stimulation versus conventional medical management for neuropathic pain: A multicentre randomised controlled trial in patients with failed back surgery syndrome. *Pain*. 2007;132(1-2):179–188. doi: 10.1016/j.pain.2007.07.028
30. Aryal V, Poudel S, Zulfiqar F, et al. Updates on the role of spinal cord stimulation in the management of non-surgical chronic lower back pain. *Cureus*. 2021;13(10):e18928. doi: 10.7759/cureus.18928
31. Hamm-Faber TE, Aukes H, van Gorp EJ, Gültuna I. Subcutaneous stimulation as an additional therapy to spinal cord stimulation for the treatment of low back pain and leg pain in failed back surgery syndrome: Four-year follow-up. *Neuromodulation*. 2015;18(7):618–622; discussion 622. doi: 10.1111/ner.12309

32. Van Gorp EJ, Teernstra O, Aukes HJ, et al. Long-term effect of peripheral nerve field stimulation as add-on therapy to spinal cord stimulation to treat low back pain in failed back surgery syndrome patients: A 12-month follow-up of a randomized controlled study. *Neuromodulation*. 2019;22(8):970–977. doi: 10.1111/ner.12776
33. Schu S, Slotty PJ, Bara G, et al. A prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study to examine the effectiveness of burst spinal cord stimulation patterns for the treatment of failed back surgery syndrome. *Neuromodulation*. 2014;17(5):443–450. doi: 10.1111/ner.12197
34. Liem L, Russo M, Huygen FJ, et al. A multicenter, prospective trial to assess the safety and performance of the spinal modulation dorsal root ganglion neurostimulator system in the treatment of chronic pain. *Neuromodulation*. 2013;16(5):471–482; discussion 482. doi: 10.1111/ner.12072
35. Morales A, Yong RJ, Kaye AD, Urman RD. Spinal cord stimulation: comparing traditional low-frequency tonic waveforms to novel high frequency and burst stimulation for the treatment of chronic low back pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2019;23(4):25. doi: 10.1007/s11916-019-0763-3
36. Deer TR, Falowski SM, Moore GA, et al. Passive recharge burst spinal cord stimulation provides sustainable improvements in pain and psychosocial function: 2-year Results From the TRIUMPH Study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2022;47(7):548–556. doi: 10.1097/BRS.0000000000004283
37. Siu R, Brown EH, Mesbah S, et al. Novel noninvasive spinal neuromodulation strategy facilitates recovery of stepping after motor complete paraplegia. *J Clin Med*. 2022;11(13):3670. doi: 10.3390/jcm11133670
38. Gill ML, Grahn PJ, Calvert JS, et al. Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia. *Nat Med*. 2018;24(11):1677–1682. doi: 10.1038/s41591-018-0175-7
39. Kinfe TM, Asif M, Chakravarthy KV, et al. Unilateral L4-dorsal root ganglion stimulation evokes pain relief in chronic neuropathic postsurgical knee pain and changes of inflammatory markers: part II whole transcriptome profiling. *J Transl Med*. 2019;17(1):205. doi: 10.1186/s12967-019-1952-x
40. Peng MS, Wang R, Wang YZ, et al. Efficacy of therapeutic aquatic exercise vs physical therapy modalities for patients with chronic low back pain: a randomized clinical trial. *JAMA Netw Open*. 2022;5(1):e2142069. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.42069

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Солх Мохаммед Ахмед Али, аспирант;
адрес: Россия, 414000, Астрахань, ул. Бакинская, д. 121;
e-mail: solhmohammed02@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4122-5113>

Соавторы:

Белопасов Владимир Викторович, д.м.н., профессор;
e-mail: belopasov@yandex.ru; eLibrary SPIN: 6098-1321;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0458-0703>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Solh Mohammed Ahmed Ali, Graduate Student;
address: 121 Bakinskaya street, 414000 Astrakhan, Russia;
e-mail: solhmohammed02@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4122-5113>

Co-authors:

Vladimir V. Belopasov, MD, PhD, Professor;
e-mail: belopasov@yandex.ru; eLibrary SPIN: 6098-1321;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0458-0703>

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ИНТЕРВЕНЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ТИПИЧНОГО ТРЕПЕТАНИЯ ПРЕДСЕРДИЙ

И.А. Булавина¹, И.А. Хамнагадаев^{2, 3}, И.И. Хамнагадаев⁴, М.Л. Коков⁵, А.В. Троицкий⁶, А.С. Зотов⁶, Л.С. Коков^{7, 8}, М.А. Школьников³

¹ Городская клиническая больница имени В.М. Буянова, Москва, Российская Федерация

² Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Российская Федерация

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

⁴ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Российская Федерация

⁵ Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва, Российская Федерация

⁶ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий, Москва, Российская Федерация

⁷ Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Российская Федерация

⁸ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

Особенности антикоагулянтной терапии после радиочастотной абляции кавотрикуспидального истмуса исследованы недостаточно, поэтому в рекомендациях по назначению антикоагулянтной терапии обычно не различают трепетание и фибрилляцию предсердий. В отличие от фибрилляции предсердий, эффективность интервенционного лечения типичного трепетания предсердий достигает 90%. Эта процедура может избавить пациента от длительного приема антикоагулянтной терапии в случае отсутствия рецидива типичного трепетания предсердий. При решении отменить антикоагулянтную терапию после успешной радиочастотной абляции кавотрикуспидального истмуса следует принимать во внимание вероятность потенциальной индукции фибрилляции предсердий у пациентов, которым проведено интервенционное лечение. Помимо шкалы CHA2DS2-VASc, характеризующей коморбидность пациента, важно учитывать эхокардиографические морфофункциональные критерии, позволяющие оценить риск развития фибрилляции предсердий. В настоящее время данный протокол не регламентирован в клинических рекомендациях. Анализ данных литературы и собственный опыт авторов позволяет сделать вывод, что оптимальным сроком отмены антикоагулянтной терапии является безрецидивный период в 3–4 мес после радиочастотной абляции кавотрикуспидального истмуса, поскольку именно на этом сроке можно объективизировать эффективность интервенционного лечения.

Ключевые слова: антикоагулянты; типичное трепетание предсердий; фибрилляция предсердий; радиочастотная абляция.

Для цитирования: Булавина И.А., Хамнагадаев И.А., Хамнагадаев И.И., Коков М.Л., Троицкий А.В., Зотов А.С., Коков Л.С., Школьников М.А. Антикоагулянтная терапия при интервенционном лечении типичного трепетания предсердий. Клиническая практика. 2023;14(1):101–107. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract112089>

Поступила 25.10.2022

Принята 17.01.2023

Опубликована 25.01.2023

Список сокращений

КТИ — кавотрикуспидальный истмус
РЧА — радиочастотная абляция

ТП — трепетание предсердий
ФП — фибрилляция предсердий

ANTICOAGULATION AFTER TYPICAL ATRIAL FLUTTER ABLATION

I.A. Bulavina¹, I.A. Khamnagadaev^{2, 3}, I.I. Khamnagadaev⁴, M.L. Kokov⁵, A.V. Troitskiy⁶,
A.S. Zotov⁶, L.S. Kokov^{7, 8}, M.A. Shkolnikova³

¹ Buyanov City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

² Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

³ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

⁴ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

⁵ Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

⁶ Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

⁷ Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation

⁸ Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russian Federation

The specifics of the anticoagulant therapy after radiofrequency ablation of the cavotricuspid isthmus have not been sufficiently studied, therefore, the recommendations for prescribing the anticoagulant therapy usually do not distinguish between atrial flutter and atrial fibrillation. In contrast to the case of atrial fibrillation, the effectiveness of the interventional treatment for typical atrial flutter reaches 90%. This procedure may save the patient from a long-term anticoagulant therapy in the absence of recurrence of typical atrial flutter. The decision to stop the anticoagulant therapy after successful radiofrequency ablation of the cavotricuspid isthmus should take into account the potential induction of atrial fibrillation in patients undergoing the interventional treatment. In addition to the CHA2DS2-VASc scale, which characterizes the patient's comorbidity, it is important to take into account the echocardiographic morphofunctional criteria to assess the risk of atrial fibrillation. Currently, this protocol is not regulated in the clinical guidelines. The analysis of the literature data and the authors' own experience allow us to conclude that the optimal time for stopping the anticoagulant therapy is a relapse-free period of 3–4 months after the radiofrequency ablation of the cavotricuspid isthmus, since it is at this time that the effectiveness of the interventional treatment can be objectified.

Keywords: anticoagulants; typical atrial flutter; atrial fibrillation; radiofrequency ablation.

For citation: Bulavina IA, Khamnagadaev IA, Khamnagadaev II, Kokov ML, Troitskiy AV, Zotov AS, Kokov LS, Shkolnikova MA. Anticoagulation after Typical Atrial Flutter Ablation. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):101–107. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract112089>

Submitted 25.10.2022

Revised 17.01.2023

Published 25.01.2023

ВВЕДЕНИЕ

Типичное трепетание предсердий (ТП) является наиболее распространенным нарушением ритма сердца в реальной клинической практике врачей кардиологов и сердечно-сосудистых хирургов. Ежегодно в мире выявляется более 200 000 новых случаев типичного ТП. По данным эпидемиологических исследований, распространенность типичного ТП в США составляет 88 случаев на 100 000 населения [1]. Частота встречаемости данной аритмии в 2,5 раза выше у больных мужского пола и увеличивается с возрастом. В возрастной группе до 50 лет встречаемость типичного ТП достигает 5 случаев, а в возрастной группе старше 80 лет — до 587 случаев на 100 000 населения [1]. Истинную частоту встречаемости данной патологии в Российской Фе-

дерации установить крайне затруднительно из-за особенностей кодирования законченных случаев [2].

Наличие длительной тахисистолии у пациентов с типичным ТП приводит к нарушению систоло-диастолической функции сердца и сопровождается расширением его полостей, увеличивая, как следствие, вероятность развития кардиогенных тромбоэмболий. Ежегодно в нашей стране регистрируется более 450 000 новых случаев инсульта, при этом смертность от него в России, в отличие от США, Японии и стран Западной Европы, не снижается. Так, в Российской Федерации заболеваемость инсультом и смертность от него остаются одними из высоких в мире [3].

Первой линией лечения типичного ТП является радиочастотная абляция (РЧА) кавотрикуспидаль-

ного истмуса (КТИ), при этом клинические решения по тактике антикоагулянтной терапии после успешно проведенной процедуры основаны на оценке риска инсульта и кардиогенных тромбоэмболических осложнений по шкале CHA2DS2-VASc, разработанной для больных с фибрилляцией предсердий (ФП). Важно отметить, что данный подход не учитывает потенциальную эффективность интервенционного вмешательства у больных типичным ТП. Оптимальная стратегия антикоагулянтной терапии при интервенционном лечении типичного ТП однозначно не определена, в связи с чем клиницист всегда встает перед выбором: отменять или продолжать антикоагулянтную терапию после успешной РЧА КТИ, учитывая ее высокую, достигающую 90% эффективность [4].

Учитывая отсутствие клинических рекомендаций по этому вопросу, целью данного обзора является освещение современных тенденций, позволяющих клиницисту принять решение об отмене антикоагулянтной терапии после успешной РЧА КТИ.

ВОПРОСЫ ТЕРМИНОЛОГИИ И КЛАССИФИКАЦИИ

Ж.А. McWilliam в работе «Фибрилляция сердца» (1886 г.) [5], описывая результаты своих опытов на животных, впервые показал возможность предсердий быстро и ритмично сокращаться в ответ на стимуляцию, отмечая при этом различия в частоте активации предсердий и активации желудочков. Так автор впервые ввел термин «трепетание предсердий». Дальнейшее развитие этих исследований связано с именами английских ученых W. Jolly и W. Ritchie [6], которые в клинической практике зарегистрировали ТП и дифференцировали данные нарушения от ФП, сумев обосновать необходимость их оценки во II и III стандартных отведениях. В настоящее время эти волны принято называть волнами типичного истмусзависимого трепетания предсердий (рис. 1).

Дальнейшее изучение электрофизиологического субстрата ТП привело к появлению различных

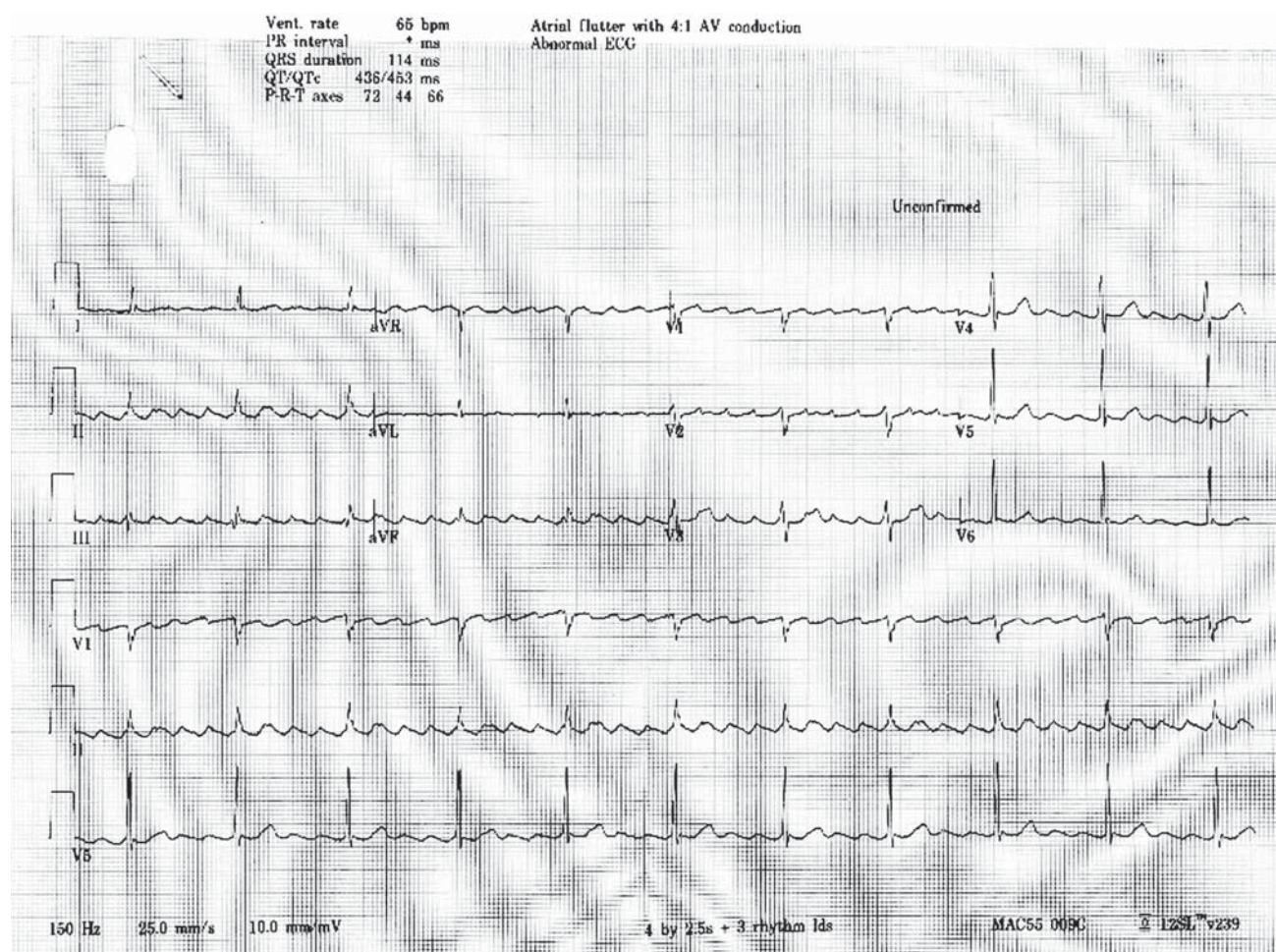


Рис. 1. Электрокардиограмма (25 мм/с). Типичное трепетание предсердий. FF-волны отчетливо видны в отведениях II, III и aVF. Цикл тахикардии — 240 мс (FF), коэффициент проведения ритма на желудочки — 3:1.

Fig. 1. Electrocardiogram (25 mm/s). Typical atrial flutter. FF-waves are clearly seen in leads II, III and aVF. Tachycardia cycle length — 240 ms (FF), 3:1 conduction.

классификаций данного нарушения ритма сердца. В 1979 г. J.L. Wells и соавт. [7] классифицировали ТП, разделив их на два типа в зависимости от возможности купирования сверхчастой стимуляцией и частоты активации предсердий. Так, было отмечено, что ТП I типа чаще удается купировать сверхчастой стимуляцией в сравнении с ТП II типа. Авторы отметили также, что цикл тахикардии при ТП I типа длиннее, чем при ТП II типа.

Последующее изучение электрофизиологии сердца при ТП позволило, с одной стороны, установить критическую зону тахикардии при типичном ТП, с другой — доказать возможность хирургического лечения типичного ТП путем РЧА КТИ [8]. Таким образом, в отличие от ФП, при типичном ТП найден четкий анатомический субстрат, при воздействии на который радиочастотной энергией можно добиться купирования тахикардии и стойкого удержания синусового ритма в отдаленном периоде [9, 10].

ПРИЧИНЫ РАЗВИТИЯ КАРДИОГЕННЫХ ТРОМБОЭМБОЛИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ТИПИЧНЫМ ТРЕПЕТАНИЕМ ПРЕДСЕРДИЙ

Чаще всего ТП встречается у людей со структурной патологией сердца [1]. ТП может диагностироваться также у пациентов с заболеваниями щитовидной железы, легких, воспалительными заболеваниями соединительной ткани, поражающими сердечно-сосудистую систему, в том числе у лиц со стенозом митрального клапана [11]. Угроза ТП состоит в значительном риске тромбоэмболий у данной категории пациентов. В связи с этим особое внимание уделяется антикоагулянтной терапии при типичном ТП [12]. Тромбоз ушка левого предсердия у пациентов с изолированным типичным ТП фиксируется в 1–11% случаев [11, 13], при этом частота патологии коррелирует с возрастом и чаще выявляется у больных с нарушением систолической функции левого желудочка [4].

Несмотря на то, что лечению типичного ТП посвящено значительное количество работ, вопросы антикоагулянтной терапии у пациентов с типичным ТП остаются нерешенными. Так, в настоящее время при длительности пароксизма типичного ТП более 48 ч рекомендован прием антикоагулянтной терапии в течение 4 недель перед восстановлением синусового ритма, однако рандомизированные исследования, рассматривающие целесообразность такой терапии, в настоящее время отсутствуют,

поэтому лечение проводится по аналогии с ФП, несмотря на принципиальные отличия электрофизиологического механизма этих нарушений ритма сердца [13]. Выбор оптимальной стратегии антикоагулянтной терапии при интервенционном лечении типичного ТП является ключевым моментом для этой группы пациентов [14].

Таким образом, развитие кардиогенных тромбоэмболий у пациентов с типичным ТП обусловлено как электрофизиологическим механизмом аритмии, так и коморбидностью, что следует учитывать при решении вопроса об отмене или продолжении антикоагулянтной терапии после успешной РЧА КТИ.

ПЕРИОПЕРАЦИОННЫЙ РЕЖИМ ПРИЕМА АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ИНТЕРВЕНЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ТИПИЧНОГО ТРЕПЕТАНИЯ ПРЕДСЕРДИЙ

Существуют две стратегии режима антикоагулянтной терапии после выполнения РЧА КТИ:

- 1) продолжение постоянного приема антикоагулянтной терапии;
- 2) отмена антикоагулянтной терапии после успешной РЧА КТИ.

Вопрос об отмене антикоагулянтной терапии после успешного интервенционного лечения типичного ТП в настоящее время остается дискуссионным. Решение базируется на рекомендациях по лечению ФП и обусловлено неоднозначностью результатов отмены постоянного приема антикоагулянтов [15–19], при этом информации о безопасности отмены пероральных антикоагулянтов после интервенционного лечения ТП в настоящее время недостаточно. Подходы к назначению антикоагулянтов лицам, перенесшим РЧА в левых отделах сердца по поводу атипичного ТП или ФП, в настоящее время применяются и для лечения больных после интервенционного лечения типичного ТП. Важно отметить, что для проведения РЧА КТИ используется венозный доступ, отсутствует необходимость транссептальной пункции и катетеризации левых отделов сердца, как при лечении атипичного ТП и ФП, в связи с чем риски тромбоэмболии и кровотечения при выполнении РЧА КТИ ниже, чем при интервенционном лечении ФП [20].

При наличии персистирующего типичного ТП у пациента, не принимающего пероральные антикоагулянты и которому планируется проведение интервенционного лечения, необходимо назначить

их не позднее чем за 3 недели до операции [21]. Противопоказанием к оперативному вмешательству может являться тромбоз левых отделов сердца, поэтому перед хирургическим этапом следует рассмотреть возможность проведения трансэзофагеальной эхокардиографии, как и при лечении ФП [22]. При этом важно учитывать, что электрофизиологический механизм данных аритмий отличается принципиально, а значит, нельзя установить тождество между данными заболеваниями, в том числе в части показаний к проведению антикоагулянтной терапии. Так, по данным метаанализа A. Nunes-Ferreira и соавт. [23], риск развития кардиогенных эмболий после РЧА КТИ не зависит от выбора режима антикоагулянтной терапии. Важным результатом данного исследования является доказательство, что прием антикоагулянтной терапии характеризуется более благоприятным профилем безопасности с аналогичным риском кровотечения и более низкой смертностью от всех причин по сравнению с пациентами, не получавшими антикоагулянты после операции [23].

Причиной отмены антикоагулянтной терапии чаще всего является снижение риска кровотечения [24–26]. Так, по данным B.M. Alqam и соавт. [26], прекращение приема антикоагулянтов после успешной РЧА КТИ существенно снижает риски жизнеугрожающих кровотечений, что коррелирует с аналогичными работами, посвященными интервенционному лечению ФП [24–26]. Одной из возможных причин продолжения антикоагулянтной терапии является риск возникновения ФП. В частности, в работе W. Maskoun и соавт. [27] до 50% пациентов без анамнестических указаний после операции имели риск развития ФП. В связи с этим важным аспектом, на который следует обращать внимание при отмене антикоагулянтной терапии после успешного интервенционного лечения типичного ТП, является оценка предикторов развития ФП, среди которых наиболее доступной в клинической практике является эхокардиографическая оценка морфофункционального состояния левого предсердия [28]. Так, в исследовании SUITA [29] было доказано, что увеличение переднезаднего размера левого предсердия ассоциировано с риском развития ФП. Аналогичные данные были получены в исследовании F.J. Olsen и соавт. [30], в котором было доказано, что эхокардиографическая оценка функции левого предсердия также позволяет установить предикторы возникновения ФП в общей популяции.

Сроки возможной отмены антикоагулянтной терапии после успешной РЧА КТИ, по данным разных исследователей, варьируют от 1 до 13 месяцев, при этом чаще отмена антикоагулянтной терапии проводится в интервале 3–4 месяцев после операции, что обусловлено окончанием так называемого слепого периода, необходимого для формирования гомогенной зоны повреждения в области КТИ [23, 31]. В случае отказа пациента от дальнейшего приема антикоагулянтной терапии целесообразно выполнять длительное (в течение нескольких суток) мониторирование электрокардиограммы с целью исключения ФП или рецидива ТП ввиду отсутствия клинических проявлений [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После успешной РЧА КТИ при типичном ТП возможны следующие стратегии режима проведения антикоагулянтной терапии: продолжение постоянного приема антикоагулянтной терапии или ее отмена спустя 3–4 месяца после интервенционного лечения. При решении об отмене антикоагулянтной терапии следует принимать во внимание не только стратификацию риска кардиогенных тромбоэмболий по шкале CHA₂DS₂-VASc, но и учитывать вероятность индукции ФП в послеоперационном периоде, опираясь, в том числе, на эхокардиографические характеристики морфофункционального состояния левого предсердия. Данный аспект важен ввиду значительного влияния принимаемых решений на качество жизни и риска инвалидизации пациентов вследствие развития кардиогенных тромбоэмболий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. А.С. Зотов — обработка и обсуждение результатов исследования; И.И. Хамнагадаев, М.Л. Коков, И.А. Булавина, Л.С. Коков, М.А. Школьников, И.А. Хамнагадаев — поисково-аналитическая работа, написание текста статьи; А.В. Троицкий — обсуждение результатов исследования, редактирование. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. A.S. Zotov — processing and discussion of the results of the study, manuscript writing; I.I. Khamnagadaev, M.L. Kokov, I.A. Bulavina, L.S. Kokov, M.A. Shkolnikova, I.A. Khamnagadaev —

search and analytical work, processing and discussion of the results of the study; A.V. Troitsky — discussion of the results of the study, manuscript editing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи финансируются из бюджета Федерального научно-клинического центра специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России.

Funding source. The study was funded by Federal Scientific and Clinical Centre of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Biomedical Agency.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Granada J, Uribe W, Chyou PH, et al. Incidence and predictors of atrial flutter in the general population. *J Am College Cardiol.* 2000;36(7):2242–2246. doi: 10.1016/s0735-1097(00)00982-7
- Колбин А.С., Татарский Б.А., Бисерова И.Н., и др. Социально-экономическое бремя мерцательной аритмии в Российской Федерации // Клиническая фармакология и терапия. 2010. Т. 19, № 4. С. 17–22. [Kolbin AS, Tatarsky BA, Biserova IN, et al. Socio-economic burden of atrial fibrillation in the Russian Federation. *Clinical pharmacology and therapy.* 2010;19(4): 17–22. (In Russ).]
- Прокаева Т.А., Жигаев Г.Ф., Прокаев Е.М., и др. Медико-экономическая оценка оказания стационарной помощи при мозговом инсульте // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2015. Т. 2, № 102. С. 122–125. [Prokaeva TA, Zhigaev GF, Prokaev EM, et al. Medico-economic assessment of inpatient care for cerebral stroke. *Bulletin East Siberian Scientific Center Siberian Branch Russian Academy Medical Sciences.* 2015;2(102):122–125. (In Russ).]
- Expósito V, Rodríguez-Entem F, González-Enríquez S, et al. Stroke and systemic embolism after successful ablation of typical atrial flutter. *Clin Cardiol.* 2016;39:347–351. doi: 10.1002/clc.22538
- McWilliam JA. Fibrillar contraction of the heart. *J Physiology.* 1887;8(5):296–310. doi: 10.1113/jphysiol.1887.sp000261
- Jolly WA, Ritchie WT. Auricular flutter and fibrillation. *Heart.* 1911;2:177–221.
- Wells JL, MacLean WA, James TN, et al. Characterization of atrial flutter. Studies in man after open heart surgery using fixed atrial electrodes. *Circulation.* 1979;60(3):665–673. doi: 10.1161/01.cir.60.3.665
- Scheinman MM, Cheng J, Yang Y. Mechanisms and clinical implications of atypical atrial flutter. *J Cardiovascular Electrophysiol.* 1999;10(8):1153–1157. doi: 10.1111/j.1540-8167.1999.tb00288
- Shah SR, Luu SW, Calestino M, et al. Management of atrial fibrillation-flutter: Uptodate guideline paper on the current evidence. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2018; 8(5):269–275. doi: 10.1080/20009666.2018.1514932
- Gula LJ, Redfearn DP, Jenkyn KB, et al. Elevated incidence of atrial fibrillation and stroke in patients with atrial flutter: A population-based study. *Can J Cardiol.* 2018;34(6):774–783. doi: 10.1016/j.cjca.2018.01.001
- Attanasio P, Budde T, Lacour P, et al. Catheter ablation of atrial flutter: A survey focusing on post ablation oral anticoagulation management and ECG monitoring. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2017;40(7):788–793. doi: 10.1111/pace.13122
- Krisai P, Roten L, Zeljkovic I, et al. Prospective evaluation of a standardized screening for atrial fibrillation after ablation of cavotricuspid isthmus dependent atrial flutter. *J Clin Med.* 2021;10(19):4453. doi: 10.3390/jcm10194453
- Escobar C, Castrejón S, de Oca RM, et al. Common atrial flutter catheter ablation without discontinuing oral anticoagulation. *Future Cardiol.* 2017;13(5):429–432. doi: 10.2217/fca-2017-0007
- Ревшвили А.Ш., Рзаев Ф.Г., Горев М.В., и др. Диагностика и лечение фибрилляции предсердий. Клинические рекомендации. Москва, 2017. 211 с. [Revishvili AS, Rzaev FG, Gorev MV, et al. Diagnosis and treatment of atrial fibrillation. Clinical recommendations. Moscow; 2017. 211 p. (In Russ).]
- Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). The task force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2021;42(5):373–498. doi: 10.1093/eurheartj/ehab648
- Verma A, Ha AC, Kirchhof P, et al. The optimal anti-coagulation for enhanced-risk patients post-catheter ablation for atrial fibrillation (OCEAN) trial. *Am Heart J.* 2018;197:124–132. doi: 10.1016/j.ahj.2017.12.007
- Romero J, Cerrud-Rodriguez RC, Diaz JC, et al. Oral anti-coagulation after catheter ablation of atrial fibrillation and the associated risk of thromboembolic events and intracranial hemorrhage: A systematic review and meta-analysis. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2019;30(8):1250–1257. doi: 10.1111/jce.14052
- Själänder S, Holmqvist F, Smith JG, et al. Assessment of use vs discontinuation of oral anticoagulation after pulmonary vein isolation in patients with atrial fibrillation. *JAMA Cardiol.* 2017; 2(2):146–152. doi: 10.1001/jamacardio.2016.4179
- Proietti R, Al-Turki A, Di Biase L, et al. Anticoagulation after catheter ablation of atrial fibrillation: an unnecessary evil? A systematic review and meta-analysis. *J Cardiovascular Electrophysiology.* 2019;30(4):468–478. doi: 10.1111/jce.13822
- Warchol CI, Bińkowski BJ, Kucejko T, et al. A retrospective study of atrial fibrillation following cavotricuspid isthmus ablation for atrial flutter. *Med Sci Monit.* 2019;25:3316. doi: 10.12659/MSM.912918
- Calkins H, Hindricks G, Cappato R, et al. HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2017; 14(10):275–444. doi: 10.1016/j.hrthm.2017.05.012
- Голицын С.П., Панченко Е.П., Кропачева Е.С., и др. Евразийские клинические рекомендации по диагностике и лечению фибрилляции предсердий. 2020. [Golitsyn SP, Panchenko EP, Kropacheva ES, et al. Eurasian Clinical Guidelines for the diagnosis and treatment of atrial fibrillation. 2020. (In Russ).]
- Nunes-Ferreira A, Alves M, Lima da Silva G, et al. Anticoagulation after typical atrial flutter ablation: Systematic review and meta-analysis. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2021;44(10): 1701–1710. doi: 10.1111/pace.14342
- Calkins H, Willems S, Gerstenfeld EP, et al. Uninterrupted dabigatran versus warfarin for ablation in atrial fibrillation. *New Eng J Med.* 2017;376(17):1627–1636. doi: 10.1056/NEJMc1707247
- Celikyurt U, Knecht S, Kuehne M, et al. Incidence of new-onset atrial fibrillation after cavotricuspid isthmus ablation

- for atrial flutter. *Ep Europace*. 2017;19(11):1776–1780. doi: 10.1093/europace/euw343
26. Alqam BM, von Edwins KN, Devabhaktuni S, et al. Oral anticoagulation discontinuation following catheter ablation of typical atrial flutter. *J Innov Card Rhythm Manag*. 2021;12(7):4595. doi: 10.19102/icrm.2021.120703
 27. Maskoun W, Pino MI, Ayoub K, et al. Incidence of atrial brillation after atrial utter ablation. *JACC Clin Electrophysiol*. 2016;2(6):682–690. doi: 10.1016/j.jacep.2016.03.014
 28. Jin MN, Song C, Kim TH, et al. CHA2DS2-VASCs core in the prediction of ischemic stroke in patients after radiofrequency catheter ablation of typical atrial flutter. *Yonsei Med J*. 2018; 59:236–242. doi: 10.3349/ymj.2018.59.2.236
 29. Higashiyama A, Kokubo Y, Watanabe M, et al. Echocardiographic parameters and the risk of incident atrial fibrillation: The SUITA study. *J Epidemiol*. 2020;30(4):183–187. doi: 10.2188/jea.JE20180251
 30. Olsen FJ, Møgelvang R, Jensen GB, et al. Relationship between left atrial functional measures and incident atrial fibrillation in the general population: The Copenhagen City Heart Study. *Cardiovascul Imaging*. 2019;12(6):981–989. doi: 10.1016/j.jcmg.2017.12.016
 31. Giehm-Reese M, Johansen MN, Kronborg MB, et al. Discontinuation of oral anticoagulation and risk of stroke and death after ablation for typical atrial flutter: A nation-wide Danish cohort study. *Int J Cardiol*. 2021;333:110–116. doi: 10.1016/j.ijcard.2021.02.057

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Зотов Александр Сергеевич, к.м.н.;

адрес: Россия, 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28;
e-mail: zotov.alex.az@gmail.com; eLibrary SPIN: 9315-6570;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0494-0211>

Соавторы:

Булавина Ирина Андреевна;

e-mail: doctoroirb@yandex.ru; eLibrary SPIN: 1275-2773;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6267-3724>

Хамнагадаев Игорь Алексеевич, к.м.н.;

e-mail: i@khamnagadaev.ru; eLibrary SPIN: 6338-4990;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9247-4523>

Хамнагадаев Игорь Иосифович, д.м.н., профессор;

e-mail: khamnaga@yandex.ru; eLibrary SPIN: 6883-5175;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8541-0364>

Коков Михаил Леонидович;

e-mail: mikhailkokov@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4766-5213>

Троицкий Александр Витальевич, д.м.н.;

e-mail: dr.troitskiy@gmail.com; eLibrary SPIN: 2670-6662;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2143-8696>

Коков Леонид Сергеевич, д.м.н., профессор,

академик РАН;
e-mail: lskokov@mail.ru; eLibrary SPIN: 1655-5794;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3167-3692>

Школьников Мария Александровна, д.м.н., профессор;

e-mail: Arrhythmolog@gmail.com; eLibrary SPIN: 9051-7107;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7115-0186>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Aleksandr S. Zotov, MD, PhD;

address: 28 Orekhovy boulevard, 115682 Moscow, Russia;
e-mail: zotov.alex.az@gmail.com; eLibrary SPIN: 9315-6570;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0494-0211>

Co-authors:

Irina A. Bulavina;

e-mail: doctoroirb@yandex.ru; eLibrary SPIN: 1275-2773;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6267-3724>

Igor A. Khamnagadaev, MD, PhD;

e-mail: i@khamnagadaev.ru; eLibrary SPIN: 6338-4990;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9247-4523>

Igor I. Khamnagadaev, MD, PhD, Professor;

e-mail: khamnaga@yandex.ru; eLibrary SPIN: 6883-5175;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8541-0364>

Mikhail L. Kokov;

e-mail: mikhailkokov@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4766-5213>

Aleksandr V. Troitskiy, MD, PhD;

e-mail: dr.troitskiy@gmail.com; eLibrary SPIN: 2670-6662;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2143-8696>

Leonid S. Kokov, MD, PhD, Professor,

Academician of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: lskokov@mail.ru; eLibrary SPIN: 1655-5794;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3167-3692>

Maria A. Shkolnikova, MD, PhD, Professor;

e-mail: Arrhythmolog@gmail.com; eLibrary SPIN: 9051-7107;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7115-0186>

ВОЗМОЖНОСТИ АДАПТАЦИИ ПРОТОКОЛА ПОВТОРНОЙ ОБРАБОТКИ В ПРАКТИКЕ ПАП-ТЕСТА THINPREP

А.К. Аксаментов¹, Н.В. Мельникова^{1, 2}, Е.В. Мошнина¹, Н.А. Колышкина¹, О.В. Кучерова³, В.П. Баклаушев^{1, 4, 5}

¹ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий, Москва, Российская Федерация

² Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Российская Федерация

³ Городская клиническая больница им. В.В. Виноградова, Москва, Российская Федерация

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Российская Федерация

⁵ Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва, Российская Федерация

Жидкостная цитология является более современным диагностическим методом по сравнению с традиционным цитологическим исследованием соскобов шейки матки, позволяющим стандартизировать морфологическое исследование и уменьшить количество неинформативных образцов. Одним из факторов, определяющих адекватность Пап-теста, является количество клеток плоского эпителия в стеклопрепарате. Обилие элементов крови, слизи, лубриканта или элементов воспаления также может повлиять на информативность образца. В практике Пап-теста ThinPrep в случае получения неадекватного стеклопрепарата применяется протокол повторной обработки содержимого вials, чтобы нивелировать возможное влияние подобных примесей на конечный результат. Данная работа содержит обзор методов применения протокола повторной обработки и собственный опыт адаптации протокола в практике клинико-диагностической лаборатории.

Ключевые слова: Пап-тест; жидкостная цитология; ThinPrep.

Для цитирования: Аксаментов А.К., Мельникова Н.В., Мошнина Е.В., Колышкина Н.А., Кучерова О.В., Баклаушев В.П. Возможности адаптации протокола повторной обработки в практике Пап-теста ThinPrep. Клиническая практика. 2023;14(1):108–114. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract114717>

Поступила 19.11.2022

Принята 20.12.2022

Опубликована 09.02.2023

ВВЕДЕНИЕ

В России злокачественные новообразования шейки матки в 2020 году были выявлены у 15 500 женщин (19,75 на 100 тыс. населения), при этом рак шейки матки в стадии *in situ* диагностирован только в 4781 (30,8%) случае. Показатель заболеваемости раком шейки матки в 2020 году в Российской Федерации находился на пятом месте среди всех злокачественных новообразований у женщин (5,2%). Рак шейки матки в группе женщин 30–39 лет являлся самой частой причиной смерти (21,3%) [1].

В настоящее время, согласно клиническим рекомендациям, для выявления предраковых поражений и рака шейки матки следует придерживаться стратегии котестирования, при которой выполняются цитологическое исследование и тестирование на вирус папилломы человека (ВПЧ) [2]. Цитологическое исследование может выполняться традиционным методом и методом жидкостной цитологии, при использовании которого уменьшается процент некачественных мазков и существенно возрастает

точность диагностики [3–5]. Основным критерием признания образца адекватным является соблюдение условий минимального количества хорошо сохранившихся клеток плоского эпителия. Минимальное количество клеток для жидкостной цитологии — 5000, для традиционной — от 8000 до 12 000, при этом порог может быть снижен до 2000 клеток, если пациентка находится в постменопаузе, либо исследование проводится после лучевой или химиотерапии [6]. Обилие крови, слизи, лубриканта или элементов воспаления может негативно повлиять на количество клеток в стеклопрепарате.

В практике Пап-теста ThinPrep доступна дополнительная повторная обработка содержимого вials, если поступивший в лабораторию образец при первичной оценке признан неадекватным. Важное значение уделяется оптимизации протокола повторной обработки, позволяющего уменьшить долю неадекватных образцов [7–9].

Цель работы — описать возможности применения протокола повторной обработки для образцов,

THE POSSIBILITIES OF ADAPTING THE RE-PROCESSING PROTOCOL IN THE PRACTICE OF THE THINPREP PAP TEST USAGE

A.K. Aksamentov¹, N.V. Melnikova^{1, 2}, E.V. Moshnina¹, N.A. Kolyshkina¹, O.V. Kucheroва³, V.P. Baklaushev^{1, 4, 5}

¹ Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

² Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russian Federation

³ City Clinical Hospital named after V.V. Vinogradov, Moscow, Russian Federation

⁴ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

⁵ Pulmonology Scientific Research Institute, Moscow, Russian Federation

The method of liquid cytology is a newer diagnostic test compared to the traditional cytological examination of scrapings from the cervix and allows one to standardize the morphological examination and reduce the number of unsatisfactory samples. One of the factors determining the adequacy of the Pap test is the number of squamous epithelial cells in a sample. The abundance of blood elements, mucus, lubricant, or inflammatory elements may affect the informativeness of the sample. In the practice of the ThinPrep Pap test usage, when receiving an inadequate sample, a protocol for re-processing the contents of the vial is used, in order to neutralize the possible influence of such impurities on the final result. Here, we present a review on the methods of the re-processing protocol application and our own experience of adapting the protocol in the practice of a clinical diagnostic laboratory.

Keywords: Pap-test; liquid-based cytology; ThinPrep.

For citation: Aksamentov AK, Melnikova NV, Moshnina EV, Kolyshkina NA, Kucheroва ON, Baklaushev VP. The Possibilities of Adapting the Re-processing Protocol in the Practice of the ThinPrep Pap Test Usage. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):108–114. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract114717>

Submitted 19.11.2022

Revised 20.12.2022

Published 09.02.2023

признанных неадекватными при первичной оценке, и способ адаптации протокола в условиях лаборатории клинического центра.

АДАПТАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТОКОЛА ПОВТОРНОЙ ОБРАБОТКИ

Скудная клеточность препарата на чистом фоне как фактор признания образца неадекватным может быть обусловлена биологическими особенностями образца (например, постлучевые изменения эпителия, атрофия слизистой оболочки), а также несоблюдением стандартных операционных процедур по взятию материала. В случае Пап-теста ThinPrep субоптимальное количество плоскоэпителиальных клеток вследствие примеси крови как конкурирующего агента на фильтре при мембранной фильтрации можно повысить повторным приготовлением стеклопрепарата с предварительной обработкой материала согласно протоколу повторной обработки с внесением смеси растворов Cytolyt и ледяной уксусной кислоты. В работе Т. Kalinicheva и соавт. [8] показано, что из 61 образца, приготовленных методом ThinPrep, признанных

неадекватными из-за обилия крови, в 44% случаев удалось добиться увеличения клеточности образца после применения протокола повторной обработки. Исследование М. Rosa и соавт. [9] показало, что протокол повторной обработки способен сделать адекватными образцы ThinPrep с обилием крови в 56,2% случаев (36 образцов из 64, признанных неадекватными). Помимо этого, авторы сообщают, что образцы, признанные неадекватными вследствие гало-эффекта либо «пятнистости», что в свою очередь также может быть обусловлено обилием крови, могут быть признаны адекватными после повторной обработки в 90,9% случаев.

Одним из факторов признания образца неадекватным может быть загрязнение лубрикантом при взятии материала. Исследователи сообщают о достаточно низком проценте образцов (16,6%), признанных адекватными после проведения протокола повторной обработки (16 образцов из 96, признанных неадекватными). Т. Kalinicheva и соавт. [8] сообщают об улучшении клеточности 56% образцов, признанных неадекватными вследствие обилия лубриканта, однако в другой работе этот фактор

вообще не встречается в выборке неадекватных образцов [10].

В литературе описано несколько способов приготовления раствора для отмычки образцов. Так, в исследовании М. Rosa и соавт. [9] образцы, признанные неадекватными из-за обилия крови, обрабатывались с применением протокола, предложенного производителем. Раствор Cytolyt смешивали с ледяной уксусной кислотой в пропорции 9/1, затем 30 мл полученного раствора смешивали с образцом, центрифугировали при 1200 g и сливали надосадочную жидкость, затем добавляли PreservCyt, размешивали и обрабатывали образец, как обычно. Образцы, признанные неадекватными вследствие большого количества элементов воспаления, бактерий, лубриканта или слизи, обрабатывали путем добавления 1 мл образца к 20 мл раствора PreservCyt с последующим центрифугированием и загрузкой в процессор.

Т. Kalinicheva и соавт. [8] использовали один и тот же протокол отмычки для всех образцов. Они центрифугировали образцы, признанные неадекватными, при 2250 g, сливали надосадочную жидкость, добавляли 20 мл раствора PreservCyt, затем повторяли те же действия еще 2 раза. Возможно, меньший процент образцов с увеличением клеточности после повторной обработки в данном исследовании можно объяснить отсутствием ледяной уксусной кислоты.

В нашей лаборатории основной причиной неадекватности образцов является затененность более 75% клеток кровью либо низкая клеточность из-за забивания фильтра при приготовлении стеклопрепарата элементами крови и слизи (рис. 1). Было принято решение отмыкать образцы с большой примесью крови согласно протоколу повторной обработки, основываясь на визуальной оценке жидкости в вials в соответствии со шкалой при поступлении в лабораторию (рис. 2). Причиной превентивной обработки такого материала стала лучшая экономическая эффективность и меньшие затраты времени, так как для оценки удовлетворительности материала не требуется первичного приготовления стеклопрепарата.

Для приготовления стеклопрепаратов были использованы процессор ThinPrep 5000, центрифуга с ускорением 1200 g для пробирок объемом 10 мл, комплект красителей ThinPrep для окраски по Папаниколау, автоматический прибор для окраски препаратов «АФОМК-16-ПРО», 50% уксусная кислота. На основе оригинального протокола повторной обработки ThinPrep с ледяной уксусной кислотой был разработан протокол с применением 50% уксусной кислоты (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Приме-

довании можно объяснить отсутствием ледяной уксусной кислоты.

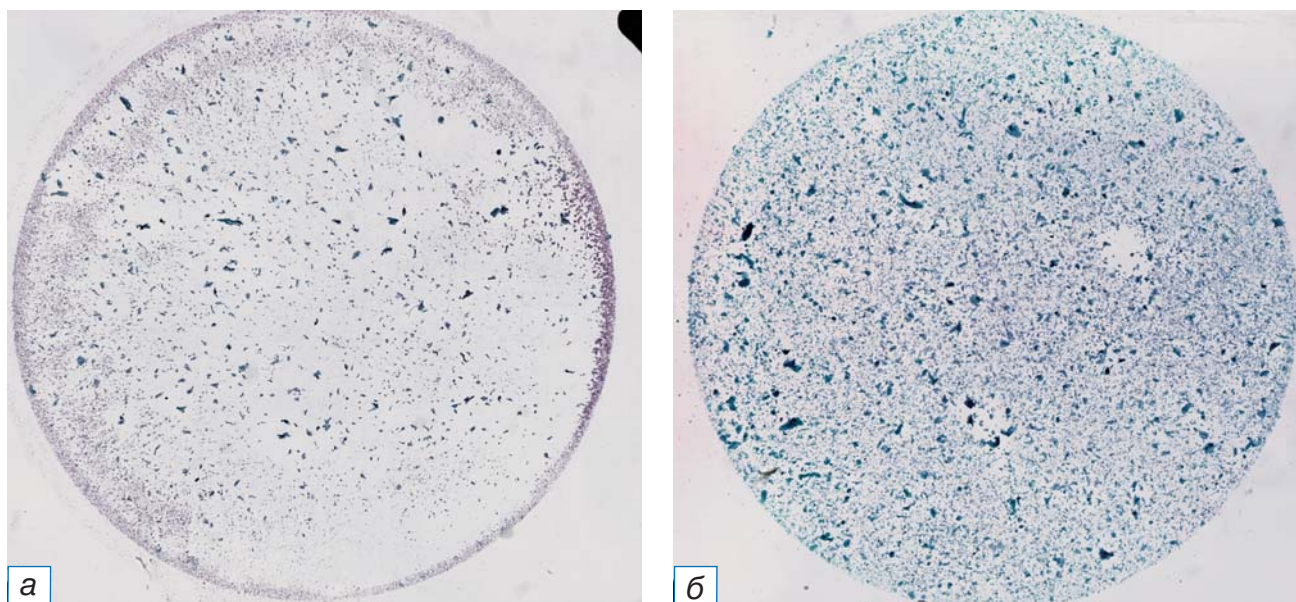
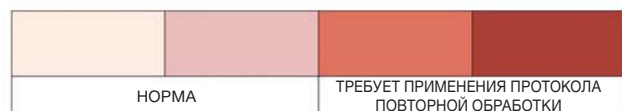


Рис. 1. Возможности протокола повторной обработки: а — готовый стеклопрепарат с эффектом ореола и малым количеством клеточных элементов; б — готовый препарат из того же материала после использования протокола повторной обработки (отсутствует эффект ореола, и количество хорошо визуализированных клеток позволяет признать препарат адекватным).

Fig. 1. Possibilities of the reprocessing protocol: а — a ready-made glass preparation with a halo effect and a small number of cellular elements; б — a ready-made preparation from the same material after using the reprocessing protocol (there is no halo effect, and the number of well-visualized cells allows one to accept the preparation as adequate).



а



б

Рис. 2. Примеры шкалы визуальной оценки (а) и образцов (б): образец слева готов для приготовления стеклопрепарата, образец справа требует дополнительной обработки перед приготовлением стеклопрепарата.

Fig. 2. Examples of the visual assessment scale (a) and samples (b): the sample on the left is ready for the preparation of the glass slide, the sample on the right requires additional processing before the preparation of the glass slide.

нение менее концентрированной уксусной кислоты было обосновано большей доступностью этого реактива на рынке отечественных производителей и отсутствием необходимости хранить в помещениях, специально приспособленных для огнеопасных веществ.

Согласно протоколу ThinPrep, необходимо приготовить раствор консервирующей жидкости CytoLyt и ледяной уксусной кислоты в соотношении 9/1. Мы использовали рабочий раствор CytoLyt и 50% уксусной кислоты в соотношении 5/1, что необходимо для сохранения баланса между эффективностью лизирования эритроцитов и визуальными изменениями клеток эпителия, которые отмечают некоторыми исследователями при применении уксусной кислоты в протоколах повторной обработки [9, 11, 12]. После внесения 30 мл рабочего раствора в вialу с материалом и перемешивания содержимое вialы разливали по 5 стандартным пробиркам (10 мл) и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 g. После центрифугирования и удаления надосадочной жидкости в каждую пробирку добавляли по 6 мл рабочего раствора, содержимое перемешивали и центрифугировали повторно.

После удаления надосадочной жидкости добавляли раствор PreservCyt, содержимое пробирок перемешивали, а затем переносили в вialу, образец обрабатывали на аппарате ThinPrep 5000.

Применение данного адаптированного протокола позволяет достичь нужного эффекта в отношении количества хорошо визуализированных клеток плоского эпителия и признать препарат адекватным (см. рис. 1).

МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОБРАЗЦОВ

В 1996 году для приготовления образцов методом жидкостной цитологии был предложен метод ThinPrep, запатентованный Hologic Inc. (Бедфорд, Массачусетс, США). Материал соскоба собирают и помещают в вialу с фиксирующей средой и отправляют в лабораторию для дальнейшей обработки. В лаборатории вialа помещается в цитологический процессор (например, ThinPrep 5000), где клетки осаждаются на мембране фильтра и отпечатываются на стекле. При этом такие факторы, как обилие крови, лубриканта или слизи, элементов воспаления или недостаточное количество плоскоклеточных элементов, ухудшают интерпретацию результата теста.

Наиболее важным компонентом обеспечения качества цитологического тестирования в соответствии с терминологической системой Bethesda является оценка адекватности образца. Считается, что низкая клеточность ставит под угрозу чувствительность цитологического тестирования при обнаружении плоскоклеточного поражения [6]. Основополагающее мультицентровое исследование Н.С. Kitchener и соавт. [13] показало минимальные необходимые критерии клеточности препарата, приготовленного методом жидкостной цитологии для двух основных систем, используемых в настоящее время. Так, количество хорошо визуализированных/сохранившихся клеток плоского эпителия, необходимых для того чтобы признать адекватным препарат, приготовленный методом SurePath, составляет 15 000, в то время как для метода ThinPrep это количество равно 5000. Минимальное допустимое количество клеток может зависеть от метода приготовления препарата либо вследствие того, что ThinPrep преимущественно обогащает препарат аномальными клетками, а SP истощает, либо вследствие того, что небольшое количество аномальных клеток труднее обнаружить в SP, чем в препаратах ThinPrep. Последнее вполне может иметь место, поскольку повышенная

плотность клеток плоского эпителия в препаратах SP (112 против 15,9 клеток/мм² для ThinPrep) затрудняет обнаружение редких аномальных клеток в обычных условиях скрининга [14]. Следует также отметить, что наличие элементов воспаления, лубриканта или слизи и обилия крови может оказать негативное влияние на общую эффективность иммуноцитохимического исследования коэкспрессии p16/Ki-67, применяемого для дифференциальной диагностики степени злокачественности поражения шейки матки.

В литературе сообщается, что количество препаратов, признанных неадекватными, меньше при приготовлении их методом жидкостной цитологии, чем при традиционном цитологическом методе [3, 4, 9, 10]. Так, например, в мультицентровом исследовании, проведенном в Корее на материале, полученном из различных больниц, диапазон распределения неадекватных образцов традиционной цитологии был в пределах от 0,1 до 11,2%, в то время как для препаратов, приготовленных методом ThinPrep, составлял от 0,1 до 4,4% [10]. В исследовании показана также значительная роль обилия элементов крови в качестве фактора скудной клеточности образца. Если для препаратов традиционной цитологии этот фактор составлял 4,5% от общего количества неадекватных образцов, то для жидкостной цитологии он возрастал до 14,9%, при этом скудная клеточность образца на чистом фоне составила 31,4 и 46,6% для традиционной и жидкостной цитологии соответственно. Необходимо отметить, что доля образцов, где элементы воспаления ухудшали просмотр препарата, вследствие чего образец признавался неадекватным, для традиционной цитологии составила 29,3%, в то время как для жидкостной цитологии — 10,1%.

Правила забора материала из шейки матки для цитологического исследования описаны в клинических рекомендациях и включают, в том числе, пункты об обязательном удалении слизистой пробки перед взятием мазка, о нежелательности взятия мазка при менструации, во время лечения генитальных инфекций, а также ранее 48 ч после расширенной кольпоскопии. Следование этим рекомендациям, несомненно, уменьшает процент неадекватных образцов и увеличивает эффективность исследования [2]. М. Rosa и соавт. [9] показали, что применение лубрикантов на основе карбополов при взятии материала являются основной причиной неадекватных образцов, и замена другими лубрикантами практически полностью решает

эту проблему. Несмотря на то, что проблему малоклеточных образцов вследствие обилия крови, наличия лубриканта или слизи, обилия элементов воспаления или бактерий в некоторых случаях можно решить проведением протокола повторной обработки, проблему малоклеточных образцов, полученных вследствие нарушения методики взятия образца либо атрофии слизистой оболочки, можно решить только повторным взятием материала. М. Rosa и соавт. [9] показали, что идентификация основных причин неадекватных образцов и встречи с гинекологами для обсуждения тактики взятия заметно уменьшают процент неадекватного материала. Так, если средняя доля неадекватных образцов в первые 7 месяцев года составляла 5,5%, то после выявления причин неадекватности и серии встреч с коллегами снизилась в последующие 5 месяцев в среднем до 1%.

Некоторые авторы отмечают визуальные изменения клеток после применения протокола повторной обработки на основе уксусной кислоты, что может повлиять на оценку материала специалистом [9, 11, 12]. Несколько работ оценивали влияние обработки образцов жидкостной цитологии протоколом повторной обработки с уксусной кислотой на последующее выявление ВПЧ в материале этих образцов. Так, Е. Munson и соавт. [15] определяли наличие ВПЧ тест-системой Cervista HPV HR в 465 образцах содержимого виал для жидкостной цитологии до и после повторной обработки в соответствии с протоколом ThinPrep. Результаты показали, что 21,9% положительных результатов, полученных до обработки, стали отрицательными после применения протокола повторной обработки. Эти образцы продемонстрировали снижение флуоресцентного сигнала на 53,6% для геномной ДНК и на 56,4% для ВПЧ-специфичной нуклеиновой кислоты. В свою очередь, на определение ВПЧ в материале аналогичных 236 виал тест-системой Aptima HPV применение протокола повторной обработки повлияло в меньшей степени: только 2,7% положительных образцов показали отрицательный результат после обработки. Разница может объясняться либо разными принципами определения ВПЧ в материале (тест-системы, основанные на определении ДНК или мРНК вируса), либо общей эффективностью этих систем [16]. Так, М. McMenamin и М. McKenna [17] определяли наличие ВПЧ тест-системой Cobas 4800 HPV test, основанной на определении ДНК 14 генотипов ВПЧ высокого риска, и доля конкордантных результатов тестирова-

ния материала виал до и после обработки уксусной кислотой составила для изначально положительных образцов 96,5% (63 из 65 образцов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение адаптированного протокола повторной обработки в условиях клинико-диагностической лаборатории для образцов, признанных неадекватными при первичной оценке, является удовлетворительным способом повышения эффективности цитологического исследования и в значительной степени помогает избегать повторного взятия материала.

Дальнейшего изучения требует оценка влияния уксусной кислоты на последующие молекулярно-генетические тестирования в материале образца для жидкостной цитологии и выбора тест-системы для определения ВПЧ в образце материала жидкостной цитологии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. А.К. Аксаментов — анализ литературы, написание рукописи; В.П. Баклашев, Н.В. Мельникова — идея и концепция обзора, анализ литературы, редактирование рукописи; Н.А. Колышкина, Е.В. Мошнина, О.Н. Кучерова — анализ литературы с точки зрения клинической релевантности, редактирование рукописи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. A.K. Aksamentov — literature analysis, manuscript writing; V.P. Baklaushv, N.V. Melnikova — the idea and concept of the review, N.A. Kolyshkina, E.V. Moshnina, O.V. Kuchero — literature analysis from the point of view of clinical relevance, manuscript editing. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках НИР по государственному заданию ФМБА России (шифр «Адоптивная иммунотерапия»).

Funding source. This study was supported by Federal Medical and Biological Agency of Russia, the project title “Adoptive immunotherapy”.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2021. 252 p. [Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Research Institute; 2021. 252 p. (In Russ).]
2. Клинические рекомендации. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки. 2020. [Clinical recommendations. Cervical intraepithelial neoplasia, erosion and ectropion of the cervix. 2020. (In Russ).]
3. Rozemeijer K, Penning C, Siebers AG, et al. Comparing SurePath, ThinPrep, and conventional cytology as primary test method: SurePath is associated with increased CIN II+ detection rates. *Cancer Causes Control*. 2016;27(1):15–25. doi: 10.1007/s10552-015-0678-1
4. De Oliveira AC, Domingues MF, Neufeld PM, et al. Comparison between conventional cytology and liquid-based cytology in the Tertiary Brazilian Navy Hospital in Rio de Janeiro. *Acta Cytol*. 2020;64(6):539–546. doi: 10.1159/000508018
5. Taylor S, Kuhn L, Dupree W, et al. Direct comparison of liquid-based and conventional cytology in a South African screening trial. *Int J Cancer*. 2006;118(4):957–962. doi: 10.1002/ijc.21434
6. Цервикальная цитология по системе Бетесда: терминология, критерии и пояснения / под ред. Р. Найяр, Д. Уилбур; пер. с англ. под ред. Н.Ю. Полонской. Москва: Практическая медицина, 2017. 304 с. [Cervical cytology according to the Bethesda system: Terminology, criteria and explanations. Ed. by R. Nayyar, D. Wilbur; translated from English ed. by N.Y. Polonskaya. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2017. 304 p. (In Russ).]
7. Risley C, Geisinger KR, Robinson JC, et al. Precancerous cervical lesions and HPV genotypes identified in previously unsatisfactory cervical smear tests after inexpensive glacial acetic acid processing. *Int J Gynaecol Obstet*. 2019;144(1): 85–89. doi: 10.1002/ijgo.12699
8. Kalinicheva T, Frisch N, Giordadze T, et al. Etiologic factors related to unsatisfactory ThinPrep cervical cytology: Evaluation and potential solutions to improve. *Cytojournal*. 2015;12:21. doi: 10.4103/1742-6413.165955
9. Rosa M, Pragasam P, Sareman J, et al. The unsatisfactory ThinPrep Pap Test: Analysis of technical aspects, most common causes, and recommendations for improvement. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(7):588–594. doi: 10.1002/dc.22904
10. Jeong H, Hong SR, Chae SW, et al. Comparison of unsatisfactory samples from conventional smear versus liquid-based cytology in uterine cervical cancer screening test. *J Pathol Transl Med*. 2017;51(3):314–319. doi: 10.4132/jptm.2017.03.17
11. Cohen D, Shorie J, Biscotti C. Glacial acetic acid treatment and atypical endocervical glandular cells: An analysis of 92 cases. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(5):799–801. doi: 10.1309/AJCP8N9ZJQDHFYTC
12. Dalton P, MacDonald S, Boerner S. Acetic acid recovery of gynecologic liquid-based samples of apparent low squamous cellularity. *Acta Cytol*. 2006;50(2):136–140. doi: 10.1159/000325921
13. Kitchener HC, Gittins M, Desai M, et al. A study of cellular counting to determine minimum thresholds for adequacy for liquid-based cervical cytology using a survey and counting protocol. *Health Technol Assess*. 2015;19(22):1–64. doi: 10.3310/hta19220

14. Gupta N, John D, Dudding N, et al. Factors contributing to false-negative and potential false-negative cytology reports in SurePath liquid-based cervical cytology. *Cytopathology*. 2013; 24(1):39–43. doi: 10.1111/j.1365-2303.2012.00992.x
15. Munson E, Chateau KD, Nelson BE, et al. Effect of glacial acetic acid treatment of liquid-based cytology collections on performance of Cervista HPV HR for detection of high-risk human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):2129–2131. doi: 10.1128/JCM.06719-11
16. Munson E, Schroeder ER, Ross KC, et al. Effect of preanalytical processing of ThinPrep specimens on detection of high-risk human papillomavirus by the Aptima HPV assay. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1448–1452. doi: 10.1128/JCM.03624-13
17. McMenamin M, McKenna M. Effect of glacial acetic acid treatment of cervical ThinPrep specimens on HPV DNA detection with the cobas 4800 HPV test. *Cytopathology*. 2013; 4(5):321–326. doi: 10.1111/cyt.12052

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Аксаментов Артем Константинович;

адрес: Россия, 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28;

e-mail: temaaxe@rambler.ru; eLibrary SPIN: 7861-6556;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7980-2537>

Соавторы:

Мельникова Надежда Васильевна, к.м.н.;

e-mail: n_melnikova@list.ru; eLibrary SPIN: 5050-8605;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1193-352X>

Мошнина Евгения Викторовна;

e-mail: moshnina.ev@fnkc-fmba.ru

Колышкина Надежда Александровна, к.м.н.;

e-mail: baklab_83@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4486-5412>

Кучерова Ольга Николаевна, к.м.н.;

e-mail: ola-kucheroва@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3773-9629>

Баклаушев Владимир Павлович, д.м.н.;

e-mail: baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru;

eLibrary SPIN: 3968-2971;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1039-4245>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Artem K. Aksamentov;

address: 28 Orekhovy boulevard, 115682 Moscow, Russia;

e-mail: temaaxe@rambler.ru; eLibrary SPIN: 7861-6556;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7980-2537>

Co-authors:

Nadezhda V. Melnikova, MD, PhD;

e-mail: n_melnikova@list.ru; eLibrary SPIN: 5050-8605;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1193-352X>

Eugenia V. Moshnina;

e-mail: moshnina.ev@fnkc-fmba.ru

Nadezhda A. Kolyskina, MD, PhD;

e-mail: baklab_83@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4486-5412>

Olga N. Kucheroва, MD, PhD;

e-mail: ola-kucheroва@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3773-9629>

Vladimir P. Baklaushev, MD, PhD;

e-mail: baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru;

eLibrary SPIN: 3968-2971;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1039-4245>

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ АСТРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У РЕЦИПИЕНТА АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Ю.А. Беспярых^{1, 2, 3}, А.В. Господарик¹, Е.А. Журавель⁴, Г.З. Серёгин⁴, А.В. Комарова^{1, 3},
С.С. Есиев¹, Г.О. Бронин⁴, Я.Д. Шанский¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, Российская Федерация

² Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко, Москва, Российская Федерация

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация

⁴ Морозовская детская городская клиническая больница, Москва, Российская Федерация

Обоснование. Вторичный иммунодефицит у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в педиатрической практике часто сопровождается бактериальными и вирусными инфекциями желудочно-кишечного тракта, резистентными к конвенциональным методам терапии. Трансплантация фекальной микробиоты способствует реконструкции кишечника и купированию симптомов поражения желудочно-кишечного тракта. **Описание клинического случая.** Пациентке 2,5 лет в рамках терапии острого миелоидного лейкоза проведена алло-ТГСК от гаплоидентичного родственного донора (отца). Через месяц от последней процедуры появились боли в животе, жидкий стул до 10 раз в сутки. В кале обнаружена РНК астровируса, определялся положительный клостридиальный токсин А. Принято решение о трансплантации фекальной микробиоты. После двух процедур нивелирован кишечный синдром, анализы на РНК астровируса и клостридиальные токсины отрицательные. Увеличилось содержание холевой и особенно дезоксихолевой кислот в кале, а также их конъюгатов с глицином и таурином; увеличилось содержание уксусной кислоты с одновременным снижением уровня пропионовой кислоты, что указывает на восстановление функционального потенциала кишечной микробиоты. **Заключение.** Трансплантация фекальной микробиоты способствует восстановлению нормальной микрофлоры кишечника, устранению клостридиальных токсинов, энтероинвазивной кишечной палочки и астровирусной инфекции у реципиентов алло-ТГСК, что подтверждается показателями активности микробиоты кишечника, и может быть использована у реципиентов алло-ТГСК с течением инфекций, рефрактерных к конвенциональному лечению.

Ключевые слова: астровирус; аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; желчные кислоты; короткоцепочечные жирные кислоты.

Для цитирования: Беспярых Ю.А., Господарик А.В., Журавель Е.А., Серёгин Г.З., Комарова А.В., Есиев С.С., Бронин Г.О., Шанский Я.Д. Трансплантация фекальной микробиоты при астровирусной инфекции у реципиента аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: клинический случай. Клиническая практика. 2023;14(1):115–122. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract275406>

Поступила 22.02.2023

Принята 28.02.2023

Опубликована 20.03.2023

ОБОСНОВАНИЕ

Инфекционные поражения желудочно-кишечного тракта часто встречаются в педиатрической практике: например, острый гастроэнтерит является причиной диареи у детей в возрасте до 5 лет в 1,7 млрд случаев [1]. Около 30% случаев приходится на бактериальные инфекции: хорошо изученным примером является широко распростра-

ненная внутрибольничная клостридиальная инфекция, связанная с применением антибиотиков и вызываемая действием токсинов А и В *Clostridioides* (ранее *Clostridium*) *difficile* [2]. В 70% случаев гастроэнтерит имеет вирусную этиологию и вызывается представителями *Norovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Sapovirus* и *Astrovirus* [3], в том числе при иммуносупрессивных состояниях, например у реципиен-

FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION IN THE TREATMENT OF ASTROVIRUS INFECTION IN A RECIPIENT OF AN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT: A CLINICAL CASE

J.A. Bespyatykh^{1,2,3}, A.V. Gospodarik¹, E.A. Zhuravel⁴, G.Z. Seregin⁴, A.V. Komarova^{1,3}, S.S. Esiev¹, G.O. Bronin⁴, Ya.D. Shansky¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation

² N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russian Federation

³ Mendeleeev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

⁴ Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Background: Secondary immunodeficiency in recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) in the pediatric practice is often accompanied by bacterial and viral infections of the gastrointestinal tract (GIT), resistant to conventional therapy. Fecal microbiota transplantation (FMT) promotes intestinal recolonization and eradication of gastrointestinal symptoms. **Clinical case description:** A 2.5-year-old patient underwent allo-HSCT from a haploidentical related donor (father) as a part of the treatment of acute myeloid leukemia. A month after the last procedure, diarrhea (up to 10 times a day) and abdominal pain appeared. The astrovirus RNA and *Clostridium difficile* toxin A were detected in the feces. The FMT was prescribed. After two FMT procedures, the intestinal syndrome leveled out, and the tests for the astrovirus RNA and clostridial toxins were negative. The content of cholic and, in particular, deoxycholic acids, as well as their conjugates with glycine and taurine, in the feces increased; the acetic acid content increased with a simultaneous decrease in the level of propionic acid, which indicates the restoration of the intestinal microbiota's functional potential. **Conclusion:** FMT contributes to the restoration of the normal intestinal microflora, the elimination of clostridial toxins, enteroinvasive *E. coli* and astrovirus infection in allo-HSCT recipients, as evidenced by the indicators of the intestinal microbiota activity, and can be used in allo-HSCT recipients with infections refractory to conventional therapy.

Keywords: allogeneic hematopoietic stem cells transplantation; bile acids; short chain fatty acids.

For citation: Bespyatykh JA, Gospodarik AV, Zhuravel EA, Seregin GZ, Komarova AV, Esiev SS, Bronin GO, Shansky YaD. Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Astrovirus Infection in a Recipient of an Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant: a Clinical Case. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(1):115–122. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract275406>

Submitted 22.02.2023

Revised 28.02.2023

Published 20.03.2023

тов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Вирусная этиология диареи у пациентов после алло-ТГСК составляет 20% от всех эпизодов ТГСК-ассоциированной диареи [4], однако только 4,2% случаев острого гастроэнтерита у детей ассоциировано с инфицированием *Astrovirus* [5], что затрудняет поиск оптимальной схемы терапии вирусных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) является одним из эффективных методов реконструкции кишечника, уменьшает антибиотикорезистентность патогенной микробиоты, что делает ее подходящим методом профилактики и лечения жизнеугрожающих осложнений у иммунокомпрометированных пациентов [4, 6]. Ранее была показана эффективность ТФМ при кишечных инфекци-

ях, вызываемых *C. difficile* [7], в то время как при вирусных заболеваниях она изучена недостаточно.

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР

О пациенте

Пациентке Э., 2,5 года, на основании морфохимического, иммунологического, молекулярно-генетического методов исследования клеток костного мозга установлен диагноз: «Острый миелоидный лейкоз, М1 морфологический вариант, t(8;21) (RUNX1-RUNX1T1)».

Лабораторная и инструментальная диагностика

В кале пациентки на всех этапах, как до проведения ТФМ, так и после трансплантации, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) оценивали

наличие патогенной кишечной флоры (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.); вирусов (*Adenovirus F*, *Norovirus* 2-й генотип, *Rotavirus A*, *Astrovirus*); токсинов А и В *C. difficile*. Проводили также бактериологический анализ кала (табл. 1) с определением чувствительности к антибиотикам. Кроме того, в кале пациентки оценивали качественный и количественный состав короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) и желчных кислот как индикаторов состояния микробиоты кишечника. Анализ желчных кислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandem-масс-спектрометрическим детектированием, КЦЖК — методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием [8].

В работе оценивали следующие показатели: концентрации свободных и конъюгированных желчных кислот, общую и индивидуальную концентрацию КЦЖК в кале. Концентрации 13 желчных кислот — таурохолевой (taurocholic acid, TCA), гликоурсодезоксихолевой (glycoursodeoxycholic acid, GUDCA), тауро-

рохенодезоксихолевой (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA), гликохолевой (glycocholic acid, GCA), тауроурсодезоксихолевой (tauroursodeoxycholic acid, TUDCA), гликохенодезоксихолевой (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA), холевой (cholic acid, CA), хенодезоксихолевой (chenodeoxycholic acid, CDCA), тауродезоксихолевой (taurodesoxycholic acid, TDCA), дезоксихолевой (desoxycholic acid, DCA), урсодезоксихолевой (ursodeoxycholic acid, UDCA), тауролиохолевой (taurolithocholic acid, TLCA) и литохолевой (lithocholic acid, LCA) — приведены в табл. 2.

Концентрации КЦЖК — уксусной (C2), пропионовой (C3), масляной (C4), изомасляной (изоC4), валериановой (C5), изовалериановой (изоC5), капроновой (C6), а также их общее содержание, анаэробный индекс (АИ) и соотношение изомеров и гомологов КЦЖК (изоC_n/C_n) приведены в табл. 3.

Лечение и динамика состояния

После получения информированного согласия родителей проводилась полихимиотерапия по про-

Таблица 1 / Table 1

Результаты анализа кала на наличие инфекционных агентов (бактериальных и вирусных) /

Results of the fecal analysis for the presence of infectious agents (bacterial and viral)

Показатель	До трансплантации фекальной микробиоты	После трансплантации фекальной микробиоты
<i>Clostridioide difficile</i> токсин А	Обнаружено	Не обнаружено
<i>Clostridioide difficile</i> токсин В	Не обнаружено	Не обнаружено
Вирусные инфекции		
<i>Rotavirus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Norovirus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Adenovirus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Astrovirus</i>	Обнаружено	Не обнаружено
Бактериальные инфекции		
<i>Shigella</i> spp.	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Salmonella</i> spp.	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Campylobacter</i> spp.	Не обнаружено	Не обнаружено
Энтероинвазивные <i>Escherichia coli</i>	Обнаружено	Не обнаружено
<i>Escherichia coli</i>	Обнаружено (IV степень обсемененности)	Обнаружено (IV степень обсемененности)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Обнаружено (II степень обсемененности)	Обнаружено (IV степень обсемененности)
<i>Candida albicans</i>	Обнаружено (III степень обсемененности)	Не обнаружено
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Обнаружено (III степень обсемененности)	Обнаружено (IV степень обсемененности)
<i>Streptococcus mitis</i>	Не обнаружено	Обнаружено (IV степень обсемененности)
<i>Streptococcus oralis</i>	Не обнаружено	Обнаружено (IV степень обсемененности)

Таблица 2 / Table 2

**Концентрация желчных кислот в кале реципиента /
Concentration of bile acids in the recipient's feces**

Желчная кислота	Содержание, мкг/г	
	До трансплантации фекальной микробиоты	После трансплантации фекальной микробиоты
Таурохолевая	-	0,11
Гликоурсодезоксихолевая	0	0,27
Таурохенодезоксихолевая	-	-
Гликохолевая	-	-
Тауроурсодезоксихолевая	-	0,15
Гликохенодезоксихолевая	0	-
Холевая	-	0,27
Хенодезоксихолевая	-	-
Тауродезоксихолевая	-	-
Дезоксихолевая	0	1,56
Урсодезоксихолевая	-	-
Литохолевая	-	-
Тауролитохолевая	-	-

Таблица 3 / Table 3

**Концентрация короткоцепочечных жирных кислот и связанных с ними параметров в кале реципиента /
Concentrations of short-chain fatty acids in the recipient's feces and related parameters**

Анализируемый параметр	Содержание, мкг/г	
	До трансплантации фекальной микробиоты	После трансплантации фекальной микробиоты
Уксусная кислота	1,599	4,508
Пропионовая кислота	0,421	0,258
Изомасляная кислота	0,032	0,036
Масляная кислота	0,158	0,183
Изовалериановая кислота	0,056	0,041
Валериановая кислота	0,063	0,031
Капроновая кислота	0,044	0,054
Общее содержание	2,373	5,110
Отношение суммарного содержания кислот с разветвленной цепью к кислотам с неразветвленной цепью, $\text{изоC}_n/\text{C}_n$	0,039	0,015
Анаэробный индекс	0,362	0,098

токолу ALL-BFM-2004. После 1-го курса полихимиотерапии достигнута клиничко-гематологическая ремиссия, однако при исследовании минимальной остаточной болезни (МОБ) в костном мозге сохранялся химерный транскрипт RUNX1-RUNX1T1, определявшийся методом ПЦР в реальном времени после 3 курсов полихимиотерапии, что свидетельствовало о рефрактерном течении заболевания. Было принято решение о проведении алло-ТГСК.

Выбран родственный гаплоидентичный донор (отец ребенка). По результатам проведенного комплексного предтрансплантационного обследования донора и реципиента абсолютных противопоказаний к алло-ТГСК не выявлено.

Проведено кондиционирование (из расчета на курс): треоульфат по 42 г/м², флударабин по 150 мг/м², этопозид по 60 мг/кг, ритуксимаб по 375 мг/м². В качестве источника трансплантата

использовали неманипулированные периферические стволовые клетки. Объем материала составил 70 мл, цитоз $232 \times 10^9/\text{л}$, $\text{CD34}^+ 6 \times 10^6/\text{кг}$, $\text{CD3}^+ 26,5\%$. Трансплантацию ребенок перенес удовлетворительно. Профилактика реакции трансплантат против хозяина: такролимус и микофенолата мофетил со дня +1, циклофосфан в дозе 100 мг/кг на курс на +3...+4-е сутки от алло-ТГСК.

Течение раннего посттрансплантационного периода протекало со следующими осложнениями: фебрильная нейтропения III степени, дерматологическая токсичность II степени, желудочно-кишечная токсичность II степени, гематологическая токсичность IV степени. Токсичность оценивали в соответствии со шкалой CTCAE 5.0 (Common terminology criteria for adverse events). Методом ПЦР в период фебрильной нейтропении однократно выявлялся ротавирус из стула. Все осложнения купировались комплексной сопроводительной терапией.

Приживление трансплантата достигнуто на +16-е сутки. На +19-е сутки пациентка выписана из стационара без признаков диареи и инфекционного процесса. При обследовании на +30-е сутки сохранялась клинко-гематологическая ремиссия, полный донорский химеризм, достигнут МОБ-негативный статус (отсутствие экспрессии RUNX1-RUNX1T1 в костном мозге).

С +30-х суток у ребенка появились боли в животе, жидкий стул. При исследовании кала выявлен астровирус. В ходе лабораторного исследования образцов стула выявлен положительный клостридиальный токсин А. Проводились инфузионная терапия с коррекцией электролитных нарушений; заместительные трансфузии 20% раствора альбумина; комбинированная противомикробная терапия, включавшая комбинацию антибиотиков широкого спектра действия (меропенем, метронидазол, ванкомицин, колистиметат натрия, рифаксимин), антимикотиков (каспофунгин, амфотерицин В) и противовирусных препаратов (ацикловир); трансфузии 10% внутривенного иммуноглобулина. На этом фоне общее состояние ребенка улучшилось, однако сохранялся жидкий стул до 10 раз/сут общим объемом до 1,5 л/сут. Принято решение о проведении ТФМ.

Для ТФМ использовали жидкий фекальный материал в виде суспензии от здорового донора (женщина, 38 лет), полученный по использованной ранее методике [9]. Донор предварительно прошел лабораторное обследование: базовые гематологические и биохимические исследования крови; анализы на гепатиты В и С, вирус иммунодефици-

та человека, сифилис; общий анализ мочи; копрограмму; анализ кала на скрытую кровь, простейшие и яйца гельминтов; бактериальный посев кала; анализ кала методом ПЦР на патогенную кишечную флору, наличие токсинов *C. difficile* А и В, наличие генетических маркеров лекарственной устойчивости. Материал был взят при нормальных значениях исследованных показателей.

Процедуру ТФМ пациентка перенесла удовлетворительно. Введение микробного сообщества проводили с помощью назогастрального зонда. На 3-и сутки после процедуры отмечалось уменьшение частоты и объема дефекаций, однако консистенция стула оставалась разжиженной. При контрольном исследовании через неделю после ТФМ анализ на астровирус в кале положительный. Проведена вторая процедура ТФМ, после чего кишечный синдром нивелировался.

Исходы и прогноз

При повторных исследованиях образцов кала пациентки астровирус и клостридиальные токсины не обнаруживались. Ребенок выписан из стационара. В дальнейшем пациентка наблюдалась амбулаторно в течение 8 месяцев. Эпизодов диареи не отмечалось.

В настоящее время в ремиссии, трансплантат функционирует, сохраняется донорский химеризм. Планируется длительное, в течение как минимум 1 года, активное наблюдение в трансплантационной клинике с последующим проведением вакцинации при достижении полной иммунной реконституции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Микробные и вирусные антигены кишечной микробиоты являются ключевым фактором нормального созревания и функционирования иммунной системы, особенно в детском возрасте [10]. Положительный исход алло-ТГСК зависит от успешного лечения ТГСК-ассоциированной диареи, которая может быть фатальной и, в свою очередь, обусловлена взаимодействием между нарушенной в этот период иммунной системой макроорганизма и кишечной экосистемой, подвергающейся сильной деформации в связи с использованием многокомпонентной противомикробной терапии [10]. В нашем случае ТФМ показала положительный эффект при лечении инфекционного поражения кишечника после алло-ТГСК, вызванного астровирусной инфекцией. Отмечались улучшение общего состояния пациентки, устранение кишечного синдрома, нормализация ки-

шечной микрофлоры по показателям желчных кислот и КЦЖК. По результатам ПЦР-исследования, после первой ТФМ токсин *A. C. difficile* в кале пациентки не обнаружен, что подтверждает эффективность ТФМ при клостридиальной инфекции [11], в том числе у детей [12]. Энтероинвазивные *Escherichia coli* после ТФМ не выявляются. После ТФМ также наблюдается значительное снижение бактериальной обсемененности *Klebsiella pneumoniae*.

Важность исследования ТФМ при астровирусной инфекции обусловлена тем, что данный возбудитель является причиной некротизирующего энтероколита и сопровождается высокой летальностью у новорожденных [5]. Астровирусная инфекция является одной из множества причин развития кишечного синдрома у пациентов с иммунодефицитными состояниями, в том числе после алло-ТГСК [5, 13]. В нашем случае выявленная на фоне алло-ТГСК РНК астровируса не обнаруживалась после проведения повторной ТФМ. Ранее эффективность ТФМ при вирусных заболеваниях в виде восстановления микробиоты кишечника была показана для пациентов с ВИЧ [14]. В доклинических исследованиях ТФМ способствовала более быстрому благоприятному исходу при парвовирусной диарее [15]. Учитывая редкую частоту случаев астровирусной инфекции, ассоциированной с алло-ТГСК [13, 16], можно считать представленный клинический случай первым успешным применением ТФМ при данном осложнении после алло-ТГСК.

Дисфункция микробиоты кишечника приводит к снижению трансформации первичных конъюгированных желчных кислот во вторичные, что, вероятно, может объяснять чрезвычайно малое (ниже предела обнаружения методики) содержание индивидуальных желчных кислот у реципиента (см. табл. 2) [17]. После терапии отмечался рост показателей первичной (CA) и особенно вторичной (DCA) желчных кислот, а также повышение концентраций таурин- (TCA, TUDCA) и глицинконъюгированных (GUDCA) желчных кислот (см. табл. 2). DCA является мощным антимикробным агентом, способным уменьшать воспалительные процессы при нарушениях функционала микробиоты [18]. Повышенный уровень DCA у реципиента после ТФМ указывает на улучшение функционирования микробиоты кишечника [17]. Наличие конъюгированных желчных кислот в кале может говорить о сниженной активности/небольшом количестве бактерий *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, регулирующих деконъюгацию желчных кислот [19].

Результат анализа реципиента на КЦЖК показал значительное увеличение уровня уксусной кислоты, небольшое снижение количества пропионовой кислоты, а также еще менее значительный рост уровней масляной, изомасляной, капроновой кислот и уменьшение количества валериановой и изовалериановой кислот (см. табл. 3). Данные изменения, вероятно, могут означать улучшение функционирования желудочно-кишечного тракта. Бутират играет важную роль в регуляции иммунного ответа и противовоспалительной активности КЦЖК [20, 21]. Однако незначительное изменение уровня бутирата после ТФМ и недостаток экспериментальных точек пока не дает нам возможности сделать вывод о его вкладе в изменение функционирования микробиоты реципиента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые представлена клиническая оценка эффективности ТФМ при терапии астровирусной инфекции желудочно-кишечного тракта после алло-ТГСК, в том числе по показателям КЦЖК и желчных кислот. Показано снижение бактериальной нагрузки *K. pneumoniae*, а также полная элиминация *Candida albicans* и энтероинвазивных *E. coli*. В то же время выявление *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis* после ТФМ может свидетельствовать в пользу постепенной реколонизации желудочно-кишечного тракта нормальной микрофлорой.

На основании имеющихся в литературе данных, а также собственных исследований можно сделать предположение о положительном влиянии ТФМ на ход лечения реципиента алло-ТГСК, в том числе осложненного астровирусной инфекцией желудочно-кишечного тракта. Улучшение профиля уровней КЦЖК и желчных кислот дает основание судить об эффективности ТФМ, что выражается улучшением состояния и функционирования микробиоты кишечника. Однако для подтверждения результатов и достоверности суждений об эффективности терапии необходимо рассмотреть большее количество экспериментальных точек после ТФМ.

ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ

Исследование одобрено ЛЭК ГБУЗ Морозовская ДГКБ ДЗМ, протокол № 176 от 24.05.2022.

Исследование одобрено ЛЭК ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, протокол № 2022/05/31 от 31.05.2022.

Родителями пациентки подписано добровольное информированное согласие на проведение исследования и публикацию его результатов (17.06.2022).

INFORMED CONSENT

Written voluntary informed consent was received from the patient for the publication medical data for scientific purposes in the journal Clinical Practice. Ethic committee vote was granted by Morozov Children's Hospital № 176 on 24.05.2022 and Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine № 2022/05/31 on 31.05.2022. The legal representative has signed written voluntary informed consent on publication the clinical case description, medical data (results of diagnosis, treatment and observation in medical journal, electronic version included (signed on 17.06.2022).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Вклад авторов. Ю.А. Беспярых — концепция исследования, анализ клинических данных, финальное редактирование текста рукописи; А.В. Господарик — сбор и подготовка материала; Е.А. Журавель — лечащий врач пациента; Г.З. Серёгин — курирование процедуры трансплантации фекальной микробиоты; А.В. Комарова, С.С. Есиев — проведение исследований; Г.О. Бронин — координация ТФМ-терапии пациента, написание текста рукописи; Я.Д. Шанский — проведение исследований, написание текста рукописи, статистический анализ результатов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. J.A. Bespyatykh — study concept, clinical data analysis, final manuscript editing; A.V. Gospodarik — collection and pre-treatment of biological samples; E.A. Juravehl — treatment of patients; G.Z. Seregin — FTM coordination and control; A.V. Komarova, S.S. Esiev — laboratory studies; G.O. Bronin — FTM coordination, writing the text of the article; Ya.D. Shansky — laboratory studies, data acquisition and analysis, manuscript writing, data statistical analysis. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Научное исследование проведено при финансовой поддержке АНО «Московский центр инноваций в здравоохранении» (договор № 2412-31/22).

Funding source. This work was funded by the Moscow Center of Innovative Technologies in Medicine autonomic non-commercial organization (grant No. 2412-31/22).

Конфликт интересов. Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Abdel-Rahman ME, Mathew S, Al Thani AA, et al. Clinical manifestations associated with acute viral gastroenteritis pathogens among pediatric patients in Qatar. *J Med Virol.* 2021;93(8):4794–4804. doi: 10.1002/jmv.26859
2. Dong N, Li ZR, Qin P, et al. Risk factors for *Clostridioides difficile* infection in children: A systematic review and meta-analysis. *J Hosp Inf.* 2022;(130):112–121. doi: 10.1016/j.jhin.2022.09.004
3. Granado-Villar D, Sautu CD, Granados A. Acute gastroenteritis. *Pediatr Rev.* 2012;33(11):487–495. doi: 10.1542/pir.33.11.487
4. Голощапов О.В., Чухловин А.Б., Бакини Е.А., и др. Трансплантация фекальной микробиоты при реакции “трансплантат против хозяина” у детей и взрослых: методы, клинические эффекты, безопасность // *Терапевтический архив.* 2020. Т. 92, № 7. С. 43–54. [Goloshchapov OV, Chukhlovina AB, Bakina EA, et al. Fecal microbiota transplantation in the graft-versus-host reaction in children and adults: Methods, clinical effects, safety. *Ther Arch.* 2020;92(7):43–54. (In Russ).] doi: 10.26442/00403660.2020.07.000773
5. Razizadeh MH, Pourrostami K, Kachooei A, et al. An annoying enteric virus: A systematic review and meta-analysis of human astroviruses and gastrointestinal complications in children. *Rev Med Virol.* 2022;32(6):e2389. doi: 10.1002/rmv.2389
6. Spindelboeck W, Schulz E, Uhl B, et al. Repeated fecal microbiota transplantations attenuate diarrhea and lead to sustained changes in the fecal microbiota in acute, refractory gastrointestinal graft-versus-host-disease. *Haematologica.* 2017;102(5):e210–e213. doi: 10.3324/haematol.2016.154351
7. Mylonakis E, Ryan E, Calderwood S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Arch Intern Med.* 2001;161(4):525–533. doi: 10.1001/archinte.161.4.525
8. Шанский Я.Д., Комарова А.В., Беспярых Ю.А. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для мониторинга содержания желчных кислот и их конъюгатов в организме человека // *Материалы научно-практических конференций в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022), сентябрь 5–9. Москва, 2022.* [Shansky YaD, Komarova AV, Bespyatykh JA. Application of the method of high-performance liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry for monitoring the content of bile acids and their conjugates in the human body. In: Materials of scientific and practical conferences within the framework of the VIII Russian Congress of Laboratory Medicine (RKLM 2022), Sep, 5–9. Moscow; 2022. (In Russ).]
9. Zhgun ES, Kislun YV, Kalachniuk TN, et al. [Evaluation of the levels of metabolites in feces of patients with inflammatory bowel diseases. (In Russ).] *Biomed Khim.* 2020;66(3):233–240. doi: 10.18097/PBMC20206603233

10. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res*. 2017; 4:14. doi: 10.1186/s40779-017-0122-9
11. Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of clostridium difficile infection in immunocompromised patients. *Am J Gastroenterol*. 2014; 109:1065–1071. doi: 10.1038/AJG.2014.133
12. Green JE, Davis JA, Berk M, et al. Efficacy and safety of fecal microbiota transplantation for the treatment of diseases other than Clostridium difficile infection: A systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1854640. doi: 10.1080/19490976.2020.1854640
13. Sebire NJ, Malone M, Shah N, et al. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathology*. 2004;57(9):1001–1003. doi: 10.1136/jcp.2004.017178
14. Serrano-Villar S, Talavera-Rodríguez A, Gosálbes MJ, et al. Fecal microbiota transplantation in HIV: A pilot placebo-controlled study. *Nat Commun*. 2021;12:1139. doi: 10.1038/s41467-021-21472-1
15. Pereira G, Gomes L, Santos I. Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *J Veterinary Int Med*. 2018;32(2):707–711. doi: 10.1111/JVIM.15072
16. Wunderli W, Meerbach A, Guengoer T, et al. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One*. 2011;6(11):e27483. doi: 10.1371/journal.pone.0027483
17. Kamp KJ, Cain KC, Utteget A, et al. Bile acids and microbiome among individuals with irritable bowel syndrome and healthy volunteers. *Biol Res Nurs*. 2021;23(1):65–74. doi: 10.1177/1099800420941255
18. Perino A, Demagny H, Velazquez-Villegas L, Schoonjans K. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. *Physiol Rev*. 2021;101(2):683–731. doi: 10.1152/physrev.00049.2019
19. Foley MH, O'Flaherty S, Barrangou R, Theriot CM. Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathog*. 2019;15(3):e1007581. doi: 10.1371/journal.ppat.1007581
20. Mirzaei R, Afaghi A, Babakhani S, et al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomed Pharmacother*. 2021;139:111619. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111619
21. Parada Venegas D, de la Fuente MK, Landskron G, et al. Short-chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol*. 2019;10:277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Беспятых Юлия Андреевна, к.б.н., доцент;
адрес: Россия, 119435, Москва,
ул. Малая Пироговская, д. 1А;
е-mail: JuliaBes@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 6003-9246;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

Соавторы:

Господарик Алина Владимировна, к.б.н., н.с.с.;
е-mail: alina.gospodaryk@rcpcm.org

Журавель Евгений Андреевич;
е-mail: zhuravel_evgeniy93@yandex.ru

Серёгин Георгий Зурабович;
е-mail: jorggg@mail.ru

Комарова Анастасия Валерьевна, м.н.с.с.;
е-mail: komaanasta@yandex.ru

Есиев Сулейман Сергеевич;
е-mail: kap20081@gmail.com; eLibrary SPIN: 9593-2893

Бронин Глеб Олегович, к.м.н.;
е-mail: gbronin@morozdgb.ru; eLibrary SPIN: 6485-2648;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0694-3996>

Шанский Ярослав Дмитриевич, к.б.н., н.с.с.;
е-mail: yar.shansky@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 7640-5940;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Julia A. Bespyatykh, PhD, Associate Professor;
address: 1a Malaya Pirogovskaya street,
119435 Moscow, Russia;
е-mail: JuliaBes@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 6003-9246;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>

Co-authors:

Alina V. Gospodarik, PhD, Research Associate;
е-mail: alina.gospodaryk@rcpcm.org

Evgeny A. Zhuravel;
е-mail: zhuravel_evgeniy93@yandex.ru

George Z. Seregin;
е-mail: jorggg@mail.ru

Anastacia V. Komarova, Junior Research Associate;
е-mail: komaanasta@yandex.ru

Sulejman S. Esiev;
е-mail: kap20081@gmail.com; eLibrary SPIN: 9593-2893

Gleb O. Bronin, MD, PhD;
е-mail: gbronin@morozdgb.ru; eLibrary SPIN: 6485-2648;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0694-3996>

Yaroslav D. Shansky, PhD, Research Associate;
е-mail: yar.shansky@rcpcm.org; eLibrary SPIN: 7640-5940;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>