

# ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР** Денис Ребриков, д. б. н., профессор

**ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА** Александр Эттингер, д. м. н., профессор

**РЕДАКТОРЫ** Валентина Гейдебрект, к. б. н.; Надежда Тихомирова

**ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР** Евгений Лукьянов

**ПЕРЕВОДЧИКИ** Надежда Тихомирова, Вячеслав Витюк

**ДИЗАЙН И ВЕРСТКА** Марины Дорониной

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

**В. В. Негребецкий**, д. х. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. А. Новиков**, д. б. н. (Москва, Россия)  
**Ю. П. Пивоваров**, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)  
**Н. В. Полунина**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Г. В. Порядин**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. Ю. Разумовский**, член-корр., профессор (Москва, Россия)  
**О. Ю. Реброва**, д. м. н. (Москва, Россия)  
**А. С. Рудой**, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)  
**А. К. Рылова**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Г. М. Савельева**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. Ф. Семиглазов**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
**Н. А. Скоблина**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Т. А. Славянская**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. М. Смирнов**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. Спаллоне**, д. м. н., профессор (Рим, Италия)  
**В. И. Стародубов**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. А. Степанов**, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)  
**С. В. Сучков**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Х. П. Тахчиди**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Г. Е. Труфанов**, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
**О. О. Фаворова**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**М. Л. Филипенко**, к. б. н. (Новосибирск, Россия)  
**Р. Н. Хазипов**, д. м. н. (Марсель, Франция)  
**М. А. Чундокова**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Н. Л. Шимановский**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Л. Н. Шишкина**, д. б. н. (Новосибирск, Россия)  
**Р. И. Якубовская**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

**ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ** <http://vestnikrgmu.ru/login>

**ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**СОТРУДНИЧЕСТВО** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto:manager@vestnikrgmu.ru)

**АДРЕС РЕДАКЦИИ** ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2022: 0,5

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h<sup>2</sup>) журнала по оценке Google Scholar: 8

**Scopus**<sup>®</sup>

WEB OF SCIENCE™

**Google**  
scholar

ScImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

**SJR**  
Scimago Journal & Country Rank

 **ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)**

**CYBERLENINKA**

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2023-04

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

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

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)



Подписано в печать 31.08.2023

Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

# BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

## BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

**EDITOR-IN-CHIEF** Denis Rebrikov, DSc, professor

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

**EDITORS** Valentina Geidebrekht, PhD; Nadezda Tikhomirova

**TECHNICAL EDITOR** Evgeny Lukyanov

**TRANSLATORS** Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

**DESIGN AND LAYOUT** Marina Doronina

### EDITORIAL BOARD

**Averin VI**, DSc, professor (Minsk, Belarus)

**Alipov NN**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Belousov VV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Bylova NA**, CSc, docent (Moscow, Russia)

**Gainetdinov RR**, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

**Gendlin GYe**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Gorbacheva LR**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Gordeev IG**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Gudkov AV**, PhD, DSc (Buffalo, USA)

**Gulyaeva NV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Danilenko VN**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Zarubina TV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Kagan VE**, professor (Pittsburgh, USA)

**Kzyshkowska YuG**, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

**Kobriniskii BA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Kozlov AV**, MD PhD, (Vienna, Austria)

**Kotelevtsev YuV**, CSc (Moscow, Russia)

**Lebedev MA**, PhD (Darem, USA)

**Manturova NE**, DSc (Moscow, Russia)

**Milushkina OYu**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Mitupov ZB**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Moshkovskii SA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Negrebetsky VV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Novikov AA**, DSc (Moscow, Russia)

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

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

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

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

**Rebrova OYu**, DSc (Moscow, Russia)

**Rudoy AS**, DSc, professor (Minsk, Belarus)

**Rylova AK**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Skoblina NA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Slavyanskaya TA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Smirnov VM**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Spallone A**, DSc, professor (Rome, Italy)

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

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

**Suchkov SV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Favorova OO**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Khazipov RN**, DSc (Marsel, France)

**Chundukova MA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Yakubovskaya RI**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**CORRESPONDENCE** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**COLLABORATION** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto:manager@vestnikrgmu.ru)

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2022: 0.5

**Scopus**<sup>®</sup>

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

**SJR**  
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

**WEB OF SCIENCE**<sup>™</sup>

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



**ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)**

Five-year h-index is 8

**Google**  
scholar

Open access to archive

**CYBERLENINKA**

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2023-04

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

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

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)



Approved for print 31.08.2023

Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>4</b>
Оценка метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом при раке молочной железы P. X. Muxamedzhanov, E. S. Grigoryeva, L. A. Tashireva, B. M. Perelmutter, M. V. Zavyalova, O. E. Savelyeva <b>Assessment of metastatic traits of the cells with hybrid phenotype in breast cancer</b> Mukhamedzhanov RK, Grigoryeva ES, Tashireva LA, Perelmutter VM, Zavyalova MV, Savelyeva OE	
<b>КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ</b>	<b>16</b>
Мультидисциплинарный подход к лечению пациента с нерезектабельным метастатическим поражением печени HER2 <sup>+</sup> аденокарциномой желудка K. B. Kolomiets, I. V. Isaev, B. V. Kovalev, N. V. Grishchenko, D. I. Kokovihina, A. A. Morozova, A. P. Torosyan, B. V. Shashkova, P. V. Snegireva <b>Multidisciplinary approach to treatment of a patient with unresectable metastatic liver lesion spawned by HER2<sup>+</sup> gastric adenocarcinoma giving</b> Kolomiets KV, Isaev IV, Kovalev VV, Grishchenko NV, Kokovihina DI, Morozova AA, Torosyan AP, Shashkova VV, Snegireva PV	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>22</b>
Влияние лесных пожаров на онкологические заболевания у населения Дальнего Востока С. К. Пинаев, С. Веньевский, В. В. Чаков, Л. Тянь, П. Гонг, А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. Я. Чижов, О. Г. Пинаева <b>Possible links of wildfires with oncological diseases of children and adults in the Russian Far East</b> Pinaev SK, Venevsky S, Chakov VV, Tian L, Gong P, Kaprin AD, Starinsky VV, Chizhov AY, Pinaeva OG	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>34</b>
Неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии О. И. Лисицына, А. Н. Екимов, Е. Е. Атапина, А. Г. Сыркашева, Е. Г. Горяйнова, Н. П. Макарова, Д. Ю. Трофимов, Н. В. Долгушина <b>Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy</b> Lisitsyna OI, Ekimov AN, Atapina EE, Syrkasheva AG, Goryainova EG, Makarova NP, Trofimov DY, Dolgushina NV	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>41</b>
Катаболиты триптофана и гены ферментов микробиома кишечника О. П. Шатова, А. М. Гапонов, Т. В. Григорьева, И. Ю. Васильев, Л. С. Столетова, В. В. Макаров, С. М. Юдин, С. А. Румянцев, А. В. Шестопалов <b>Tryptophan catabolites and predicted gut flora enzyme-encoding gene</b> Shatova OP, Gaponov AM, Grigoryeva TV, Vasiliev IYu, Stoletova LS, Makarov VV, Yudin SM, Roumiantsev SA, Shestopalov AV	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>51</b>
Клиническое значение определения цитокинов у пациентов с рассеянным склерозом и взаимосвязь с герпетической инфекцией Н. С. Баранова, М. С. Грись, А. А. Баранов, Н. Н. Спирин, А. С. Артюхов, К. М. Шакирова, Е. Л. Насонов <b>Clinical significance of cytokine counting in patients with multiple sclerosis and its relationship with herpes infection</b> Baranova NS, Gris MS, Baranov AA, Spirin NN, Artyuhov AS, Shakirova KM, Nasonov EL	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>66</b>
Улучшение речи у детей с ДЦП на фоне реабилитации с применением нейроинтерфейса "мозг-компьютер-экзоскелет кисти" В. Б. Павленко, С. В. Власенко, Л. С. Орехова, Е. А. Бирюкова <b>Speech improvement in children with cerebral palsy by "brain-computer-hand exoskeleton" neurointerface rehabilitation</b> Pavlenko VB, Vlasenko SV, Orekhova LS, Biryukova EA	
<b>МНЕНИЕ</b>	<b>73</b>
Перспективные биохимические маркеры болезни Паркинсона О. А. Гусякова, С. В. Смирнов, О. Ю. Кузнецова, А. Р. Апергенова, А. Р. Альбикова <b>Promising biochemical markers of Parkinson's disease</b> Gusyakova OA, Smirnov SV, Kuznetsova OYu, Apergenova AR, Albikova AR	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>78</b>
Биохимическое и морфологическое обоснование соединительнотканной гипотезы прорезывания нижних третьих моляров А. С. Коршунов, В. Д. Вагнер, Л. В. Бельская, К. Н. Курятников, Д. О. Серов, В. А. Краснов, Г. О. Тигранян, И. А. Бондарь <b>Biochemical and morphological substantiation of the connective tissue hypothesis of mandibular third molar eruption</b> Korshunov AS, Vagner VD, Belskaya LV, Kuryatnikov KN, Serov DO, Krasnov VA, Tigranyan GO, Bondar IA	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>88</b>
Исследование антибактериальной, антиадгезивной и антибиопленкообразующей активности растительных комплексов в отношении пародонтопатогенных бактерий <i>in vitro</i> М. А. Носова, И. И. Латиф, Л. А. Краева, Г. Н. Хамдулаева, А. Н. Шаров, И. С. Копецкий, Д. А. Еремин, Е. В. Постникова, М. А. Постников <b>Antibacterial, anti-adhesive and anti-biofilm-forming activity of plant complexes against periodontopathogenic bacteria <i>in vitro</i></b> Nosova MA, Latif II, Kraeva LA, Khamdulaeva GN, Sharov AN, Kopetskiy IS, Eremin DA, Postnikova EV, MA Postnikov	

## ОЦЕНКА МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК С ГИБРИДНЫМ ФЕНОТИПОМ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Р. Х. Мухамеджанов<sup>1,4</sup>, Е. С. Григорьева<sup>2</sup>, Л. А. Таширева<sup>2</sup>, В. М. Перельмутер<sup>2</sup>, М. В. Завьялова<sup>1,2</sup>, О. Е. Савельева<sup>2,3</sup>✉<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия<sup>4</sup> Областная детская клиническая больница, Владимир, Россия

Изучению циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в последнее время уделяют большое внимание, благодаря их ведущей роли в формировании отдаленных метастазов. В то же время мало данных о свойствах циркулирующих клеток с одновременной экспрессией лейкоцитарных и эпителиальных маркеров и их возможной роли в опухолевой прогрессии и резистентности к химиотерапии. Целью исследования было изучить субпопуляции клеток с гибридным эпителиально-лейкоцитарным фенотипом, а также оценить признаки стволовости, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и интегриновый интерфейс, обуславливающие их возможные метастатические свойства при раке молочной железы (РМЖ). В работу включены данные исследования 128 больных инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы. Для оценки популяционного состава и метастатического потенциала циркулирующих в крови клеток и клеток первичной опухоли с гибридным фенотипом использовали метод многоцветной проточной цитометрии. Суспензию клеток первичной опухоли готовили методом механической дезагрегации. В популяции клеток с гибридным фенотипом отмечена высокая степень гетерогенности, включая комбинацию признаков стволовости, ЭМП и разнообразный интегриновый интерфейс. Клетки с гибридным фенотипом принимают участие в механизмах лимфогенного и гематогенного метастазирования. При лимфогенном метастазировании метастатический потенциал этих клеток ассоциирован с признаками стволовости ( $p = 0,0422$ ) и коэкспрессией  $\beta 3$ -,  $\beta 4$ - и  $\alpha V\beta 5$ -интегринов ( $p = 0,0338$ ). При гематогенном метастазировании метастатический потенциал гибридных клеток ассоциирован с признаками стволовости ( $p = 0,015$ ) и не связан с признаками ЭМП и экспрессией интегринов.

**Ключевые слова:** гибридные клетки, циркулирующие опухолевые клетки, метастазы, стволовость, эпителиально-мезенхимальный переход, интегрины

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 21-15-00140.

**Вклад авторов:** Р. Х. Мухамеджанов — анализ литературы, получение и статистическая обработка результатов, написание статьи; Е. С. Григорьева — получение и анализ данных, написание статьи; Л. А. Таширева — дизайн исследования, редактирование статьи; В. М. Перельмутер — интерпретация результатов, редактирование статьи; М. В. Завьялова — планирование исследования, редактирование статьи; О. Е. Савельева — планирование и руководство исследованием, анализ и интерпретация результатов, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 10 от 24 апреля 2015 г.), проведено в соответствии с федеральными законами Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларацией 1964 г. и всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериале, полученном у людей. Все участники подписали информированное добровольное согласие об участии в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Евгеньевна Савельева  
ул. Литовская, д. 2, г. Санкт-Петербург, 194100; olga\_chechina@mail.ru

**Статья получена:** 04.07.2023 **Статья принята к печати:** 22.08.2023 **Опубликована онлайн:** 31.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.033

## ASSESSMENT OF METASTATIC TRAITS OF THE CELLS WITH HYBRID PHENOTYPE IN BREAST CANCER

Mukhamedzhanov RK<sup>1,4</sup>, Grigoryeva ES<sup>2</sup>, Tashireva LA<sup>2</sup>, Perelmutter VM<sup>2</sup>, Zavyalova MV<sup>1,2</sup>, Savelieva OE<sup>2,3</sup>✉<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia<sup>2</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia<sup>3</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia<sup>4</sup> Regional Children's Clinical Hospital, Vladimir, Russia

Nowadays, great attention is paid to the study of circulating tumor cells (CTCs) due to their key role in distant metastasis. At the same time there is little data on the properties of circulating cells showing simultaneous expression of the leukocyte and epithelial markers and their possible role in tumor progression and chemotherapy resistance. The study was aimed to assess subpopulations of cells with hybrid epithelial/leukocyte phenotype and estimate the features of stemness, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and integrin interface, which determine the cells' possible metastatic properties in breast cancer (BC). The survey data from 128 patients with invasive breast carcinoma of no special type were included. Multicolor flow cytometry was used to assess the population structure and metastatic potential of the cells circulating in blood and primary tumor cells with hybrid phenotype. The primary tumor cell suspension was prepared by mechanical disaggregation. The high degree of heterogeneity was noted in the population of cells with hybrid phenotype, including the combination of the stemness and EMT features, and diverse integrin interface. Cells with hybrid phenotype are involved in the mechanisms underlying lymph node and distant metastasis. In lymph node metastasis, metastatic potential of these cells is associated with the stemness features ( $p = 0.0422$ ) and co-expression of  $\beta 3$ -,  $\beta 4$ -, and  $\alpha V\beta 5$ -integrins ( $p = 0.0338$ ). In distant metastasis, metastatic potential of hybrid cells is associated with the stemness features ( $p = 0.015$ ) and is not associated with the EMT features and integrin expression.

**Keywords:** hybrid cells, circulating tumor cells, metastasis, stemness, epithelial-mesenchymal-transition, integrins

**Funding:** the study was supported by the RSF grant № 21-15-00140.

**Author contribution:** Mukhamedzhanov RK — literature analysis, data acquisition and statistical processing, manuscript writing; Grigoryeva ES — data acquisition and analysis, manuscript writing; Tashireva LA — study design, manuscript editing; Perelmutter VM — data interpretation, manuscript editing; Zavyalova MV — study planning, manuscript editing; Savelieva OE — study planning and management, data analysis and interpretation, manuscript writing.

**Compliance with the ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (protocol № 10 of 24 April 2015) and conducted in accordance with the Federal Laws of the Russian Federation (№ 152, 323, etc.), the Declaration of Helsinki (1964) and all subsequent amendments and supplements regulating the research involving human biomaterials. The informed consent to study participation was submitted by all subjects.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga E. Savelieva  
Litovskaya, 2, Saint-Petersburg, 194100; olga\_chechina@mail.ru

**Received:** 04.07.2023 **Accepted:** 22.08.2023 **Published online:** 31.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.033



Изучению циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в последнее время уделяют большое внимание. Это обусловлено их ведущей ролью в формировании отдаленных метастазов и, как следствие, в неблагоприятных исходах онкологических заболеваний. В настоящий момент имеются данные об их субпопуляционном составе [1], стволовых свойствах [2], эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) [3], резистентности к проводимой химиотерапии [4], а также опубликованы данные их геномного профилирования [5]. Кроме того, показано значение экспрессии интегринов на ЦОК для метастазирования при раке молочной железы (РМЖ), а интегриновый интерфейс ЦОК может быть связан с локализацией отдаленных метастазов [6–7]. Представлены также данные о связи количества этих клеток в периферической крови с выживаемостью и риском развития отдаленных метастазов при РМЖ [8], легкого [9], яичников [10], колоректального рака [11] и др. Так, в 2019 г. было показано, что наличие ЦОК с признаками стволовости и частичного ЭМП ассоциировано с неблагоприятным исходом заболевания и снижением общей выживаемости. Клетки с тем же фенотипом показали себя резистентными к химиотерапии [12].

При изучении различных популяций ЦОК нами были обнаружены необычные клетки с одновременной экспрессией лейкоцитарного маркера CD45 и эпителиального маркера CD326 (EpCAM). Оказалось, что другие исследователи получали схожие результаты. Так, в крови пациенток с РМЖ были обнаружены клетки с фенотипом CD45<sup>+</sup>Ск<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>, среди которых в 90% случаев была отмечена и экспрессия маркера макрофагов CD68 [13]. Клетки с фенотипом CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> были обнаружены в первичной опухоли и плевральном выпоте у всех обследованных пациентов с немелкоклеточным раком легкого, причем большее процентное содержание таких клеток было ассоциировано с плохим прогнозом [14].

Наиболее вероятным механизмом образования клеток с одновременной экспрессией лейкоцитарных и эпителиальных маркеров является гибридизация (межклеточное слияние) опухолевых клеток с макрофагами или лейкоцитами. Образование гибридных клеток отмечено при многих физиологических процессах организма, таких как образование мышечной и костной ткани, заживление ран [15]. Физиологическую роль CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>-клеток подтверждает их обнаружение в крови у здоровых доноров. Однако биологическое значение этих клеток, а также их роль в физиологических и патологических процессах до сих пор не ясны.

В связи с малоизученностью клеток с одновременной экспрессией лейкоцитарных и эпителиальных маркеров и данных об их возможной роли в опухолевой прогрессии и резистентности к химиотерапии [16] целью нашего исследования было изучить субпопуляции клеток с гибридным эпителиально-лейкоцитарным фенотипом, а также оценить признаки стволовости, ЭМП и интегриновый интерфейс, обуславливающие их возможные метастатические свойства при РМЖ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Пациенты

В работу включены результаты исследования 128 пациентов. Критерии включения в исследование: наличие инвазивной карциномы неспецифического типа молочной

железы; возраст от 29 до 76 лет (средний возраст: 52,56 ± 11,57; T1-4N0-3M0-1), проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2015 по 2020 гг., включительно. Критерии исключения: наличие других гистологических типов рака молочной железы; наличие первично множественных злокачественных опухолей; наличие хронических воспалительных заболеваний в стадии обострения. Для оценки популяционного состава и метастатических характеристик циркулирующих клеток с гибридным фенотипом венозную кровь забирали у 108 пациентов до проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). Оценку ассоциации клеток с гибридным фенотипом с наличием лимфогенных и гематогенных метастазов проводили в группе пациентов, которым не проводили НАХТ ( $n = 79$ ). Для оценки свойств популяций клеток с гибридным фенотипом первичной опухоли проводили исследование операционного материала, полученного у 35 пациентов в результате хирургического лечения (радикальной мастэктомии или секторальной резекции ткани первичной опухоли молочной железы). Неoadъювантную терапию указанным пациентам не назначали. Основные клинико-морфологические параметры представлены в табл. 1.

### Подготовка образцов для проточной цитометрии

Венозную кровь брали у больных до проведения курсов НАХТ и хирургического этапа лечения утром натощак в объеме 12 мл в вакуумные пробирки с ЭДТА. Из всего объема крови готовили клеточный концентрат путем отстаивания при 37 °С в течение 90 мин под углом в 45° с последующим сбором белого кольца с клетками на границе осадка эритроцитов и отделившейся плазмы крови, а также всего надосадка, согласно методике Р. А. Поспеловой [17].

Свежие образцы опухоли подвергали механической дезагрегации с использованием BD Medimachine System (BD; США) для получения клеточных суспензий. Общую клеточность полученных суспензий определяли с помощью счетчика клеток Luna-II (Logos Biosystems; Корея).

### Проточная цитометрия образцов и обработка данных

После Fc-блокирования раствором Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution (Biolegend; США) в клеточный концентрат и/или суспензию клеток первичной опухоли добавляли по 5 мкл моноклональных антител BV570 anti-human CD45 (клон HI30; Sony Biotechnology, США), BV650 anti-human CD326 (EpCAM) (клон 9C4; Sony Biotechnology, США), BV510 anti-human CD44 (клон G44-26; BD Horizon, США), PerCP/Cy5.5 anti-human CD24 (клон ML5; Sony Biotechnology, США), PE/Cy7 anti-human N-Cadherin (клон 8C11; Sony Biotechnology, США) и 7-AAD Viability Staining Solution (Sony Biotechnology; США) и инкубировали в темноте, при комнатной температуре 20 мин. В клеточный концентрат добавляли также по 5 мкл моноклональных антител BV 421-anti-β3 integrin (клон VI-PL2; BD Biosciences, США), Alexa Fluor 488-anti-β4 integrin (клон 422325; R&D Systems, США), BV Alexa Fluor 750-anti-αVβ5 integrin (клон P5H9; R&D Systems, США). Параллельно ставили неокрашенный контроль. После инкубации для лизирования эритроцитов к образцам добавляли 500 мкл буфера OptiLyse C (Beckman Coulter; Франция) и отмывали в 2 мл раствора CellWASH (BD Biosciences; США) в течение 10 мин при 300 г с последующим удалением надосадка. На этапе внутриклеточного окрашивания

Таблица 1. Характеристика пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы

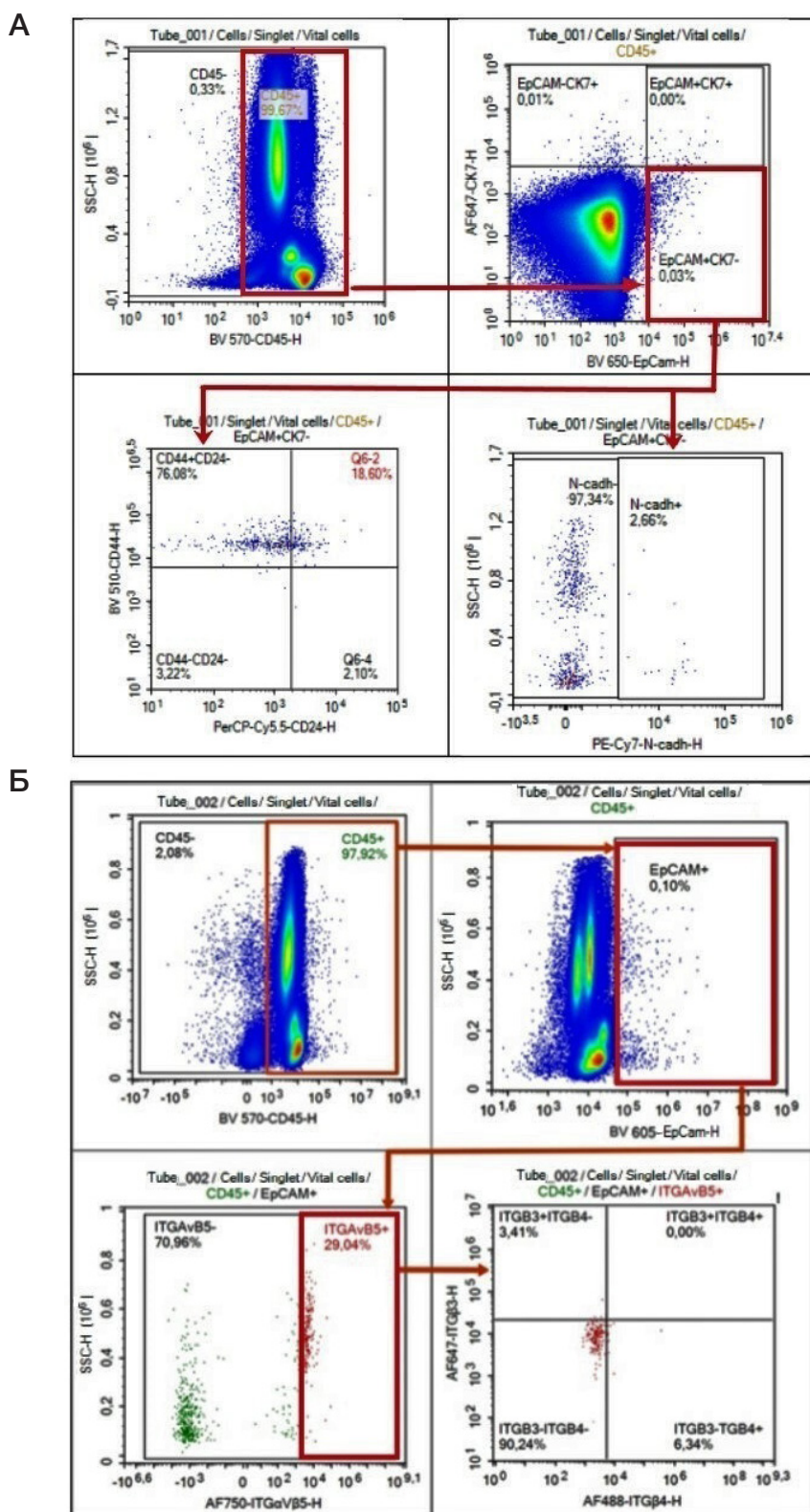
Параметр	Значение параметров	Частота встречаемости, % (абс. ч.)
Возраст	52,56 ± 11,57	
Молекулярно-генетический подтип	Люминальный А	32,8% (42/128)
	Люминальный В	47,7% (61/128)
	Тройной негативный	15,6% (20/128)
	HER2neu+	3,9% (5/128)
Стадия	1	25,0% (32/128)
	2А	48,4% (62/128)
	2В	17,2% (22/128)
	3А	1,6% (2/128)
	3В	4,7% (6/128)
	3С	3,1% (4/128)
Лимфогенные метастазы	Есть	34,4% (44/128)
	Нет	65,6% (84/128)
Гематогенные метастазы	Есть	9,4% (12/128)
	Нет	90,6% (116/128)
Рецепторы эстрогена	Есть	80,5% (103/128)
	Нет	19,5% (25/128)
Рецепторы прогестерона	Есть	71,9% (92/128)
	Нет	28,1% (36/128)
Рецепторы HER2	Есть	51,6% (66/128)
	Нет	48,4% (62/128)
Ki67	< 20%	35,9% (46/128)
	> 20%	64,1% (82/128)
Размер опухоли	До 2 см	28,1% (36/128)
	2–5 см	67,2% (86/128)
	> 5 см	4,7% (6/128)
Состояние менструальной функции	Менопауза	41,4% (53/128)
	Сохранена	54,7% (70/128)
	Перименопауза	3,9% (5/128)
Неoadъювантная химиотерапия	Проводили	38,3% (49/128)
	Не проводили	61,7% (79/128)
Степень злокачественности	1	17,2% (22/128)
	2	63,3% (81/128)
	3	19,5% (25/128)
Наличие рецидивов	Есть	5,5% (7/128)
	Нет	94,5% (121/128)

к каждому неокрашенному и окрашенному образцу добавляли 250 мкл раствора BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences; США) и инкубировали в темноте 30 мин при 4 °С, затем дважды отмывали в 1 мл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences; США), центрифугируя при 300 g 6 мин. К пробам добавляли 50 мкл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences; США), в окрашенную пробу добавляли по 5 мкл антител AF647-anti-human CK7/8 (клон CAM5.2; BD Pharmingen, США) и инкубировали при 4 °С в течение 20 мин. Затем отмывали каждую пробу в 1 мл буфера CellWASH (BD Biosciences; США) центрифугированием при 300 g 6 мин. На заключительном этапе к осадку добавляли 500 мкл Cell Staining Buffer (Sony Biotechnology; США) и ресуспендировали образец.

Контроль неспецифического окрашивания проводили с помощью соответствующих изотипических антител. В качестве положительного контроля для антител к эпителиальным маркерам EpCAM и CK7/8 и отрицательного

контроля для CD45 использовали клеточную линию РМЖ MCF-7. В качестве отрицательного контроля антител к вышеуказанным эпителиальным маркерам и положительного контроля для CD45 использовали клеточную линию гистиоцитарной лимфомы U937.

Анализ образцов осуществляли на проточном цитометре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences; США) с помощью NovoExpress 1.3.0 (ACEA Biosciences; США). Концентрацию циркулирующих клеток рассчитывали на 1 мл крови, концентрацию клеток первичной опухоли — на 1000 опухолевых клеток. При гейтировании клеток с гибридным фенотипом клетки сначала анализировали в режиме FSC vs SSC, затем выделяли синглеты в режиме FSC-A vs FSC-H, далее выделяли жизнеспособные клетки по негативному окрашиванию 7-AAD, затем анализировали параметры флюоресценции клеток в соответствующих каналах. Стратегия гейтирования клеток с гибридным фенотипом представлена на рис. 1.



**Рис. 1.** Схема гейтирования популяций клеток с гибридным фенотипом для оценки экспрессии лейкоцитарного и эпителиальных маркеров, маркеров стволовости, ЭМП (А) и интегринальных рецепторов (Б) на примере циркулирующих в крови клеток

#### Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ IBM SPSS Statistics 22 (Armonk; USA) и GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software; США). Все исследуемые параметры были проверены на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Параметры описывали с помощью медианы (Me)

и интерквартильного интервала ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Оценку различий параметров осуществляли при помощи критериев Манна-Уитни и Уилкоксона. Для оценки различий частот встречаемости признаков использовали точный критерий Фишера. Для определения взаимосвязи между признаками рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  (5%).

Таблица 2. Частота встречаемости клеток с гибридным фенотипом у пациентов с раком молочной железы

№	Фенотип	Частота, %	Уровень значимости
Кровь			
1	CD45 <sup>+</sup> ЕpCAM <sup>+</sup> СК7/8 <sup>-</sup>	93,5% (101/108)	$p_{1-2} = 0,1137$ ; $p_{1-3} = 0,0045$
2	CD45 <sup>+</sup> ЕpCAM <sup>+</sup> СК7/8 <sup>+</sup>	86,1% (93/108)	$p_{2-3} = 0,2785$
3	CD45 <sup>-</sup> ЕpCAM <sup>-</sup> СК7/8 <sup>+</sup>	79,6% (86/108)	
Первичная опухоль			
4	CD45 <sup>+</sup> ЕpCAM <sup>+</sup> СК7/8 <sup>-</sup>	94,6% (35/37)	$p_{4-1} = 1,0000$ ; $p_{4-5} = 0,0123$ ; $p_{4-6} = 0,0001$
5	CD45 <sup>+</sup> ЕpCAM <sup>+</sup> СК7/8 <sup>+</sup>	70,3% (26/37)	$p_{5-2} = 0,0452$ ; $p_{5-6} = 0,2305$
6	CD45 <sup>-</sup> ЕpCAM <sup>-</sup> СК7/8 <sup>+</sup>	54,1% (20/37)	$p_{6-3} = 0,0046$

В качестве многофакторного метода для оценки взаимосвязи признаков, а также построения прогностических моделей использовали метод логистической регрессии. Пороговый уровень показателей для построения математических моделей определяли с помощью ROC-анализа. Вероятность развития события рассчитывали по формуле:  $P = e^Y / (1 + e^Y)$ , где  $P$  — значение вероятности развития признака;  $Y$  — значение уравнения регрессии;  $e$  — математическая константа, равная 2,72. При вероятности  $P \geq 50\%$  риск развития события считали высоким, при вероятности  $P < 50\%$  — низким. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  (5%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Субпопуляционный состав клеток с гибридным фенотипом

С помощью метода проточной цитометрии была проведена оценка экспрессии лейкоцитарного маркера CD45 и эпителиальных маркеров ЕpCAM и СК7/8 в циркулирующих клетках и клетках первичной опухоли. Популяции CD45<sup>+</sup>-клеток с коэкспрессией двух эпителиальных маркеров (CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>+</sup>СК7/8<sup>+</sup>) и моноэкспрессией одного из эпителиальных маркеров (CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>-</sup>СК7/8<sup>+</sup>) были обнаружены в крови и первичной опухоли большинства пациентов (табл. 2).

Самая часто встречающаяся и многочисленная популяция и в крови, и в первичной опухоли была представлена клетками с фенотипом CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup> (табл. 2; рис. 2А).

Статистически значимых корреляционных взаимосвязей количества клеток с гибридным фенотипом в крови и первичной опухоли больных РМЖ обнаружено не было.

### Оценка метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом

Приобретение опухолевыми клетками, в том числе и ЦОК, признаков стволовости и ЭМП ассоциировано с их способностью к самообновлению, резистентности к противоопухолевой терапии и увеличению их метастатического потенциала [3, 12, 18]. Кроме того, экспрессия интегринов в ЦОК играет значимую роль в метастазировании и, вероятно, способствует нацеливанию этих клеток в отдаленные органы, определяя тем самым локализацию будущих метастазов [6–7]. Аналогичными свойствами могут обладать и ЦОК с гибридным фенотипом. В связи с этим мы провели анализ метастатического потенциала клеток с гибридным фенотипом, циркулирующих в крови, и клеток первичной

опухоли путем оценки признаков стволовости, ЭМП и экспрессии интегриновых рецепторов.

### Оценка признаков стволовости

Результаты анализа признаков стволовости в популяциях клеток с гибридным фенотипом в крови и первичной опухоли методом проточной цитометрии представлены в табл. 3 и на рис. 2Б. Установлено, что признаки стволовости встречались во всех популяциях клеток с гибридным фенотипом, как в крови, так и в первичной опухоли. Однако достоверных различий в частотах встречаемости клеток со стволовыми свойствами и без таковых обнаружено не было. Клетки с фенотипом CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> и CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> в первичной опухоли встречались реже, чем в крови ( $p = 0,0126$  и  $p = 0,0081$  соответственно) (табл. 3).

При количественной оценке популяций клеток с гибридным фенотипом было установлено, что в крови преобладали клетки с моноэкспрессией эпителиального маркера ЕpCAM без признаков стволовости CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> ( $p = 0,0306$ ), в опухоли среди CD45<sup>+</sup>ЕpCAM<sup>-</sup>СК7/8<sup>-</sup>-клеток было достоверно больше гибридов со стволовыми свойствами ( $p = 0,0233$ ) (рис. 2Б).

### Оценка признаков ЭМП

Оценку признаков ЭМП в популяциях клеток с гибридным фенотипом проводили путем детекции в них N-кадгерина методом проточной цитометрии (табл. 4; рис. 2В).

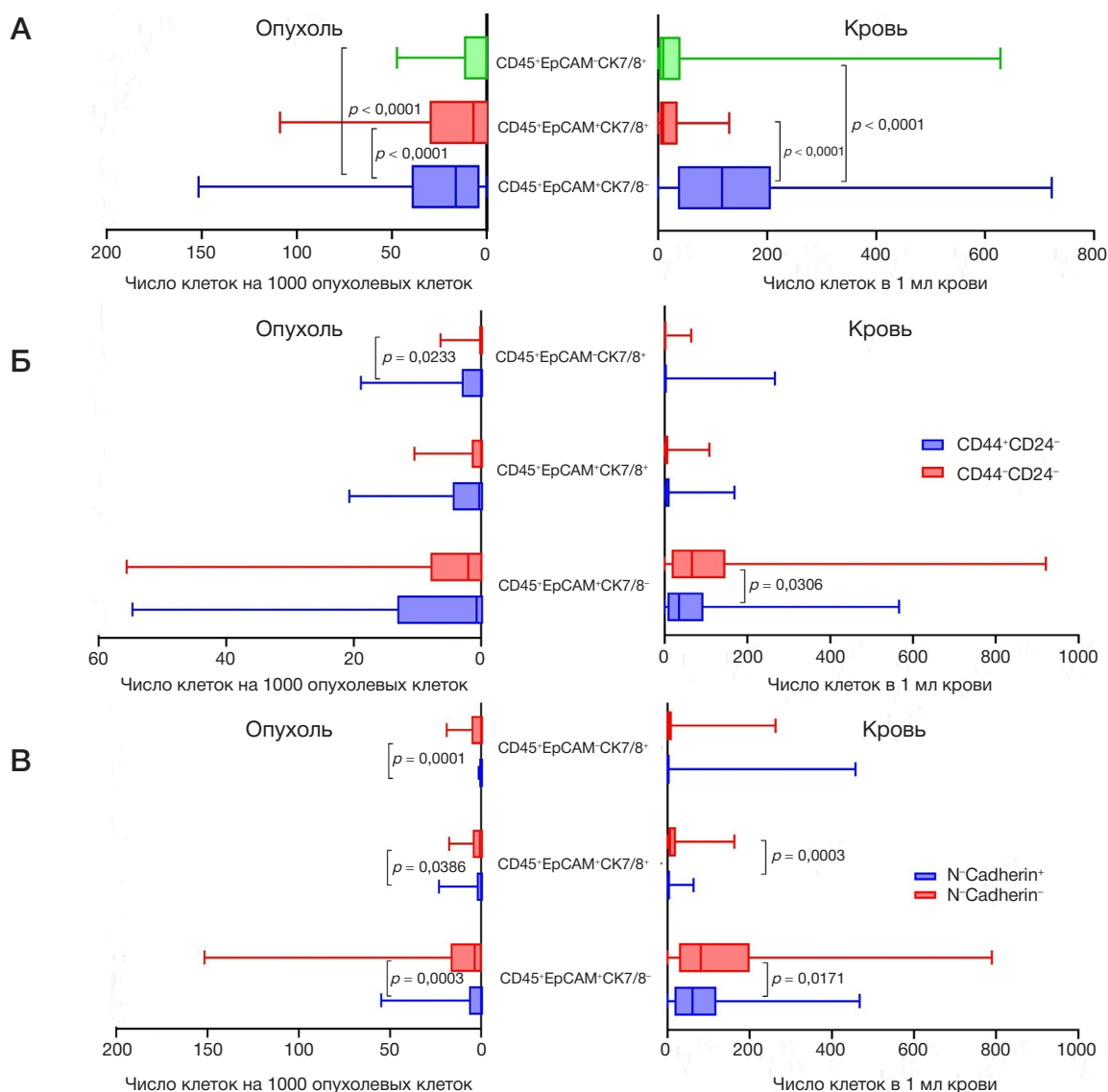
Экспрессия N-кадгерина встречалась во всех популяциях клеток с гибридным фенотипом и в крови, и в первичной опухоли. Однако частота встречаемости N-кадгерин-позитивных клеток была достоверно ниже, чем N-кадгерин-негативных клеток (табл. 4).

При количественной оценке клеток с признаками ЭМП было установлено, что и в крови, и в первичной опухоли клеток с гибридным фенотипом, экспрессирующих N-кадгерин, было меньше, чем клеток без его экспрессии (рис. 2В).

### Оценка интегринового интерфейса

Результаты анализа экспрессии интегриновых молекул  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  и  $\alpha V\beta 5$  в циркулирующих клетках с гибридным фенотипом методом проточной цитометрии представлены в табл. 5 и на рис. 3. При оценке частоты встречаемости изучаемых клеток было установлено, что реже всего обнаруживаются клетки с фенотипом  $\beta 3^+\beta 4^+\alpha V\beta 5^+$  ( $p = 0,0003$ ) (табл. 5).





**Рис. 2.** Число клеток с гибридным фенотипом в крови и первичной опухоли пациентов с раком молочной железы. **А.** Число клеток с различным сочетанием экспрессии лейкоцитарного маркера CD45 и эпителиальных маркеров EpCAM и CK7/8. **Б.** Число клеток с признаками стволовости. **В.** Число клеток с признаками эпителиально-мезенхимального перехода

Количество циркулирующих клеток с гибридным фенотипом и экспрессией  $\beta 3$ - и/или  $\beta 4$ - и/или  $\alpha \beta 5$ -интегриновых рецепторов (ITG<sup>+</sup>) было достоверно выше ( $p = 0,0002$ ), чем клеток без экспрессии указанных молекул (ITG<sup>-</sup>) (рис. 3).

#### Ассоциация метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом с наличием лимфогенных метастазов

Сравнительный анализ метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом позволил выявить ассоциацию клеток с признаками стволовости и экспрессией интегриновых молекул с наличием лимфогенных метастазов (ЛМ).

Так, количество «стволовых» CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>-клеток оказалось достоверно выше ( $p = 0,0422$ ) в крови пациенток с ЛМ, чем у пациенток без такового (рис. 4).

У пациенток без ЛМ количество клеток ITG<sup>-</sup> и ITG<sup>+</sup> с гибридным фенотипом было достоверно выше, чем у пациенток с наличием ЛМ ( $p = 0,0103$  и  $p = 0,0031$  соответственно) (рис. 4). В то же время у больных с ЛМ

отмечалось достоверно большее количество ITG<sup>+</sup> клеток ( $p = 0,0002$ ), по сравнению с количеством ITG<sup>-</sup>-клеток. Также было обнаружено увеличение количества  $\beta 3^+\beta 4^+\alpha \beta 5^+$ -клеток ( $p = 0,0338$ ) в крови пациенток с ЛМ по сравнению с пациентками без метастазов (рис. 4).

Математические модели, построенные с помощью метода логистической регрессии, подтверждают роль клеток с гибридным фенотипом в процессах лимфогенного метастазирования.

Так, риск развития ЛМ у больных РМЖ оказался связан с наличием в крови клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup>CK7/8<sup>+</sup> с признаками стволовости. Математическая модель имеет следующий вид:

$$Y = -2,4 + 2,7X_1 - 1,0X_2,$$

где  $Y$  — значение уравнения регрессии;  $-2,4$  — значение коэффициента регрессии свободного члена;  $X_1$  — значение уровня CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>-гибридных клеток в крови ( $X_1 = 1$  при количестве менее 14,94 клеток в 1 мл крови,  $X_1 = 2$  при количестве более 14,94 клеток в 1 мл крови);  $2,7$  — значение коэффициента регрессии этого признака;



Таблица 3. Частота встречаемости клеток с гибридным фенотипом и признаками стволовости у пациентов с раком молочной железы

	№	Фенотип	Частота, %	Уровень значимости
Кровь	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup>			
	1	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	85,7% (54/63)	$p_{1-2} = 0,0540$
	2	CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	96,8% (61/63)	
	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>+</sup>			
	3	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	77,8% (49/63)	$p_{3-4} = 0,4179$
	4	CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	69,8% (44/63)	
CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>+</sup>				
5	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	47,6% (30/63)	$p_{5-6} = 0,4760$	
6	CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	55,6% (35/63)		
Первичная опухоль	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup>			
	7	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	62,2% (23/37)	$p_{7-8} = 0,2030; p_{7-1} = 0,0126$
	8	CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	78,4% (29/37)	
	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>+</sup>			
	9	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	51,4% (19/37)	$p_{9-10} = 0,3497; p_{9-3} = 0,0081$
	10	CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	37,8% (14/37)	
	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>+</sup>			
	11	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>	43,2% (16/37)	$p_{11-12} = 0,0811; p_{11-5} = 0,6842$
12	CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup>	21,6% (8/37)		

$X_2$  — значение уровня CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>-клеток в крови ( $X_2 = 1$  при количестве более 2,49 клеток в 1 мл крови,  $X_2 = 2$  при количестве менее 2,49 клеток в 1 мл крови); -1,0 — значение коэффициента регрессии этого признака.

Чувствительность модели составляет 79%, специфичность — 85% ( $\chi^2 = 18,49; p = 0,0001$ ).

Таким образом, исследование показало наличие у клеток с гибридным фенотипом свойств стволовости и коэкспрессии  $\beta 3^-$ ,  $\beta 4^-$  и  $\alpha V\beta 5^-$ -интегринов, которые, вероятно, вносят вклад в механизмы формирования лимфогенных метастазов при РМЖ.

#### Ассоциация метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом с наличием гематогенных метастазов

При сравнительном анализе метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом было обнаружено, что с наличием гематогенных метастазов (ГМ) у больных ассоциированы клетки без признаков ЭМП и стволовости.

Так, у пациенток с ГМ отмечено достоверное увеличение количества клеток CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>N-cadh<sup>-</sup> и CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>N-cadh<sup>-</sup> ( $p = 0,021$  и  $p = 0,033$  соответственно) по сравнению с больными без ГМ и снижение количества клеток CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>N-cadh<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>N-cadh<sup>+</sup> ( $p = 0,0079$  и  $p = 0,0079$  соответственно) по сравнению с N-кадгерин-негативными клетками (рис. 5).

Количество CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>-клеток при ГМ было достоверно ниже, чем CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>-клеток ( $p = 0,015$ ) (рис. 5).

Достоверных различий между количеством клеток с гибридным фенотипом, имеющих и не имеющих признаки стволовости и ЭМП, в первичной опухоли при ГМ обнаружено не было.

Сравнительный анализ свойств циркулирующих клеток с гибридным фенотипом при ГМ показал изменение количества клеток с экспрессией интегринавых молекул (рис. 6).

У пациенток без ГМ и с наличием такого количества ITG<sup>-</sup>-клеток с гибридным фенотипом было достоверно ниже, чем количество ITG<sup>+</sup>-клеток ( $p = 0,0100$  и  $p = 0,0009$  соответственно) (рис. 6). Было также обнаружено снижение количества  $\beta 3^- \beta 4^- \alpha V\beta 5^-$ -циркулирующих клеток ( $p = 0,0394$ ) при ГМ по сравнению с его отсутствием (рис. 6).

Риск развития ГМ у больных РМЖ оказался связан с наличием в крови CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>-клеток независимо от наличия признаков стволовости и ЭМП и CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>-клеток с признаками стволовости. Математическая модель имеет вид:

$$Y = 63,5 - 31,8X_1 - 30,0X_2,$$

где  $Y$  — значение уравнения регрессии; 63,5 — значение коэффициента регрессии свободного члена;  $X_1$  — значение количества CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>-гибридных клеток в крови ( $X_1 = 1$  при количестве менее 14,94 клеток в 1 мл крови,  $X_1 = 2$  при количестве более 14,53 клеток в 1 мл крови); -31,8 — значение коэффициента регрессии этого признака;  $X_2$  — количество CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>-клеток в крови ( $X_2 = 1$  при количестве более 2,49 клеток в 1 мл крови,  $X_2 = 2$  при количестве менее 2,49 клеток в 1 мл крови); -30,0 — значение коэффициента регрессии этого признака.

Чувствительность модели составляет 100,0%, специфичность — 98,3% ( $\chi^2 = 29,52; p = 0,0000004$ ).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биологический феномен гибридизации при опухолевых процессах по-прежнему является причиной для дискуссий и споров. Несмотря на многочисленные исследования *in vitro* и *in vivo* за последние десятилетия, все еще не получены твердые доказательства того, что опухолевые гибридные клетки могут приводить к прогрессии опухоли.

Одним из наиболее вероятных механизмов образования гибридных клеток считают межклеточное слияние нормальных клеток с опухолевыми. Так, в ходе исследований *in vitro* было отмечено спонтанное слияние

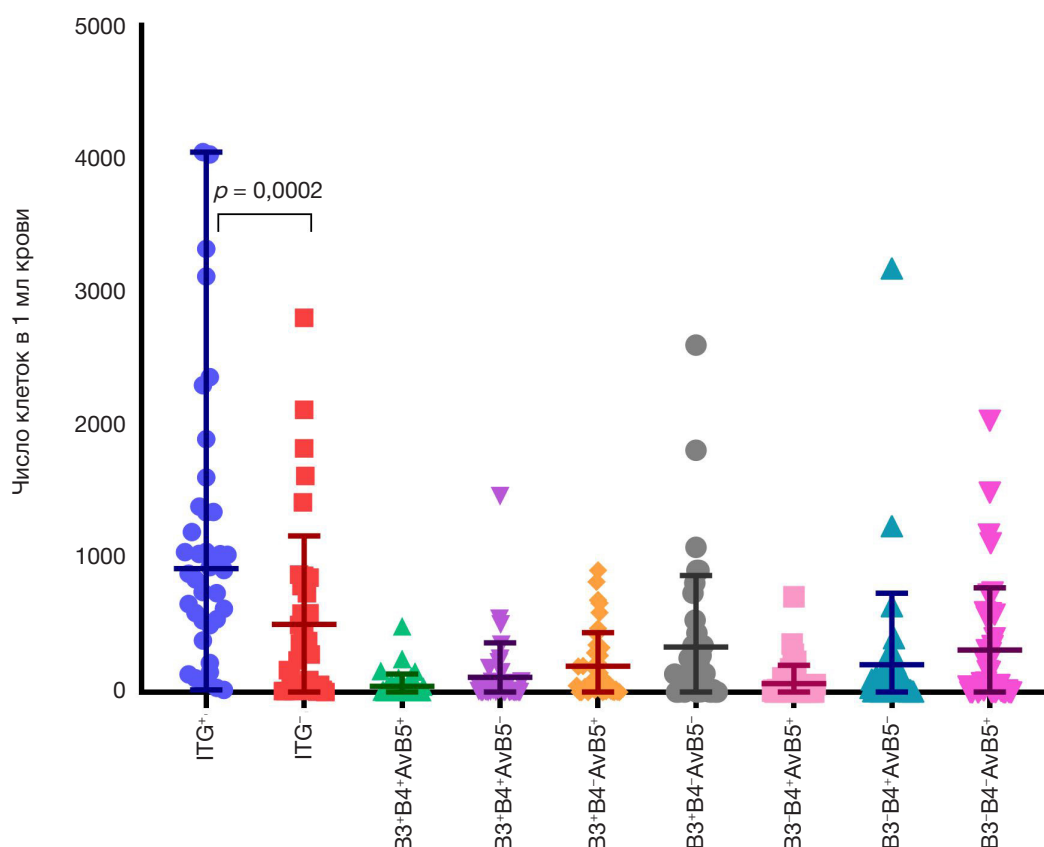


Рис. 3. Число клеток с гибридным фенотипом и экспрессией интегриновых молекул  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  и  $\alpha V\beta 5$  в крови пациентов с раком молочной железы

между клетками нормального эпителия молочной железы и опухолевыми клетками, между самими опухолевыми клетками, между опухолевыми эпителиальными клетками и эндотелиальными клетками, между опухолевыми эпителиальными клетками и стромальными клетками [19]. Замечено также, что процессы межклеточного слияния и образования гибридных клеток усиливаются после применения радио- и химиотерапии, что вызвано формированием локального воспаления в опухолевом

микроокружении и процессами тканевой регенерации [20–21]. В настоящее время выяснение биологической природы клеток с гибридным фенотипом остается актуальной задачей.

Субпопуляционный анализ клеток с гибридным фенотипом показал, что эти клетки могут экспрессировать как один из эпителиальных маркеров EpCAM или CK7/8, так и оба. Согласно современным представлениям, маркеры EpCAM и CK7/8 экспрессируются преимущественно

Таблица 4. Частота встречаемости клеток с гибридным фенотипом и признаками ЭМП у пациентов с раком молочной железы

	№	Фенотип	Частота, %	Уровень значимости
Кровь	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup>			
	1	N-кадгерин <sup>+</sup>	92,1% (58/63)	$p_{1-2} = 0,7175$
	2	N-кадгерин <sup>-</sup>	95,2% (60/63)	
	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>+</sup>			
	3	N-кадгерин <sup>+</sup>	65,1% (41/63)	$p_{3-4} = 0,0235$
	4	N-кадгерин <sup>-</sup>	84,1% (53/63)	
CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>-</sup> CK7/8 <sup>+</sup>				
5	N-кадгерин <sup>+</sup>	52,4% (33/63)	$p_{5-6} = 0,5909$	
6	N-кадгерин <sup>-</sup>	58,7% (37/63)		
Первичная опухоль	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup>			
	7	N-кадгерин <sup>+</sup>	45,9% (17/37)	$p_{7-8} = 0,0004; p_{7-1} = 0,0000$
	8	N-кадгерин <sup>-</sup>	86,5% (32/37)	
	CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>+</sup>			
	9	N-кадгерин <sup>+</sup>	29,7% (11/37)	$p_{9-10} = 0,0340; p_{9-3} = 0,0009$
	10	N-кадгерин <sup>-</sup>	56,8 (21/37)	
CD45 <sup>+</sup> EpCAM <sup>-</sup> CK7/8 <sup>+</sup>				
11	N-кадгерин <sup>+</sup>	5,4% (2/37)	$p_{11-12} = 0,0001; p_{11-5} = 0,0000$	
12	N-кадгерин <sup>-</sup>	45,9% (17/37)		$p_{12-6} = 0,2988$

Таблица 5. Частота встречаемости клеток с гибридным фенотипом и экспрессией интегриновых молекул у пациентов с раком молочной железы

№	Фенотип	Частота, %	Уровень значимости
1	$\beta 3^+ \beta 4^+ \alpha V \beta 5^+$	64,1% (25/39)	$p_{1-8} = 0,0003$
2	$\beta 3^+ \beta 4^+ \alpha V \beta 5^-$	82,1% (32/39)	$p_{2-8} = 0,0564$
3	$\beta 3^+ \beta 4^- \alpha V \beta 5^+$	92,3% (36/39)	$p_{3-8} = 0,6151$
4	$\beta 3^+ \beta 4^- \alpha V \beta 5^-$	87,2% (34/39)	$p_{4-8} = 0,2002$
5	$\beta 3^- \beta 4^+ \alpha V \beta 5^+$	82,1% (32/39)	$p_{5-8} = 0,0564$
6	$\beta 3^- \beta 4^+ \alpha V \beta 5^-$	97,4% (38/39)	$p_{6-8} = 1,0000$
7	$\beta 3^- \beta 4^- \alpha V \beta 5^+$	97,4% (38/39)	$p_{7-8} = 1,0000$
8	$\beta 3^- \beta 4^- \alpha V \beta 5^-$	97,4% (38/39)	

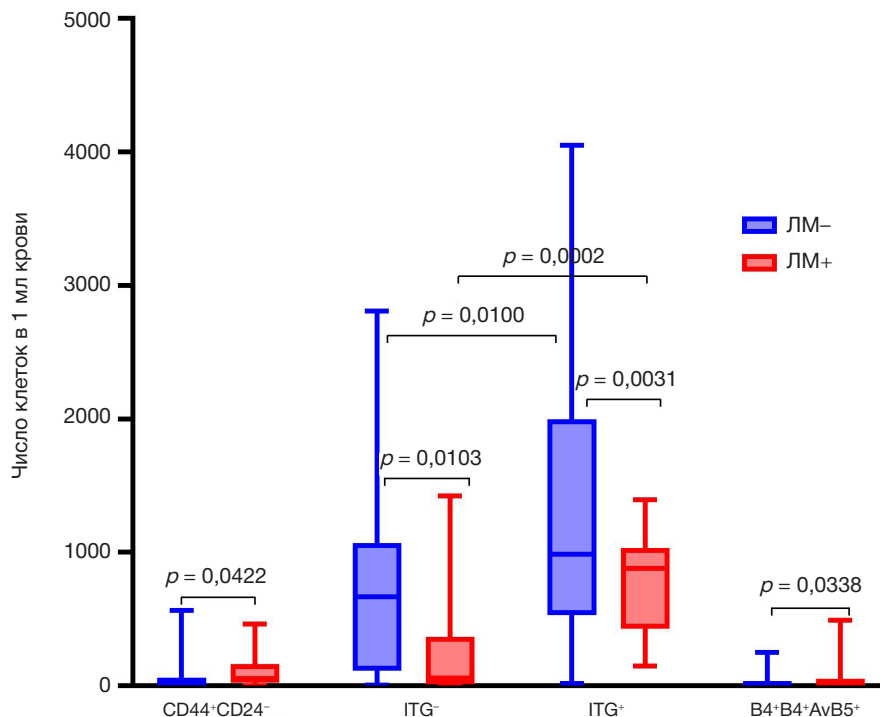
эпителиальными клетками [22]. Однако имеются данные о наличии экспрессии ЕpСAМ в клетках-предшественниках костномозгового происхождения, например, в ранних эритроидных предшественниках [23]. В физиологических условиях клетки-предшественники рекрутируются из костного мозга в процессе репаративной регенерации по мере необходимости [24]. При опухолевом процессе они участвуют в формировании и поддержании опухолевой и метастатических ниш и, следовательно, способствуют возникновению метастатического очага в отдаленных органах [25].

Таким образом, вероятнее всего, клетки с экспрессией СК7/8 и CD45 (CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>СК7/8<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>-</sup>СК7/8<sup>+</sup>) являются гибридами лейкоцитов или макрофагов и эпителиальных опухолевых клеток, в то время как популяция CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>-клеток может быть представлена как лейкоцитарно-эпителиальными гибридами, так и гемопоэтическими клетками-предшественниками костномозгового происхождения.

При оценке метастатических характеристик клеток с гибридным фенотипом установлено, что эти клетки принимают участие в механизмах ЛМ и ГМ. Так, по данным метода логистической регрессии при обоих видах метастазирования имеют место одни и те же закономерности: увеличение количества циркулирующих

CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>-клеток и снижение количества CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>-</sup>СК7/8<sup>+</sup>-клеток с признаками стволовости. Кроме того, при ЛМ в крови увеличивается количество CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup>-клеток с признаками стволовости и CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>-клеток с коэкспрессией  $\beta 3^-$ ,  $\beta 4^-$  и  $\alpha V \beta 5^-$  интегринов. При ГМ повышается количество CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>СК7/8<sup>-</sup> и CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>СК7/8<sup>+</sup>-клеток без признаков ЭМП и снижается количество этих же клеток с признаками ЭМП, а также CD45<sup>+</sup>ЕpСAМ<sup>+</sup>-клеток с моноэкспрессией интегрин  $\beta 4$ .

Приобретение гибридными клетками стволовых свойств может, по аналогии с ЦОК, способствовать их резистентности к противоопухолевой терапии и усилению метастатического потенциала. Увеличение количества  $\beta 3^-$ ,  $\beta 4^-$  и  $\alpha V \beta 5^-$ -экспрессирующих клеток с гибридным фенотипом при ЛМ тоже свидетельствует об усилении их метастатического потенциала. Интегрин  $\beta 3$  экспрессируется преимущественно тромбоцитами, гемопоэтическими клетками и ангиогенными эндотелиальными клетками и выполняет адгезивные функции при гемостазе, заживлении ран и ангиогенезе. Показана ассоциация интегрин  $\beta 3$  с опухолевым ростом, инвазией, возникновением метастазов в лимфоузлах и костном мозге и снижением выживаемости пациентов [26]. Интегрин  $\beta 4$  экспрессируют преимущественно эпителиальные клетки. При РМЖ

Рис. 4. Число клеток с гибридным фенотипом и экспрессией интегриновых молекул  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  и  $\alpha V \beta 5$  в крови пациентов с раком молочной железы

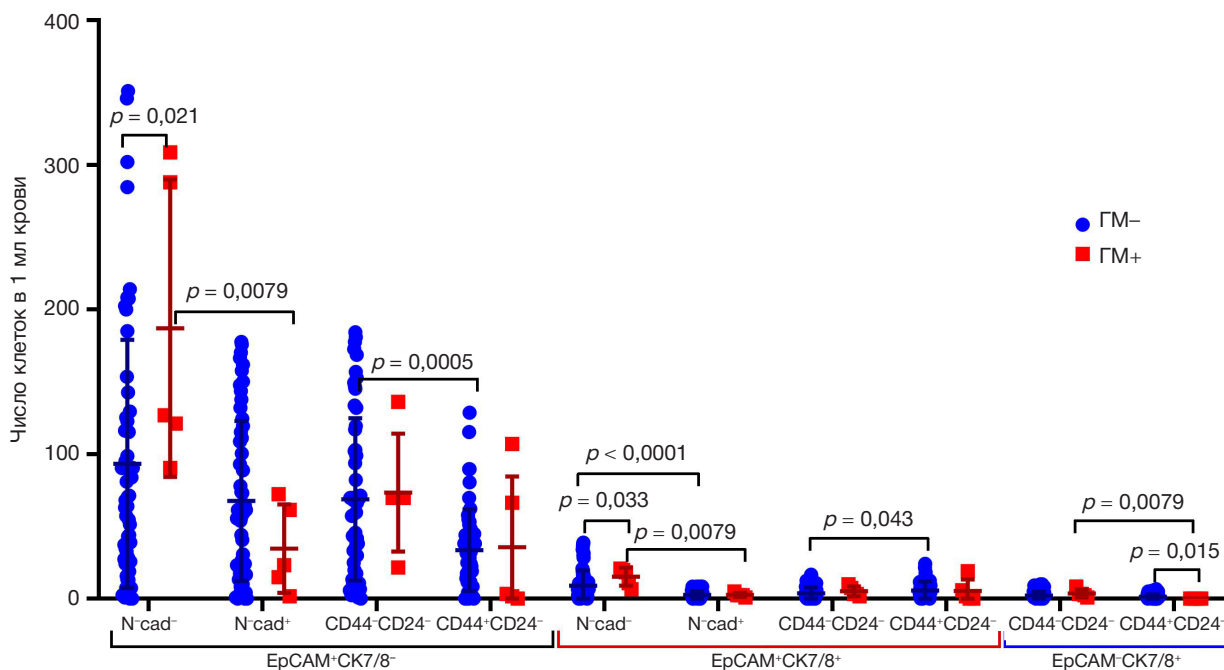


Рис. 5. Признаки стволовости и ЭМП у циркулирующих клеток с гибридным фенотипом при гематогенном метастазировании рака молочной железы

интегрин  $\beta 4$  способствует опухолевой инвазии, повышает жизнеспособность опухолевых клеток и способствует ангиогенезу [27]. Интегрин  $\alpha \nu \beta 5$  является позитивным регулятором стволовости опухолевых клеток, способствует их росту и инвазии [28]. Ранее нами было установлено, что ЦОК экспрессируют промигранторный маркер CXCR4 [29]. Повышенный уровень экспрессии CXCR4 и интегриновых молекул в гибридных клетках может обеспечивать их высокий миграционный потенциал и способствовать диссеминации в различные органы, в результате гибридные клетки могут приобретать необходимые свойства для формирования метастазов [30].

На данный момент не известно, могут ли гибриды лейкоцитов и эпителиальных опухолевых клеток неограниченно делиться, формируя опухоль в дистантном органе, т. е. выполнять роль опухолевых клеток-семян. Не известно, способны ли гибридные

циркулирующие клетки выполнять нишеобразующую роль. Однако уже сейчас можно утверждать, что гибридные клетки опухоли и периферической крови ассоциированы как с ЛМ, так и ГМ.

#### ВЫВОДЫ

Таким образом, в популяции клеток с гибридным фенотипом, так же, как и ЦОК, отмечается высокая степень гетерогенности, включая комбинацию признаков стволовости, ЭМП и разнообразный интегриновый интерфейс. Клетки с гибридным фенотипом принимают участие в процессах лимфогенного и гематогенного метастазирования. Наличие ЛМ ассоциировано с такими метастатическими характеристиками циркулирующих клеток с гибридным фенотипом, как признаки стволовости и коэкспрессия  $\beta 3$ -,  $\beta 4$ - и  $\alpha \nu \beta 5$ -интегринов. При наличии

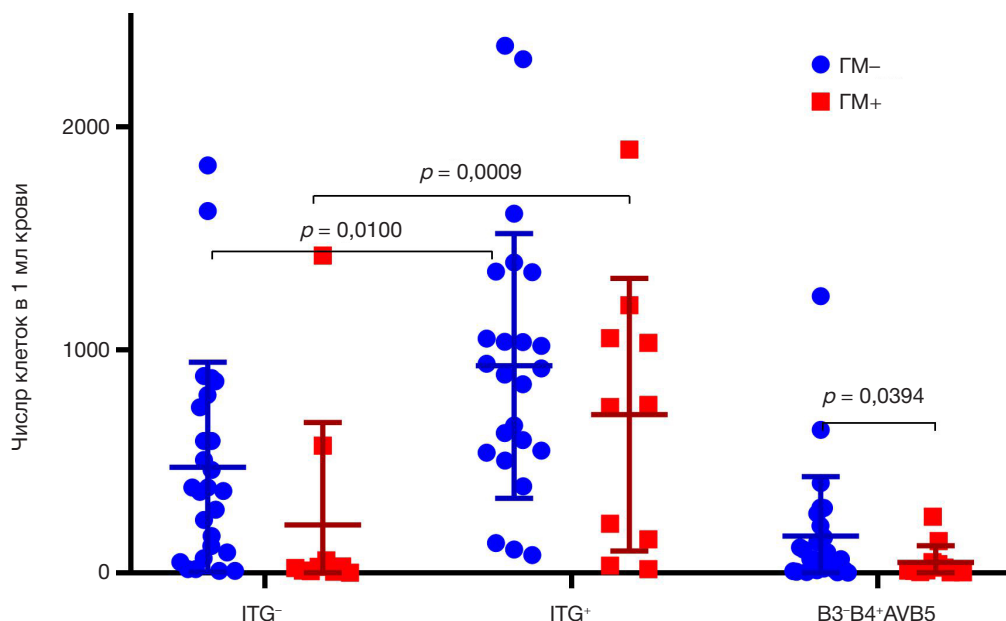


Рис. 6. Экспрессия интегриновых молекул клетками с гибридным фенотипом при гематогенном метастазировании рака молочной железы

ГМ метастатические характеристики клеток с гибридным фенотипом обусловлены признаками стволовости, но не признаками ЭМП и экспрессией интегринов.

Понимание механизма участия клеток с гибридным фенотипом в метастазировании может быть полезным для совершенствования противометастатической терапии.

## Литература

- Ruiz-Rodríguez AJ, Molina-Vallejo MP, Aznar-Peralta I, González Puga C, Cañas García I, González E, et al. Deep Phenotypic Characterisation of CTCs by Combination of Microfluidic Isolation (IsoFlux) and Imaging Flow Cytometry (ImageStream). *Cancers (Basel)*. 2021; 13 (24): 6386.
- Zhang Q, Kong D, Yang Z, Li G, Cheng S, Feng L, et al. Prognostic value of stem-like circulating tumor cells in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med*. 2023. DOI: 10.1007/s10238-023-01009-0.
- Orrapin S, Udomruk S, Lapisatepun W, Moonmuang S, Phanphisarn A, Phinyo P, et al. Clinical Implication of Circulating Tumor Cells Expressing Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and Cancer Stem Cell (CSC) Markers and Their Perspective in HCC: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (14): 3373.
- Grigoryeva ES, Tashireva LA, Alifanov VV, Savelieva OE, Vtorushin SV, Zavyalova MV, et al. Molecular subtype conversion in CTCs as indicator of treatment adequacy associated with metastasis-free survival in breast cancer. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 20949.
- Fina E, Cleris L, Dugo M, Lecchi M, Ciniselli CM, Lecis D, et al. Gene signatures of circulating breast cancer cell models are a source of novel molecular determinants of metastasis and improve circulating tumor cell detection in patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022; 41 (1): 78.
- Grigoryeva ES, Tashireva LA, Savelieva OE, Zavyalova MV, Popova NO, Kuznetsov GA, et al. The Association of Integrins  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , and  $\alpha V\beta 5$  on Exosomes, CTCs and Tumor Cells with Localization of Distant Metastasis in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (3): 2929.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015; 527 (7578): 329–35.
- Guan X, Ma F, Li C, Wu S, Hu S, Huang J, et al. The prognostic and therapeutic implications of circulating tumor cell phenotype detection based on epithelial-mesenchymal transition markers in the first-line chemotherapy of HER2-negative metastatic breast cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2019; 39 (1): 1.
- Wankhede D, Grover S, Hofman P. Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker in Resectable Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (24): 6112.
- Jou HJ, Ling PY, Hsu HT. Circulating tumor cells as a "real-time liquid biopsy": Recent advances and the application in ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2022; 61 (1): 34–39.
- Li H, Liu Q, Liang S, Yao P, Lv J, Wang G, et al. Circulating tumor cells and neutrophil-lymphocyte ratio are predictive markers for metastatic colorectal cancer patients. *Transl Cancer Res*. 2021; 10 (1): 288–97.
- Papadaki MA, Stoupis G, Theodoropoulos PA, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Circulating Tumor Cells with Stemness and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Features Are Chemoresistant and Predictive of Poor Outcome in Metastatic Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019; 18 (2): 437–47.
- Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Deighan C, Wu Y, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2014; 16 (2): R23.
- Ishizawa K, Yamanaka M, Saiki Y, Miyauchi E, Fukushige S, Akaishi T, et al. CD45+CD326+ Cells are Predictive of Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (22): 6756–63.
- Dittmar T, Zänker KS. Introduction. In: Dittmar T, Zänker KS. *Cell Fusion in Health and Disease*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 950. Dordrecht: Springer, 2011; p. 1–3.
- Laberge GS, Duvall E, Haedicke K, Pawelek J. Leukocyte-Cancer Cell Fusion-Genesis of a Deadly Journey. *Cells*. 2019; 8 (2): 170.
- Поспелова П. А. Лейкоконцентрация в клинической практике: диагностическое значение. М.: Медицина, 1973; 88 с.
- Agnolletto C, Corrà F, Minotti L, Baldassari F, Crudele F, Cook WJJ, et al. Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: The Relevance of the Stem-Cell Subset. *Cancers (Basel)*. 2019; 11 (4): 483.
- Noubissi FK, Ogle BM. Cancer Cell Fusion: Mechanisms Slowly Unravel. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (9): 1587.
- Kaur E, Rajendra J, Jadhav S, Shridhar E, Goda JS, Moiyadi A, et al. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis*. 2015; 36 (6): 685–95.
- Yan B, Wang J, Liu L. Chemotherapy promotes tumour cell hybridization in vivo. *Tumour Biol*. 2016; 37 (4): 5025–30.
- Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev*. 2020; 39 (3): 969–87.
- Fidanza A, Stumpf PS, Ramachandran P, Tamagno S, Babbie A, Lopez-Yrigoyen M et al. Single-cell analyses and machine learning define hematopoietic progenitor and HSC-like cells derived from human PSCs. *Blood*. 2020; 136 (25): 2893–904.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 665–706.
- Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9 (4): 285–93.
- Pan B, Guo J, Liao Q, Zhao Y.  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication. *Oncol Lett*. 2018; 15 (4): 5412–6.
- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem*. 2001; 276 (27): 25438–46.
- Liu F, Wu Q, Dong Z, Liu K. Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2023; 247: 108458.
- Savelieva OE, Tashireva LA, Buldakov MA, Mukhamedzhanov RK, Kaigorodova EV, Denisov EV, et al. CXCR4 expression in different subsets of CTCs and single (detached) breast cancer cells. *Siberian journal of oncology*. 2018; 17 (4): 75–80.
- Ramakrishnan M, Mathur SR, Mukhopadhyay A. Fusion-derived epithelial cancer cells express hematopoietic markers and contribute to stem cell and migratory phenotype in ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2013; 73 (17): 5360–70.


## References

- Ruiz-Rodríguez AJ, Molina-Vallejo MP, Aznar-Peralta I, González Puga C, Cañas García I, González E, et al. Deep Phenotypic Characterisation of CTCs by Combination of Microfluidic Isolation (IsoFlux) and Imaging Flow Cytometry (ImageStream). *Cancers (Basel)*. 2021; 13 (24): 6386.
- Zhang Q, Kong D, Yang Z, Li G, Cheng S, Feng L, et al. Prognostic value of stem-like circulating tumor cells in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med*. 2023. DOI: 10.1007/s10238-023-01009-0.
- Orrapin S, Udomruk S, Lapisatepun W, Moonmuang S, Phanphisarn A, Phinyo P, et al. Clinical Implication of Circulating Tumor Cells Expressing Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)



- and Cancer Stem Cell (CSC) Markers and Their Perspective in HCC: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (14): 3373.
4. Grigoryeva ES, Tashireva LA, Alifanov VV, Savelieva OE, Vtorushin SV, Zavyalova MV, et al. Molecular subtype conversion in CTCs as indicator of treatment adequacy associated with metastasis-free survival in breast cancer. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 20949.
  5. Fina E, Cleris L, Dugo M, Lecchi M, Ciniselli CM, Lecis D, et al. Gene signatures of circulating breast cancer cell models are a source of novel molecular determinants of metastasis and improve circulating tumor cell detection in patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022; 41 (1): 78.
  6. Grigoryeva ES, Tashireva LA, Savelieva OE, Zavyalova MV, Popova NO, Kuznetsov GA, et al. The Association of Integrins  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , and  $\alpha V\beta 5$  on Exosomes, CTCs and Tumor Cells with Localization of Distant Metastasis in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (3): 2929.
  7. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015; 527 (7578): 329–35.
  8. Guan X, Ma F, Li C, Wu S, Hu S, Huang J, et al. The prognostic and therapeutic implications of circulating tumor cell phenotype detection based on epithelial-mesenchymal transition markers in the first-line chemotherapy of HER2-negative metastatic breast cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2019; 39 (1): 1.
  9. Wankhede D, Grover S, Hofman P. Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker in Resectable Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (24): 6112.
  10. Jou HJ, Ling PY, Hsu HT. Circulating tumor cells as a "real-time liquid biopsy": Recent advances and the application in ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2022; 61 (1): 34–39.
  11. Li H, Liu Q, Liang S, Yao P, Lv J, Wang G, et al. Circulating tumor cells and neutrophil-lymphocyte ratio are predictive markers for metastatic colorectal cancer patients. *Transl Cancer Res*. 2021; 10 (1): 288–97.
  12. Papadaki MA, Stoupis G, Theodoropoulos PA, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Circulating Tumor Cells with Stemness and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Features Are Chemoresistant and Predictive of Poor Outcome in Metastatic Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019; 18 (2): 437–47.
  13. Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Deighan C, Wu Y, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2014; 16 (2): R23.
  14. Ishizawa K, Yamanaka M, Saiki Y, Miyauchi E, Fukushige S, Akaishi T, et al. CD45+CD326+ Cells are Predictive of Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (22): 6756–63.
  15. Dittmar T, Zänker KS. Introduction. In: Dittmar T, Zänker KS. *Cell Fusion in Health and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 950. Dordrecht: Springer, 2011; p. 1–3.
  16. Laberge GS, Duvall E, Haedicke K, Pawelek J. Leukocyte-Cancer Cell Fusion-Genesis of a Deadly Journey. *Cells*. 2019; 8 (2): 170.
  17. Pospelova RA. Lejkokoncentraciya v klinicheskoy praktike: diagnosticheskoe znachenie. M.: Medicina, 1973; 88 s. Russian.
  18. Agnoletto C, Corrà F, Minotti L, Baldassari F, Crudele F, Cook WJJ, et al. Heterogeneity in Circulating Tumor Cells: The Relevance of the Stem-Cell Subset. *Cancers (Basel)*. 2019; 11 (4): 483.
  19. Noubissi FK, Ogle BM. Cancer Cell Fusion: Mechanisms Slowly Unravel. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (9): 1587.
  20. Kaur E, Rajendra J, Jadhav S, Shridhar E, Goda JS, Moiyadi A, et al. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis*. 2015; 36 (6): 685–95.
  21. Yan B, Wang J, Liu L. Chemotherapy promotes tumour cell hybridization in vivo. *Tumour Biol*. 2016; 37 (4): 5025–30.
  22. Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev*. 2020; 39 (3): 969–87.
  23. Fidanza A, Stumpf PS, Ramachandran P, Tamagno S, Babbie A, Lopez-Yrigoyen M et al. Single-cell analyses and machine learning define hematopoietic progenitor and HSC-like cells derived from human PSCs. *Blood*. 2020; 136 (25): 2893–904.
  24. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 665–706.
  25. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9 (4): 285–93.
  26. Pan B, Guo J, Liao Q, Zhao Y.  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication. *Oncol Lett*. 2018; 15 (4): 5412–6.
  27. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem*. 2001; 276 (27): 25438–46.
  28. Liu F, Wu Q, Dong Z, Liu K. Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2023; 247: 108458.
  29. Savelieva OE, Tashireva LA, Buldakova MA, Mukhamedzhanov RK, Kaigorodova EV, Denisov EV, et al. CXCR4 expression in different subsets of CTCs and single (detached) breast cancer cells. *Siberian journal of oncology*. 2018; 17 (4): 75–80.
  30. Ramakrishnan M, Mathur SR, Mukhopadhyay A. Fusion-derived epithelial cancer cells express hematopoietic markers and contribute to stem cell and migratory phenotype in ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2013; 73 (17): 5360–70.

## МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ПАЦИЕНТА С НЕРЕЗЕКТАБЕЛЬНЫМ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ HER2+ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЖЕЛУДКА

К. В. Коломиец , И. В. Исаев, В. В. Ковалев, Н. В. Грищенко, Д. И. Коковихина, А. А. Морозова, А. Р. Торосян, В. В. Шашкова, П. В. Снегирева


Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

У 85% больных во всем мире сразу или в течение трех лет рак желудка (РЖ) переходит в метастатическую форму. Печень является органом метастазирования РЖ с частотой 30–50%, включая как синхронные, так и метахронные метастазы. При наличии мультифокальных метастазов печени прогноз для пациентов весьма неблагоприятен: медиана выживаемости составляет около 10–15 месяцев, а трехлетняя выживаемость — менее 10%, и паллиативным вариантом лечения в таких случаях является системная химиотерапия. Внедрение относительно молодого локального метода воздействия на метастатические очаги — трансартериальной химиоэмболизации (ТАХЭ) в комбинации с иммунотерапией открыло новые возможности лечения метастазов в печень. Представлен клинический случай использования методики ТАХЭ в комбинации с иммунотерапией, а также химиотерапией у пациента при нерезектабельном метастатическом поражении печени HER2+ аденокарциномой желудка с продолжительностью жизни 42 месяца с момента установления диагноза.

**Ключевые слова:** рак желудка, метастазы рака желудка в печень, трансартериальная химиоэмболизация, иммунотерапия, химиотерапия

**Вклад авторов:** К. В. Коломиец — написание статьи, редактирование; И. В. Исаев, П. В. Снегирева — написание статьи, обзор литературы, анализ данных; В. В. Ковалев, Н. В. Грищенко — написание статьи, обзор литературы, сбор данных; Д. И. Коковихина, А. А. Морозова — написание статьи, обзор литературы, концепция и дизайн; А. Р. Торосян, В. В. Шашкова — написание статьи, обзор литературы, переработка статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** пациент подписал добровольное информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

 **Для корреспонденции:** Карина Викторовна Коломиец  
ул. Красноармейская, д. 198, г. Новочеркасск, 346400, Россия; karina\_kolomiets\_99@mail.ru

**Статья получена:** 27.06.2023 **Статья принята к печати:** 12.08.2023 **Опубликована онлайн:** 29.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.031

## MULTIDISCIPLINARY APPROACH TO TREATMENT OF A PATIENT WITH UNRESECTABLE METASTATIC LIVER LESION SPAWNED BY HER2+ GASTRIC ADENOCARCINOMA GIVING

Kolomiets KV , Isaev IV, Kovalev VV, Grishchenko NV, Kokovihina DI, Morozova AA, Torosyan AR, Shashkova VV, Snegireva PV


Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia

In 85% of patients worldwide, gastric cancer (GC) metastasizes from the very beginning or within three years. In 30–50% of cases, metastases, both synchronous and metachronous, grow into liver. Multifocal liver metastases translate into an unfavorable prognosis: the median survival period is 10–15 months, with less than 10% of the patients surviving past three years. In such cases, the palliative treatment option is systemic chemotherapy. Combined with immunotherapy, transarterial chemoembolization (TACE), a relatively new method of local treatment of metastatic foci, offer new options of combating liver metastases. This work presents a clinical case of application of this combination coupled with chemotherapy to treat a patient with unresectable liver metastases spawned by HER2+ gastric adenocarcinoma. From the day of diagnosis, the patient's life expectancy was 42 months.

**Keywords:** gastric cancer, liver metastases of gastric cancer, transarterial chemoembolization, immunotherapy, chemotherapy

**Author contribution:** Kolomiets KV — article authoring, editing; Isaev IV, Snegireva PV — article authoring, literature review, data analysis; Kovalev VV, Grishchenko NV — article authoring, literature review, data collection; Kokovihina DI, Morozova AA — article authoring, literature review, study concept and design; Torosyan AR, Shashkova VV — article authoring, literature review, article revision.

**Compliance with ethical standards:** the patient has signed a voluntary informed consent to publication of anonymized medical information.

 **Correspondence should be addressed:** Karina V. Kolomiets  
Krasnoarmeyskaya, 198, Novochechassk, 346400, Russia; karina\_kolomiets\_99@mail.ru

**Received:** 27.06.2023 **Accepted:** 12.08.2023 **Published online:** 29.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.031

Согласно статистическим данным, рак желудка (РЖ) среди злокачественных новообразований входит в пятерку мировых лидеров, занимая 5-е место по заболеваемости, и 3-е — по смертности [1]. Смертность от РЖ в мире составляет свыше 700 тыс. в год, так как в большинстве случаев заболевание диагностируют на поздних стадиях, уже с наличием отдаленных метастазов [2, 3]. В Российской Федерации (РФ) заболеваемость РЖ несколько ниже, находится на 7-м месте в структуре онкологической заболеваемости за 2019 г. и составляет 5,7%, однако по показателю смертности РЖ несколько опережает мировой показатель, занимая 2-е место (9,8%) в структуре смертности населения России от злокачественных новообразований. В РФ обращает на себя внимание высокий показатель запущенности: согласно

статистическим данным, в 2019 г. РЖ занял 3-е место по среднероссийскому показателю несвоевременной диагностики (IV ст.), при этом 45,8% больных с впервые выявленным заболеванием умерло в течение первого года с момента установления диагноза [2, 4]. Примерно у такого же процента больных дальнейшее прогрессирование опухоли наблюдается после лечения. В результате, у 85% больных сразу или в течение трех лет болезнь переходит в метастатическую форму, что определяет неблагоприятный прогноз заболевания [5].

Наиболее часто РЖ метастазирует в печень: с частотой 30–50% случаев, включая как синхронные, так и метахронные метастазы. На момент постановки диагноза 35% пациентов с признаками отдаленных метастазов, и 4–14% имеют метастатическое поражение печени,

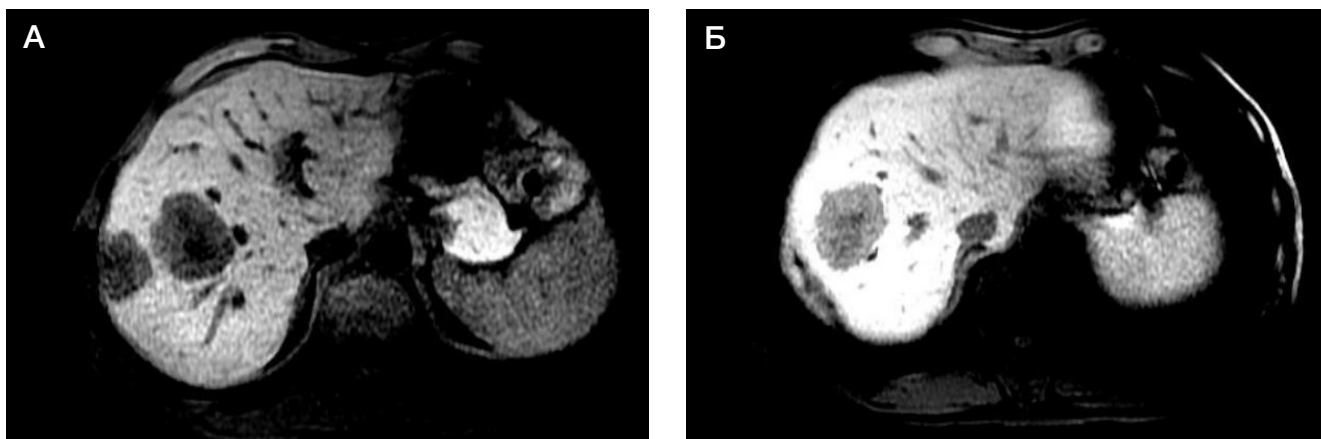


Рис. 1. А, Б. Магнитно-резонансная томография брюшной полости от 07.12.2019

в то время как метастазы после лечебной гастрэктомии обнаруживаются у 25–30% пациентов, 80% из этих метастазов появляются в течение первых двух лет после операции. У пациентов с метастатическим РЖ с метастазами в печень медиана выживаемости составляет 11 месяцев и пятилетняя выживаемость — менее 20%. Иссечение первичных опухолей и метастазов печени может увеличить пятилетнюю выживаемость до 23,8% [6].

При наличии мультифокальных метастазов печени прогноз для пациентов весьма неблагоприятен: медиана выживаемости составляет около 10–15 месяцев, а трехлетняя выживаемость — менее 10% [1, 7, 8], и паллиативным вариантом лечения в таких случаях является системная химиотерапия.

Внедрение таких локальных методов воздействия на метастатические очаги, как трансартериальная химиоэмболизация (ТАХЭ), открыло новые возможности лечения метастазов в печень. Применение данного метода лечения позволяет решить сразу несколько задач: достигнуть оптимальной концентрации и длительности воздействия противоопухолевого ЛС непосредственно в опухолевом узле, вызвать индукцию ишемического некроза ткани опухоли вследствие нарушения васкуляризации, уменьшить системную токсичность цитостатиков в связи с их низкой концентрацией в системном кровотоке [5, 9–11]. Немногие существующие исследования показали благоприятные результаты ТАХЭ у пациентов с метастатическим поражением печени РЖ. В одном из ретроспективных исследований средняя выживаемость (СВ) пациентов после первой ТАХЭ только митомицином составила 6 месяцев и 25,5 месяцев соответственно, СВ пациентов после первой ТАХЭ митомицином и гемцитабином — 8,1 и 11,4 месяцев соответственно, СВ после ТАХЭ митомицином в сочетании с гемцитабином и цисплатином — 15,3 и 30,5 месяцев соответственно [2, 12–14].

Около 10–15% случаев РЖ ассоциировано с активацией HER2 (от англ. human epidermal growth factor receptor 2 — рецептора эпидермального фактора роста типа 2). Именно гиперэкспрессия HER2 коррелирует с агрессивным течением заболевания и является фактором неблагоприятного прогноза: по данным разных исследований, амплификация гена HER2 (HER2<sup>+</sup>-статус) у больных РЖ коррелирует с низкими показателями общей выживаемости. В связи с этим существует необходимость внедрения в клиническую практику более эффективных противоопухолевых ЛС. В последнее время наиболее перспективным нововведением в терапии

злокачественных новообразований стала терапия ингибиторами контрольных точек (ИКТ) иммунитета, которая показала высокую эффективность в лечении многих типов опухолей, в том числе РЖ [15].

В данном клиническом наблюдении сделана оценка эффективности мультидисциплинарного подхода: применения ТАХЭ в комбинации с фторурацилом и иммунотерапией, а также препаратами группы платины в лечении пациента с нерезектабельным метастатическим поражением печени HER2<sup>+</sup>-РЖ.

#### Описание клинического случая

Пациент К., 1967 г. рождения, обратился в клинику РостГМУ в июле 2019 г., с жалобами на немотивированную потерю веса, тяжесть в правом подреберье. Считает себя больным с июля 2018 г., когда при обследовании по месту жительства был выявлен РЖ, после чего 16.07.2018 в Ставропольском краевом клиническом онкологическом диспансере была выполнена гастрэктомия с реконструктивно-пластическим компонентом.

При КТ ОБП 01.07.2019 выявлено два метастатических очага в правой доле печени. Заключение гистологического анализа при трепан-биопсии метастатических очагов в печени от 20.07.2019 — железистая карцинома. Был поставлен диагноз: С78.7 вторичное метастатическое поражение печени; рак желудка, рТ3N1M0, st. IIIВ, состояние после гастрэктомии 16.07.2018, кл. гр. 2.

24.07.2019 выполнена установка центрального венозного порта. Далее проведено семь курсов ХТ по схеме «FOLFIRI + рамудирумаб»: иринотекан 180 мг/м<sup>2</sup> + кальция фолинат 400 мг + фторурацил 400 мг/м<sup>2</sup> болюсно + фторурацил 2400 мг/м<sup>2</sup> внутривенно 48 ч инфузия + рамудирумаб 8 мг/кг в 1-й и 15-й дни каждые 28 дней.

При контрольном обследовании (от 22.10.2019) выявлено: онкомаркеры РЭА — 21,50 нг/мл (референсные значения: 0–5,0), СА 19-9 — 44,56 Ед/мл (референсные значения 0–37,0). Свое состояние во время проведения курсов системной химиотерапии оценивал как средней степени тяжести, наблюдалась рвота, диарея, головокружение, быстрая утомляемость.

Результаты МРТ ОБП от 07.12.2019: в правой доле печени в S7–S8 выявлен очаг до 45 × 48 мм, в S7 по латеральной поверхности — очаг 31 × 37 мм, в заднемедиальной поверхности S8 — очаг 8 × 10 мм, нечетко определяемый очаг в капсуле нижней поверхности S6 7 мм, данных в пользу рецидива или канцероматоза брюшины нет (рис. 1А, Б). Свое состояние пациент

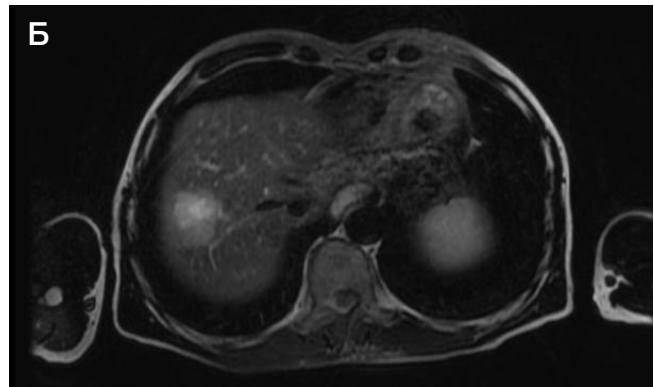
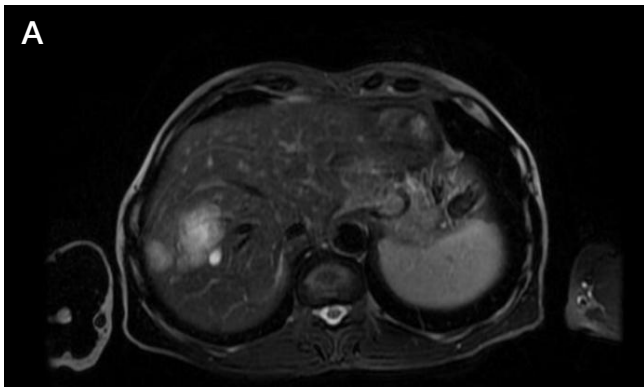


Рис. 2. А, Б. Магнитно-резонансная томография брюшной полости от 18.02.2020

расценивал как удовлетворительное. С учетом объема поражения печени, распространенности и отрицательной динамики 19.12.2019 выполнена ТАХЭ с оксалиплатином 100 мг, фторурацилом 1000 мг.

Была назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия:

- для анальгезии: диклофенак 75 мг 2 раза в день в/м в течение 5 дней;
- дротаверина гидрохлорид 40 мг 2 раза в день в/м в течение 5 дней;
- октреотид 300 мкг 2 раза в день подкожно в течение 7 дней;
- в целях профилактики тромбоэмболических осложнений: эноксапарин натрия 0,4 мг подкожно 1 раз в день в течение 7 дней;
- инфузионная терапия: глюкоза 5% 500 мл + инсулин 6 Ед 1 раз в день в/в в течение 3 дней, NaCl 0,9% 500 мл + 40 мг омепразола 2 раза в день в/в 3 дня;
- дополнительно, в соответствии с консультацией сосудистого хирурга: тиоктовая кислота 600 мг + NaCl 0,9% — 100 мл в/в 1 раз в день в течение 5 дней, депротеинизированный гемодериват крови телят 10 мл + NaCl 0,9% — 100 мл в/в 1 раз в день в течение 5 дней, мельдоний 10 мл + NaCl 0,9% — 100 мл в/в 1 раз в день в течение 5 дней, сулодексид 2 мл в/м 1 раз в день в течение 5 дней.

На момент выписки свое состояние пациент оценивал как удовлетворительное, несмотря на объем метастатических очагов; было отмечено незначительное повышение температуры в течение первых 2 дней после проведения ТАХЭ.

Протокол ИГХ исследования (от 19.01.2020): в трепанбиоптате печени метастаз аденокарциномы с обширными очагами некроза, с очаговой лимфоидной инфильтрацией.

С учетом клинических данных более вероятно метастаз аденокарциномы желудка в ткань печени. Заключение: метастаз в ткань печени аденокарциномы желудка с HER2<sup>+</sup>-статусом.

Далее пациент проходил курсы ХТ по месту жительства, и при контрольном обследовании выявлена положительная динамика: МРТ ОБП от 18.02.2020: печень увеличена, билобарный размер — 188 × 16 мм, паренхима неравномерно диффузно изменена по сигналу, МРТ-картина метастатического поражения, в правой доле очаг до 34 × 54 мм (ранее 45 × 48 мм), в S7–S8: в S7 по латеральной поверхности очаг 28 × 29 мм (ранее 31 × 37 мм), в заднемедиальной поверхности S8 очаг до 5 × 10 мм (ранее 8 × 10 мм), очаг в капсуле нижней поверхности S6 не определяется (ранее 7 мм) (рис. 2А, Б).

В плановом порядке 19.02.2020 была проведена консультация химиотерапевта. Заключение: как в поддерживающем режиме возможно проведение курсов ХТ: паклитаксел 175 мг/м<sup>2</sup> в 1-й день + трастузумаб 6 мг/кг нагрузочная доза 8 мг/кг) в 1-й день; цикл 21 день. Пациенту проведено 3 курса соответствующей ХТ.

Результаты МРТ ОБП от 30.04.2020: МРТ-картина увеличения единичных (2) метастазов в правой доле печени, появления тенденции к слиянию образований (отрицательная динамика), печень имеет ровные контуры; вертикальный размер правой доли 18,2 см, левой доли 5,1 см, кисты S7, S6 печени размером до 9 × 12 мм. В S8, S7 выявлены опухолевые узлы размером 39 × 60 и 27 × 44 мм (ранее 35 × 54 и 28 × 29 мм), сливающиеся в конгломерат.

С учетом объема поражения печени, распространенности и отрицательной динамики процесса, предъявления жалоб на тяжесть в правом подреберье на фоне удовлетворительного состояния было принято решение

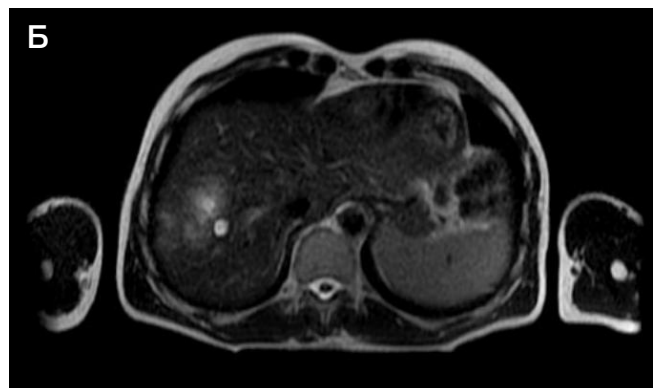
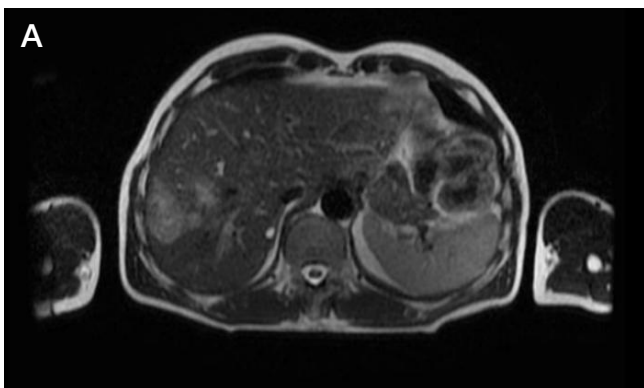


Рис. 3. А, Б. Магнитно-резонансная томография брюшной полости от 15.07.2020



о целесообразности продолжения использования ТАХЭ печени в комплексе лечения.

Пациенту была назначена предоперационная кардио- и гепатотропная подготовка в течение 5 суток: тиоктовая кислота 600 мг + NaCl 0,9% 100 мл в/в 1 раз в день в течение 5 дней, мельдоний 5 мл + глюкоза 250 мл в/в 1 раз в день, адеметионин 400 мг + глюкоза 250 мл в/в 1 раз в день.

05.05.2020 была выполнена ТАХЭ: липиодол 10 мл + фторурацил 1000 мг + оксалиплатин 100 мг. Артериальная эмболизация выполнена сферами HydroPearl 800 нм. Назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия.

С мая по июль 2020 г. пациент получил 2 курса иммунотерапии по месту жительства: ниволумаб 210 мг в виде внутривенной инфузии 1 раз в 2 недели. Результаты МРТ ОБП от 15.07.2020: в S8, S7 опухолевые узлы, размером 49 × 57 мм и 41 × 61 мм (ранее — 39 × 60 мм и 27 × 44 мм), сливающиеся в единый конгломерат (рис. 3А, Б), что свидетельствует о прогрессировании.

С учетом объема поражения печени, распространенности и отрицательной динамики процесса 07.08.2020 была выполнена ТАХЭ печени с липиодолом 10 мл + цисплатином 100 мг. Была назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия.

Далее проведена ХТ (паклитаксел 175 мг/м<sup>2</sup> в 1-й день + трастузумаб 6 мг/кг нагрузочная доза 8 мг/кг) в 1-й день; цикл 21 день) + иммунотерапия (ниволумаб 210 мг в виде в/в инфузии 1 раз в 2 недели по месту жительства), во время проведения курсов ХТ и ИТ пациентом были отмечены следующие побочные явления: зуд в области коленей, покраснения кожи, со стороны желудочно-кишечного тракта — периодически возникающая диарея и тошнота.

Результаты МРТ ОБП 13.11.2020: в S7 печени очаг размерами 54 × 78 × 52 мм, что свидетельствовало о прогрессировании процесса.

16.11.2020 была выполнена паренхиматозная химиоэмболизация артерий, кровоснабжающих очаги: липиодол 10 мл + фторурацил 1000 мг, а также артериальная химиоэмболизация сферами HydroPearl 800 нм (2 мл — 1 шприц) + 100 мг цисплатина. Назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия.

В последующем пациенту проводили ИТ: ниволумаб 210 мг в виде в/в инфузии 1 раз в 2 недели. При контрольном исследовании выявлена стабилизация метастатического очага 18.12.2020. Результаты МРТ ОБП от 18.12.2020: в S8, S7 опухолевые узлы, размером 49 × 57 и 41 × 52 мм, сливающиеся в единый конгломерат.

12.01.2021 была выполнена ТАХЭ микросферами EmboSphere 500–700 нм + фторурацил 1000 мг + цисплатин 100 мг). Была назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия.

Результаты МРТ ОБП от 04.03.2021: в S7 печени солидные образования размерами 98 × 61 × 70 мм (ранее 49 × 57 мм) и 28 × 32 × 17 мм (ранее не визуализировались); в структуре образования кистозный компонент размерами 16 × 11 × 14 см, по передней диафрагмальной поверхности печени выявлено солидное образование 22 × 13 мм (ранее не визуализировалось). Результаты рентгенографии ОГК от 14.03.2021: легкие без патологических изменений.

16.03.2021 выполнена ТАХЭ микросферами HydroPearl 500–700 нм химиопрепаратами фторурацил 1000 мг + цисплатин 100 мг. Назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия.

08.07.2021 пациент вновь был госпитализирован для повторного проведения ТАХЭ. Было проведено 4 курса ИТ. Результаты МРТ ОБП от 05.07.2021: в S7 печени солидные образования размерами 89 × 54 × 72 мм (98 × 61 × 70 мм) и 24 × 29 × 14 мм (ранее 28 × 32 × 17 мм), в структуре образования кистозный компонент размерами 11 × 9 × 12 см, по передней диафрагмальной поверхности печени солидное образование 17 × 11 мм (ранее 22 × 13 мм).

С учетом объема поражения печени, распространенности и динамики процесса 09.07.2021 выполнена ТАХЭ: липиодол 20 мл + фторурацил 1000 мг + оксалиплатин 100 мг. Артериальная эмболизация выполнена суспензией гемостатической губки. Была назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия.

На сегодняшний день, пациент находится в удовлетворительном состоянии, ведет активный образ жизни и проходит курсы системной ХТ по схеме FOLFIRI, несмотря на незначительное уменьшение метастатических очагов в печени.

### Обсуждение клинического случая

В ходе оперативного вмешательства по поводу метастатического поражения печени HER2<sup>+</sup>-аденокарциномой желудка посредством ТАХЭ с использованием микросфер, с одной стороны, была обеспечена блокада артериального притока в опухоль, а с другой стороны — постепенное высвобождение химиопрепарата в области метастаза и селективное цитостатическое воздействие химиотерапевтического ЛС с минимизацией развития системных побочных явлений.

В свою очередь, ингибиторы ИКТ являются важным достижением последних лет в противоопухолевой терапии. Терапия некоторых злокачественных новообразований ингибиторами ИКТ показывает обнадеживающие результаты и значительно улучшает прогноз пациентов. Ингибирование ИКТ в качестве терапии РЖ поздних стадий целесообразно, поскольку зачастую РЖ резистентен к химиотерапии. В числе применяемых ингибиторов ИКТ значится пембролизумаб, который одобрен FDA в 2017 г. по результатам исследования KEYNOTE-059 в качестве 3-й линии терапии метастатического РЖ/КЭР с экспрессией PD-L1 [8]. Также с участием пациентов, больных РЖ, проводится большое количество клинических исследований других схем терапии, включающих ингибиторы ИКТ. Среди наиболее перспективных выделяют их комбинации с таргетными препаратами и химиотерапией [15].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новые комбинированные методы лечения, сочетающие ТАХЭ с молекулярно-таргетной терапией (в описанном нами случае — применение трастузумаба) и ингибиторами ИКТ, основаны на индивидуальных характеристиках опухоли, в частности HER2<sup>+</sup>-статусе. Учитывая, что РЖ по своим биологическим свойствам обладает выраженной внутриопухолевой активностью, а также гетерогенностью между первичной опухолью и метастазами, внутриопухолевая гетерогенность по экспрессии HER2<sup>+</sup> может свидетельствовать о более низких показателях эффективности лечения. Исследования по определению биомаркеров или генных сигнатур, которые могут быть переведены в клинически значимые прогностические показатели «ответа» на ТАХЭ, безусловно, являются важными направлениями для дальнейшего изучения.



Мультидисциплинарный подход использования методики ТAxЭ в комбинации с иммуно- и химиотерапией у пациента при нерезектабельном метастатическом поражении печени HER2<sup>+</sup>-аденокарциномой желудка позволил контролировать течение заболевания на

протяжении 42 месяцев, что превышает медиану выживаемости пациентов подобного профиля практически в 4 раза и служит «твердой» точкой в оценке эффективности проведенной комбинированной терапии у данного пациента.

## Литература

- Panda SK, Sahoo PK, Agarwala SK, Houghton TT, Chandrapattan PP, Sankar KV, Nag R. Evolution of treatment in gastric cancer- a systematic review. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2022; 34 (1); DOI: 10.1186/s43046-022-00114-7.
- Малихова О. А., Рябова В. Е., Лозовая В. В. и др. Ранний рак желудка: клиническое наблюдение. *PMЖ. Медицинское обозрение.* 2022; 6 (6): 334–40; DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-6-334-340.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68 (6): 394–424.
- Рыков О. В., Паршин Д. В., Цховребов А. Т., Мирзоян О. С., Фёдоров Д. Н., Тарасова И. А., и др. Результаты лечения рака желудка и метастатических метастазов в печени и легких. *Хирургия. Журнал имени Н. И. Пирогова.* 2017; (6): 69–71.
- Kuhlmann JB, Euringer W, Spangenberg HC, Breidert M, Blum HE, Harder J, et al. Treatment of unresectable cholangiocarcinoma: conventional transarterial chemoembolization compared with drug eluting bead-transarterial chemoembolization and systemic chemotherapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 24 (4): 437–43; DOI: 10.1097/MEG.0b013e3283502241.
- Kawahara K, Makino H, Kametaka H, Hoshino I, Fukada T, Seike K, et al. Outcomes of surgical resection for gastric cancer liver metastases: a retrospective analysis. *World J Surg Oncol.* 2020; 18 (1), 41; DOI: 10.1186/s12957-020-01816-9.
- Patetta MA, Isaacson AJ, Stewart JK. Initial experience with HydroPearl microspheres for uterine artery embolization for the treatment of symptomatic uterine fibroids. *CVIR Endovasc.* 2021; 4 (1): 32; DOI: 10.1186/s42155-021-00223-9.
- Sakaue M, Sugimura K, Masuzawa T, et al. Long-term survival of HER2 positive gastric cancer patient with multiple liver metastases who obtained pathological complete response after systemic chemotherapy: A case report. *Int J Surg Case Rep.* 2022; 94: 107097; DOI: 10.1016/j.ijscr.2022.107097.
- Абрамов М. Е., Мащелуева А. Ю., Чичиков Е. И. Эффективная фармакот. 2010; 3 (22): 46–49.
- Сафроненко А. В., Ганцгорн Е. В., Коломиец К. В. Эффективность трансартериальной химиоэмболизации с бевацизумабом при нерезектабельном метастатическом колоректальном раке печени. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2021; 84 (10): 25–28; DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-10-25-28.
- Хоченков Д. А., Волкова М. И., Тимофеев И. В., Ольшанская А. С., Хоченкова Ю. А., Соломко Э. Ш., и др. Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов первого и второго типов в клетках первичной опухоли у больных раком почки. *Сибирский онкологический журнал.* 2021; 20 (4): 64–72. DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-4-64-72.
- Ciaffaglione V, Modica MN, Pittalà V, et al. Mutual prodrugs of 5-Fluorouracil: from a classic chemotherapeutic agent to novel potential anticancer drugs. *Chem Med Chem.* 2021; 16 (23): 3496–512; DOI: 10.1002/cmdc.202100473.
- Mizusawa J, Morizane C, Okusaka T, Katayama H, Ishii H, Fukuda H, et al. Hepatobiliary and Pancreatic Oncology Group of the Japan Clinical Oncology Group. Randomized Phase III study of gemcitabine plus S-1 versus gemcitabine plus cisplatin in advanced biliary tract cancer: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG1113, FUGA-BT). *Jpn J Clin Oncol.* 2016; 46 (4): 385–88; DOI: 10.1093/jco/hyv213.
- Mosconi C, Calandri M, Javle M, Odisio BC. Interventional radiology approaches for intra-hepatic cholangiocarcinoma. *Chin Clin Oncol.* 2020; 9 (1); DOI: 10.21037/cco.2019.12.15.
- Rahnemai-Azar AA, Weisbrod AB, Dillhoff M, Schmidt C, Pawlik TM. Intrahepatic cholangiocarcinoma: current management and emerging therapies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 11 (5): 439–49; DOI: 10.1080/17474124.2017.1309290.

## References

- Panda SK, Sahoo PK, Agarwala SK, Houghton TT, Chandrapattan PP, Sankar KV, Nag R. Evolution of treatment in gastric cancer- a systematic review. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2022; 34 (1); DOI: 10.1186/s43046-022-00114-7.
- Maliyova OA, Ryabova VE, Lozovaya VV, i dr. Rannij rak zheludka: klinicheskoe nablyudenie. *RMZh. Medicinskoe obozrenie.* 2022; 6 (6): 334–40; DOI: 10.32364/2587-6821-2022-6-6-334-340. Russian.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68 (6): 394–424.
- Rykov OV, Parshin DV, Cxovrebov AT, Mirzoyan OS, Fyodorov DN, Tarasova IA, i dr. Rezul'taty lecheniya raka zheludka i metaxromnyh metastazov v pecheni i legkih. *Hirurgiya. Zhurnal imeni N. I. Pirogova.* 2017; (6): 69–71. Russian.
- Kuhlmann JB, Euringer W, Spangenberg HC, Breidert M, Blum HE, Harder J, et al. Treatment of unresectable cholangiocarcinoma: conventional transarterial chemoembolization compared with drug eluting bead-transarterial chemoembolization and systemic chemotherapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 24 (4): 437–43; DOI: 10.1097/MEG.0b013e3283502241.
- Kawahara K, Makino H, Kametaka H, Hoshino I, Fukada T, Seike K, et al. Outcomes of surgical resection for gastric cancer liver metastases: a retrospective analysis. *World J Surg Oncol.* 2020; 18 (1), 41; DOI: 10.1186/s12957-020-01816-9.
- Patetta MA, Isaacson AJ, Stewart JK. Initial experience with HydroPearl microspheres for uterine artery embolization for the treatment of symptomatic uterine fibroids. *CVIR Endovasc.* 2021; 4 (1): 32; DOI: 10.1186/s42155-021-00223-9.
- Sakaue M, Sugimura K, Masuzawa T, et al. Long-term survival of HER2 positive gastric cancer patient with multiple liver metastases who obtained pathological complete response after systemic chemotherapy: A case report. *Int J Surg Case Rep.* 2022; 94: 107097; DOI: 10.1016/j.ijscr.2022.107097.
- Abramov ME, Mashhelueva AYU, Chichikov EI. Ehhfektivnaya farmakot. 2010; 3 (22): 46–49. Russian.
- Safronenko AV, Gancgorn EV, Kolomiec KV. Ehhfektivnost' transarterial'noj himioehmbolizacii s bevacizumabom pri nerezektabel'nom metastaticheskomo kolorektal'nom rake pecheni. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2021; 84 (10): 25–28; DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-10-25-28. Russian.
- Hochenkov DA, Volkova MI, Timofeev IV, Olshanskaya AS, Hochenkova YuA, Solomko Eh. Sh., i dr. Ehhspressiya faktora rosta ehndoteliya sosudov i ego receptorov pervogo i vtorogo

- tipov v kletkah pervichnoĭ opuholi u bol'nyh rakom pochki. Sibirskĭĭ onkologicheskĭĭ zhurnal. 2021; 20 (4): 64–72. DOI: 10.21294/1814-4861-2021-20-4-64-72. Russian.
12. Ciaffaglione V, Modica MN, Pittalà V, et al. Mutual prodrugs of 5-Fluorouracil: from a classic chemotherapeutic agent to novel potential anticancer drugs. *Chem Med Chem*. 2021; 16 (23): 3496–512; DOI: 10.1002/cmdc.202100473.
  13. Mizusawa J, Morizane C, Okusaka T, Katayama H, Ishii H, Fukuda H, et al. Hepatobiliary and Pancreatic Oncology Group of the Japan Clinical Oncology Group. Randomized Phase III study of gemcitabine plus S-1 versus gemcitabine plus cisplatin in advanced biliary tract cancer: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG1113, FUGA-BT). *Jpn J Clin Oncol*. 2016; 46 (4): 385–88; DOI: 10.1093/jjco/hyv213.
  14. Mosconi C, Calandri M, Javle M, Odisio BC. Interventional radiology approaches for intra-hepatic cholangiocarcinoma. *Chin Clin Oncol*. 2020; 9 (1); DOI: 10.21037/cco.2019.12.15.
  15. Rahnama-Azar AA, Weisbrod AB, Dillhoff M, Schmidt C, Pawlik TM. Intrahepatic cholangiocarcinoma: current management and emerging therapies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017; 11 (5): 439–49; DOI: 10.1080/17474124.2017.1309290.

## ВЛИЯНИЕ ЛЕСНЫХ ПОЖАРОВ НА ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У НАСЕЛЕНИЯ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

С. К. Пинаев<sup>1,8</sup>, С. Вenevский<sup>2,3</sup>, В. В. Чаков<sup>1</sup>, Л. Тянь<sup>4</sup>, П. Гонг<sup>4</sup>, А. Д. Каприн<sup>5</sup>, В. В. Старинский<sup>5</sup>, А. Я. Чижов<sup>6,7</sup>, О. Г. Пинаева<sup>8</sup><sup>1</sup> Хабаровский федеральный исследовательский центр Дальневосточного отделения Российской академии наук, Хабаровск, Россия<sup>2</sup> Университет Цинхуа, Пекин, Китай<sup>3</sup> Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия<sup>4</sup> Гонконгский университет, Гонконг<sup>5</sup> Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Москва, Россия<sup>6</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Россия<sup>7</sup> Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>8</sup> Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия

Дальневосточный федеральный округ (ДФО) России подвержен частым лесным пожарам. Целью работы было выявить связь между онкологическими заболеваниями и лесными пожарами на территории ДФО; оценить временные лаги указанных связей; выявить возрастные группы, статистически наиболее чувствительные к воздействию пожаров. Число пожаров (ЧП) за год на территории административных единиц (АЕ), приведенное к максимальному значению для всех АЕ за период наблюдения 1992–2019 гг., использовали в качестве показателя лесных пожаров. Показатели заболеваемости пятью видами рака (ЗР) за год среди детей в возрасте до 14 лет и населения в целом нормировали аналогично ЧП и сопоставляли с нормированными показателями ЧП. Все комбинации из семи АЕ ДФО исследовали на наличие статистических связей между нормированными показателями ЧП и ЗР. Модели ARIMA использовали для анализа временных рядов ЧП и ЗР за период 1992–2019 гг. Линейный статистический анализ применяли для более коротких временных рядов ЧП и ЗР (10–12 лет) на территории центральной АЕ ДФО для детей в возрасте до 4 лет. При этом кроме перечисленных пяти видов детского рака для категории «дети младшего возраста (0–4 лет)» были рассмотрены три дополнительных вида рака, а также пять доброкачественных новообразований. Анализ с применением модели ARIMA позволил выявить 27 связей между ЧП и ЗР с лагом от 0 до 3 лет в двух возрастных группах для пяти видов рака ( $0,002 < p < 0,1$ ). Линейный статистический анализ в группе «дети младшего возраста (0–4 года)» показал корреляции для трех из пяти видов рака, для двух из трех видов эмбрионального рака и трех из пяти видов доброкачественных опухолей ( $0,002 < p < 0,046$ ). Выводы: колебания заболеваемости опухолями гемопоэтических, лимфоидных тканей, сосудистыми опухолями, опухолями мягких тканей и ЦНС среди детей младшего возраста (0–4 года), детей/подростков в возрасте 0–14 лет и населения ДФО в целом отчасти связаны с лесными пожарами. Население ДФО в целом и дети в возрасте до 4 лет на территории центральной АЕ ДФО наиболее чувствительны к воздействию лесных пожаров. Связь «число пожаров — заболеваемость раком», как правило, имеет временной лаг от 0 до 3 лет.

**Ключевые слова:** лесные пожары, заболеваемость раком, модель ARIMA, Дальневосточный федеральный округ Российской Федерации

**Благодарности:** авторы благодарят профессора Н. Е. Косых из ДГМУ за помощь в сборе данных о заболеваемости злокачественными новообразованиями среди детей в Хабаровском крае, а также О. П. Грецову за подготовку данных для анализа. С. Вenevский выражает благодарность за поддержку Федеральному исследовательскому центру Южного научного центра РАН, оказанную в рамках Российского государственного задания (122013100131-9), и Департаменту системных наук о Земле Университета Цинхуа

**Вклад авторов:** С. К. Пинаев — идея, дизайн, сбор данных, формулировка гипотез; С. Вenevский — разработка метода нелинейного статистического анализа связей числа пожаров и заболеваемости раком, интерпретация результатов, выводы; В. В. Чаков — сбор информации о пожарной ситуации в ДФО; Л. Тянь — программирование модели ARIMA; А. Я. Чижов, П. Гонг, О. Г. Пинаева — планирование исследования, обсуждение результатов; А. Д. Каприн, В. В. Старинский — планирование исследования, формирование базы данных по заболеваемости раком на основе национального регистра онкологических заболеваний России; С. Вenevский, С. К. Пинаев — написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Константинович Пинаев  
ул. Муравьева-Амурского, д. 35, г. Хабаровск, 680000, Россия; pinaev@mail.ru

**Статья получена:** 25.04.2023 **Статья принята к печати:** 29.07.2023 **Опубликована онлайн:** 26.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.028

## POSSIBLE LINKS OF WILDFIRES WITH ONCOLOGICAL DISEASES OF CHILDREN AND ADULTS IN THE RUSSIAN FAR EAST

Pinaev SK<sup>1,8</sup>, Venevsky S<sup>2,3</sup>, Chakov VV<sup>1</sup>, Tian L<sup>4</sup>, Gong P<sup>4</sup>, Kaprin AD<sup>5</sup>, Starinsky VV<sup>5</sup>, Chizhov AY<sup>6,7</sup>, Pinaeva OG<sup>8</sup><sup>1</sup> Khabarovsk Federal Research Center, Far Eastern branch of the Russian Academy of Sciences, Khabarovsk, Russia<sup>2</sup> Tsinghua University, Beijing, China<sup>3</sup> The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia<sup>4</sup> The University of Hong Kong, Hong Kong<sup>5</sup> National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia<sup>6</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia<sup>7</sup> State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia<sup>8</sup> Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russia

Russian Federal Far East District is a continental scale area where wildfires are frequent. We aimed to a) determine whether wildfires are related statistically to cancer for children and adults in the Russian Federal Far East District (FFED); b) to estimate time lags of such relationships and c) to find out which age groups are most vulnerable for wildfires. Annual number of fires (NF) in administrative units (AUs), normalized to the maximum value for all AUs in observation period 1992–2019, was taken as a characteristic of wildfires in our analysis. Annual cancer incidence (CI) for five cancer types for children up to 14 years and the entire population, normalized similarly to NF, was compared to normalized NF. ARIMA models were used for time series analysis for the period 1992–2019. Linear statistical analysis was done for NF and CI for short time series (10–12 years) for the central AU of FFED for “children up to 4 years”; Three additional embryonal types of cancer and five benign types of tumors were also focused in linear statistical analysis. ARIMA analysis revealed 27 associations between NF and CI with a lag from 0 to 3 years for two age groups, and five cancer types ( $p$ -values between 0.002 and 0.1). Linear statistical analysis for “children up to 4 years” revealed correlations for two from three embryonal types of cancer and three from five benign tumors ( $0,002 < p < 0,046$ ). Incidences of hematopoietic, lymphoid, vascular, and soft tissue neoplasms, as well as CNS tumors had associations with wildfires for “children up to 4 years”, for “children up to 14 years” and “the entire population” age groups in many cases. Entire population and children up to 4 years in the central AU of FFED are most sensitive to wildfire — cancer interactions. Associations “number of fires — cancer incidence” as a rule have time lags from 0 to 3 years.

**Keywords:** wildfires, cancer incidence, ARIMA analysis, Far Eastern Federal district of Russian Federation

**Acknowledgments:** we thank Professor N.E. Kosykh from Far Eastern Medical University for their help in collecting data on the updated incidence of malignant neoplasms in children in Khabarovskij Krai. We acknowledged Olga P. Gretsova for preparing the data for analysis. S. Venevsky acknowledges the support from the Russian State Assignment of the Federal Research Centre of the Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (SSC RAS) (122013100131-9) and Department of Earth System Sciences of Tsinghua University.

**Author contribution:** Pinaev SK — author of the general idea and the main design of the study, collection and analysis of data, and formation of hypotheses; Venevsky S — developed method of spatial and non-linear temporal analysis, presentation and interpretation of results of this analysis and made conclusions; Chakov VV — collection and analysis of information about the fire situation in the Far Eastern Federal district on the basis of data presented in the public domain; Tian L — run ARIMA analysis; Chizhov AY, Gong P, Pinaeva OG — participated in the planning of the study and discussion of the results; Kaprin AD, Venevsky S — Participation in research planning and formation of data on CI based on the national cancer registry of Russia; Venevsky S, Pinaev SK — wrote the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey K. Pinaev  
Muravyova-Amurskogo, 35, Khabarovsk, 680000, Russia; pinaev@mail.ru

**Received:** 25.04.2023 **Accepted:** 29.07.2023 **Published online:** 26.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.028

Рост заболеваемости раком (ЗР) во всем мире связан не только с ростом численности и старением населения [1], но и с повышением уровня ряда экологических рисков, ассоциированных с социально-экономическим развитием и изменениями климата. Для понимания взаимосвязи между ЗР и условиями окружающей среды необходимы исследования больших пространственных масштабов — мировых, национальных и региональных. Такие исследования проводят [2], но пока их недостаточно.

Россия демонстрирует немного меньший прирост стандартизованной по возрасту ЗР всеми видами рака людей обоих полов в 195 странах и зависимых территориях в 2005–2015 гг. (0–10%) по сравнению с другими высококоразвитыми странами (10–20%) [3]. Однако сравнение показателей ЗР между регионами России показало, что причинами развития рака являются как старение населения, так и другие, факторы, среди которых и загрязнение воздуха. Так, сравнение стандартизованных показателей заболеваемости всеми видами рака в Российской Федерации (РФ) с показателями Дальневосточного федерального округа (ДФО) продемонстрировало, что в России в 2019 г. она составила 249,54 на 100 000 населения против 269,15 в ДФО [4]. Между тем, средний возраст населения в ДФО ниже, чем в остальных федеральных округах (и на два года ниже, чем во всей России) [5]. Лесные пожары могут быть одним из факторов, провоцирующих развитие рака в ДФО. Анализ данных дистанционного зондирования Земли подтверждает наличие тенденции к значимому увеличению площади горящих лесов с 2000 по 2016 г. в России, которая сохраняется по сей день, предположительно из-за продолжающихся изменений климата [6]. Основной вклад в увеличение сгоревшей площади лесов вносят Дальневосточный и Сибирский федеральные округа; в этих округах очаги возгорания в основном возникают вблизи крупных городов, особенно вблизи южной границы азиатской части РФ [6]. Дым лесных пожаров содержит взвешенные частицы PM<sub>2.5</sub>/PM<sub>4</sub> и канцерогены, такие как бензол и формальдегид, увеличивающие риск развития рака [7]. Другие факторы загрязнения воздуха в ДФО, такие как промышленные выбросы и выхлопные газы автотранспорта [8], а также табакокурение, способные влиять на ЗР, близки к средним по России [9]. Таким образом, воздействие дыма лесных пожаров на население, проживающее в населенных пунктах на юге ДФО, может объяснять большие показатели ЗР в регионе.

Задымление от лесных пожаров приводит к различным негативным последствиям для здоровья человека [7], увеличивая как смертность, так и частоту сердечно-сосудистых, респираторных и других заболеваний. Содержащиеся в дыму твердые частицы представляют собой значимый стрессогенный фактор, влияющий на здоровье человека посредством окислительного стресса, способного вызывать гибель клеток, повреждение ДНК и воспаление [10], поэтому такие взвешенные частицы в воздухе были классифицированы Международным агентством по изучению рака как канцероген группы 1 в отношении рака легких и, вероятно, других видов рака [11]. Таким образом, длительное воздействие взвешенных частиц и других содержащихся в дыме лесных пожаров канцерогенов на человека может влиять на смертность от онкологических заболеваний и/или заболеваемость раком. Впервые на связь между лесными пожарами и злокачественными новообразованиями органов дыхания указали Добрых В. А. и Захарычева Т. А. [12]. В

последующем это было подтверждено исследователями из Канады, которые установили влияние дыма природных пожаров и на заболеваемость опухолями головного мозга [13]. Лесные пожары связаны также с частотой различных новообразований у детей и взрослых [14, 15].

Рак представляет собой класс заболеваний, принимающих различные формы и имеющих различные проявления. У рака, разрушающего разнообразные ткани-мишени, может быть множество причин. Кроме того, у детей младшего возраста «до 4 лет», детей/подростков в возрасте до 14 лет и населения в целом различные виды рака вносят разный вклад в показатели общей ЗР по возрастным группам [3]. Таким образом, анализ ЗР как минимум в двух возрастных группах (дети/подростки в возрасте до 14 лет и население в целом) в условиях загрязнения воздуха может обеспечить полную картину взаимосвязи между лесными пожарами и развитием основных видов рака.

Нами проведено исследование возможности существования временной связи между лесными пожарами и заболеваемостью раком с 1992 по 2019 г. в двух возрастных группах (у детей/подростков в возрасте до 14 лет и населения в целом) на территории ДФО России, где часто бывают лесные пожары, с использованием среднегодового числа пожаров за указанный период в качестве условного показателя долговременного воздействия дыма на человека. Мы также проанализировали связь между числом пожаров (ЧП) и заболеваемостью раком в одной возрастной когорте детей младшего возраста (0–4 года) с 1972 по 1986 г. в Хабаровском крае (центральная административная единица ДФО до 2018 г.). Целью настоящего исследования было: а) выяснить, существуют ли значимые временные связи между заболеваемостью различными видами рака и ЧП на территории ДФО в одной возрастной когорте (дети раннего возраста) и двух группах населения (дети/подростки в возрасте 0–14 лет и население в целом) для ЧП и ЗР; б) оценить временные лаги указанных связей; в) выяснить, какие возрастные группы статистически наиболее чувствительны к воздействию пожаров. Наличие больших географических районов, в которых возможно существование статистической связи между характеристиками лесных пожаров и онкологическими заболеваниями широкого спектра, было основной гипотезой этого исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

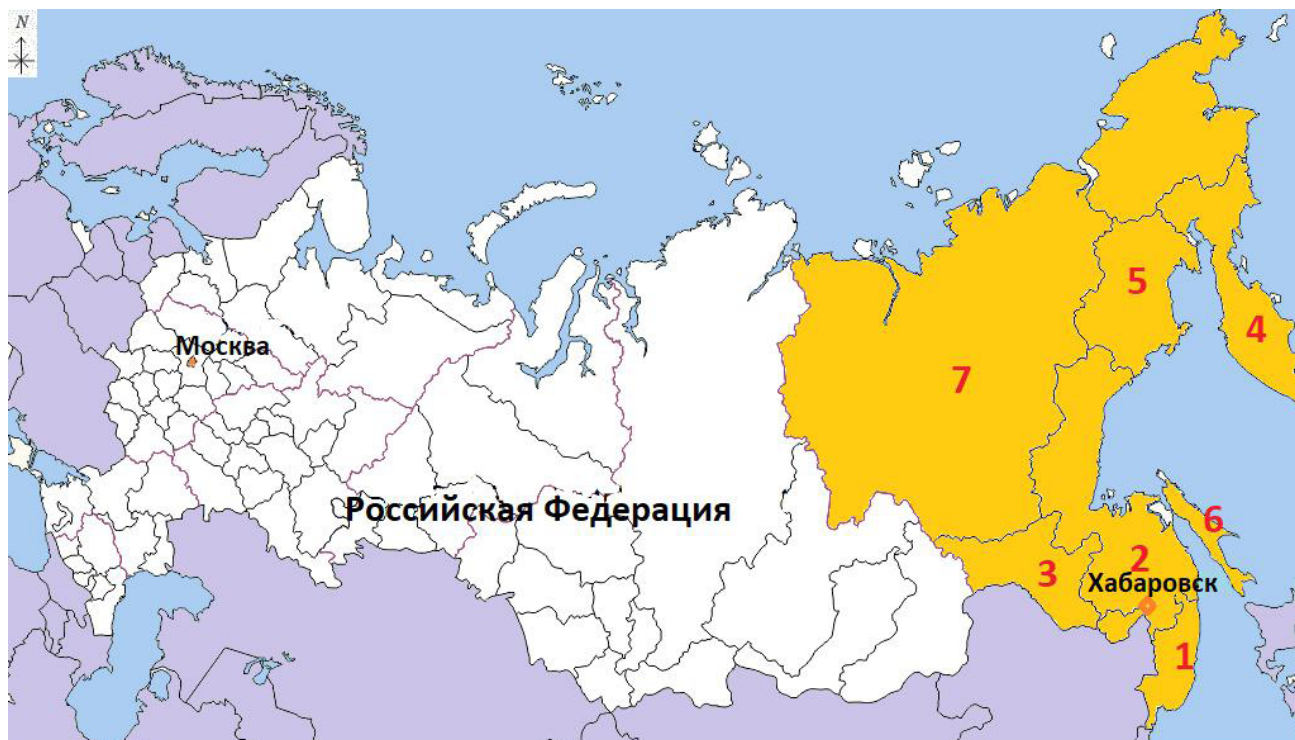
### Изучаемая территория

ДФО — это малонаселенный округ (площадь 6,9 млн км<sup>2</sup>), имеющий ряд особенностей климата, растительного покрова и рельефа. Большая часть населения ДФО проживает в крупных городах на юге округа. Были рассмотрены семь административных единиц (АЕ) ДФО с развитой системой медицинской регистрации (рис. 1).

#### *Определение пространственных районов и классификация рака*

Пространственные районы, в которых исследовали возможную связь между лесными пожарами и онкологическими заболеваниями, строились на основе семи АЕ ДФО. Каждый пространственный район представлял собой комбинацию из одной, двух,





**Рис. 1.** ДФО РФ в границах до 2018 г. (показано желтым) и используемые в ходе исследования АЕ: 1 — Приморский край; 2 — Хабаровский край; 3 — Амурская область; 4 — Камчатский край; 5 — Магаданская область; 6 — Сахалинская область. Хабаровск — крупнейший город ДФО (население 613 тыс. человек) и столица ДФО до 2018 г.

трех и т. д. до семи АЕ. Наличие связи «лесные пожары/онкологические заболевания» было проанализировано для всех 127 возможных пространственных районов ( $C_7^1 + C_7^2 + C_7^3 + C_7^4 + C_7^5 + C_7^6 + C_7^7 = 127$ ), где  $C_7^m$  — число комбинаций из  $m$  по семи АЕ) в двух возрастных группах (дети и подростки в возрасте 0–14 и население в целом). В целях сравнения двух возрастных групп этиологию различных видов рака не рассматривали. Для анализа были взяты основные встречающиеся у детей виды рака в соответствии с международной классификацией злокачественных новообразований [16]. Проанализированы пять основных видов злокачественных новообразований (лейкоз (Л), лимфома Ходжкина (ЛХ), неходжкинские лимфомы (НХЛ), опухоли центральной нервной системы (ЦНС) и саркомы мягких тканей (СМТ)), которые составляют большинство случаев рака у детей как в промышленно развитых странах, таких как Россия, так и во всем мире (около 75%) [16].

Более подробно была изучена возможность наличия связи «лесные пожары/онкологические заболевания» для категории детей младшего возраста (0–4 лет) на примере крупнейшего города ДФО, Хабаровска и Хабаровского края (центральная АЕ до 2018 г.). Выбор дополнительной категории «дети младшего возраста (0–4 лет)» для анализа был сделан потому, что опухоли у детей младше пяти лет в основном возникают в пренатальном периоде [17], тогда как реализация влияния канцерогенов на уровне всей популяции может занять несколько лет или даже десятилетий [18]. Кроме перечисленных пяти видов рака у детей для категории «дети младшего возраста (0–4 лет)» были рассмотрены три дополнительных вида рака (ретинобластома, нейробластома, нефробластома), а также пять доброкачественных новообразований (ДН), наиболее часто встречающихся у детей раннего возраста: гемангиомы, лимфангиомы, тератомы, опухоли мягких тканей и папилломы.

#### *Выбор численной характеристики лесных пожаров в АЕ ДФО для анализа возможных взаимосвязей «лесные пожары/онкологические заболевания»*

Поскольку данные о подробном пространственном и сезонном распределении очагов пожаров ограничены 1996 г. [19], а пространственно-временное распределение ЗР доступно только на уровне годовых значений зарегистрированных в АЕ, для характеристики пожаров можно было использовать годовые значения либо числа пожаров в АЕ, либо сгоревших площадей в АЕ. Канадские исследователи предложили использовать для анализа возможных взаимосвязей «лесные пожары/онкологические заболевания» годовые величины сгоревших площадей в радиусе 30–50 км от населенных пунктов [20]. Тем самым во внимание принимали эпизоды задымления с наибольшим риском для населения. Однако использовать общую годовую сгоревшую площадь в АЕ на территории ДФО в качестве условного показателя воздействия дыма лесных пожаров на население ДФО не представляется возможным из-за неравномерного размещения населенных пунктов в ДФО (все крупнейшие населенные пункты расположены к югу от 55-й параллели). И наоборот, годовое общее число пожаров на территории АЕ ДФО является хорошим условным показателем риска долговременного воздействия канцерогенов от пожаров. Так, можно наблюдать сильную корреляцию между этим показателем и площадью пожаров в пяти южных густонаселенных АЕ ДФО (см. приложение «Количественный анализ общего числа пожаров, числа антропогенных и вызванных молниями пожаров в административных единицах Дальнего востока России»), а число антропогенных пожаров (возникающих практически исключительно вблизи городов, как и в Канаде) практически равно общему числу пожаров в этих пяти АЕ. В административных единицах с обширной малозаселенной территорией (Республика



Саха и Магаданская область) общая площадь пожаров коррелировала с числом пожаров, вызванных молниями, которые были немногочисленными, в то время как число антропогенных пожаров (возникающих вблизи городов) коррелировало с общим числом пожаров в этих двух АЕ. Пожары в заселенных южных областях и около поселений в северных областях в основном представляют собой небольшие по длительности, но многочисленные, низовые пожары, которые генерируют основные воздействующие на население выбросы (в том числе содержащие канцерогены), в то время как крупные по площади и продолжительные лесные пожары происходят в основном в труднодоступных областях на севере. Таким образом, в настоящем исследовании годовое общее число пожаров на территории АЕ ДФО принято в качестве характеристики для анализа возможных взаимосвязей «лесные пожары/онкологические заболевания».

### Данные

В ходе исследования использовали данные заболеваемости (число случаев рака на 100 000 населения) пятью наиболее распространенными видами рака на территории семи перечисленных выше областей (или АЕ) в двух возрастных группах (дети и подростки в возрасте 0–14 и население в целом) за 28-летний период (1992–2019 гг.) (табл. 1 в приложении). Данные представляют собой число всех случаев рака, зарегистрированных в течение года в одной из групп населения на территории АЕ, на сто тысяч человек из этой группы (например, для возрастной группы детей/подростков в возрасте 0–14 лет в 1992 г. это число случаев рака различных видов у людей, рожденных в 1978–1992 гг. на территории АЕ, поделенное на общее число детей/подростков, чей возраст составил 0–14 лет в 1992 г, выраженное в 100 000 человек, проживающих на территории этой АЕ). Сведения были извлечены из массива данных федерального статистического наблюдения с помощью информационно-аналитической системы управления базами данных (номер в реестре российского программного обеспечения 2011617155) в Российском центре информационных технологий и эпидемиологических исследований в онкологии имени П. А. Герцена (автор О. П. Грецова, 2020). Мы также проанализировали данные по частоте опухолей у детей младшего возраста (0–4 лет). Был осуществлен сбор собственных данных по крупнейшему городу ДФО, Хабаровску (население более 613 тыс. человек), который был столицей ДФО до 2018 г, и имеет наиболее развитую медицинскую информационную систему, а также по Хабаровскому краю (центральная АЕ до 2018 г.). Выполнен сбор данных людей, рожденных в 1976–1986 гг. Данные были собраны для общего числа рожденных в 1976–1986 гг. в Хабаровске (доброкачественные опухоли) (табл. 2 в приложении) и рожденных в 1972–1988 гг. в Хабаровском крае (злокачественные опухоли) (табл. 3 в приложении).

Информация о годовом числе пожаров в семи АЕ (табл. 4 в приложении) получена из базы данных Российского министерства лесного хозяйства.

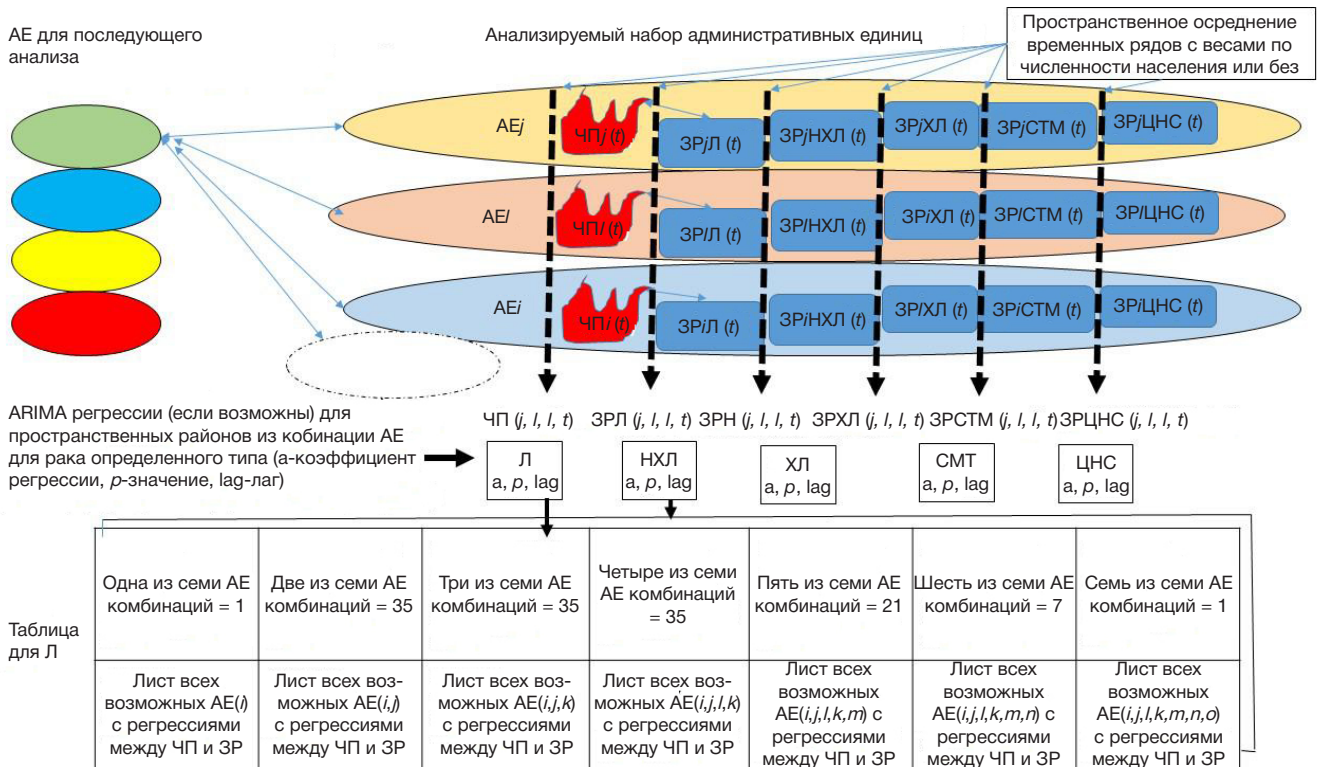
### Статистический анализ

Для анализа наличия динамической статистической связи между ЗР и ЧП значения ЗР для каждого из пяти видов рака за год и общее число пожаров за год были предварительно приведены к максимальным значениям

за весь 28-летний период для всех из семи АЕ. Такая нормировка дает возможность сравнения амплитуды, трендов, числа циклов, авторегрессионных свойств внутрениней динамики между временными рядами ЗР и ЧП. Такой подход не позволяет определить величину факторной зависимости ЗР от ЧП (так как это не входит в цели нашего исследования), но позволяет устранить влияние множественных региональных кофакторов, влияющих на онкологические заболевания при статистическом анализе.

Сначала было проверено, существуют ли статистически значимые различия медиан нормированных значений ЧП и ЗР в каждом из пяти типов рака и в каждой из двух возрастных групп во всех семи АЕ ДФО. Для этого применяли тест Крускала–Уоллиса с допустимым порогом значимости  $\alpha = 0,05$ . Такое же исследование проводили после того, как нормированные ЗР и ЧП за год были взвешены по соотношению численности населения в каждой АЕ к общей численности населения в пределах ДФО. Дополнительно было проверено существование статистически значимых различий между ЗР пяти типов рака (также и для взвешенных по численности населения временных рядов) в каждой из семи АЕ ДФО путем применения теста Крускала–Уоллиса с допустимым порогом значимости  $\alpha = 0,05$ .

Временную зависимость ЗР (нормированной) от ЧП (нормированного) для длительного периода времени (28 лет) исследовали, используя модель ARIMA [20], которую применяют и для описания характеристик пожаров [21], и для описания ЗР [22]. Модель ARIMA в первую очередь применили для статистической аппроксимации ЧП с временным лагом 0–6 лет. (За верхнюю границу лага было взято двойное время обновления большинства клеток организма.) Затем моделью ARIMA аппроксимировали ЗР (по всем видам рака). Для полученных аппроксимированных временных рядов ЧП и ЗР вычислили перекрестные регрессии с целью выявить статистические связи. Статистически значимой связи между ЧП с лагом 0–6 лет и ЗР по видам рака должно было соответствовать  $p < 0,05$ , а маргинально значимой связи должно было соответствовать значение  $p$  между 0,1 и 0,05. К статистически значимым связям применяли критерий Льюнга–Бокса, чтобы убедиться, что остаточные ряды являются «белым шумом», говорящим об адекватности выявленной связи. Статистические связи «ЧП/ЗР» исследовали в двух возрастных группах (дети и подростки в возрасте 0–14 и население в целом) для 127 пространственных районов, включающих различные наборы комбинаций АЕ ( $C^1_7 + C^2_7 + C^3_7 + C^4_7 + C^5_7 + C^6_7 + C^7_7 = 127$ ) (рис. 2). Временные ряды ЗР для каждого вида рака и временные ряды ЧП для всех АЕ в пределах одной комбинации объединяли, чтобы получить пять временных рядов ЗР и один временной ряд ЧП для 28-летнего периода в пределах пространственного района, представленного этой комбинацией. Объединение в один временной ряд ЗР и ЧП из первоначальных временных рядов выполняли двумя способами: 1) для каждого года рассчитывали среднюю ЗР за год для всех АЕ из комбинации и 2) ЗР и ЧП за год были взвешены по соотношению численности населения в каждой АЕ к общей численности населения в пределах пространственного района перед суммированием данных за каждый год (взвешивание по популяционному вкладу). Применение двух методов вычисления при объединении временных рядов ЗР и ЧП дает схожие результаты, но некоторые различия в значениях все же присутствуют



**Рис. 2.** Схема анализа временных рядов для одной из двух возрастных групп, где ЧП<sub>l</sub>(t) — временной ряд нормированного показателя общего числа пожаров на территории административной единицы (АЕ)<sub>l</sub> за 28 лет, ЗР/Л(t) — временной ряд нормированного показателя заболеваемости лейкозом на территории АЕ(i) за 28 лет (аналогичные сокращения использованы для остальных четырех видов рака), ЧП<sub>ijl</sub>(t) — временной ряд нормированного показателя общего числа пожаров на территории объединенных АЕ(i, j, l) за 28 лет, ЗР<sub>ijl</sub>(t) — временной ряд нормированного показателя заболеваемости лейкозом на территории АЕ(i, j, l), объединенных с применением одного из двух алгоритмов объединения, за 28 лет (аналогичные сокращения использованы для остальных четырех видов рака)

(не представлены). Сто двадцать семь пространственных районов были поделены на семь классов (от одной до семи комбинированных АЕ в каждом классе), для каждого класса был определен перечень корреляционных связей «ЧП/ЗР» в контексте модели ARIMA с соответствующими коэффициентами регрессии, значениями  $\rho$  и временными лагами (рис. 2). Для оценки вероятности групповой ошибки первого рода при многократном проведении ARIMA для каждой возрастной группы и каждого типа рака применяли поправку Холма–Бонферрони с порогом значения  $\alpha = 0,1$  и  $\alpha = 0,05$ .

Короткие временные ряды заболеваемости различными видами рака и доброкачественными новообразованиями в когортах детей младшего возраста (0–4 года) исследовали путем применения линейной регрессии и корреляционного анализа. Рассмотрели возможность существования временных лагов вызванного загрязнением стресса при развитии опухолей и провели линейный регрессионный и корреляционный анализ зависимости ЗР от ЧП в центральной АЕ ДФО с временным лагом (лет) относительно года рождения детей младшего возраста 0–4 года в когортах (–3, –2, –1, 0, 1, 2, 3).

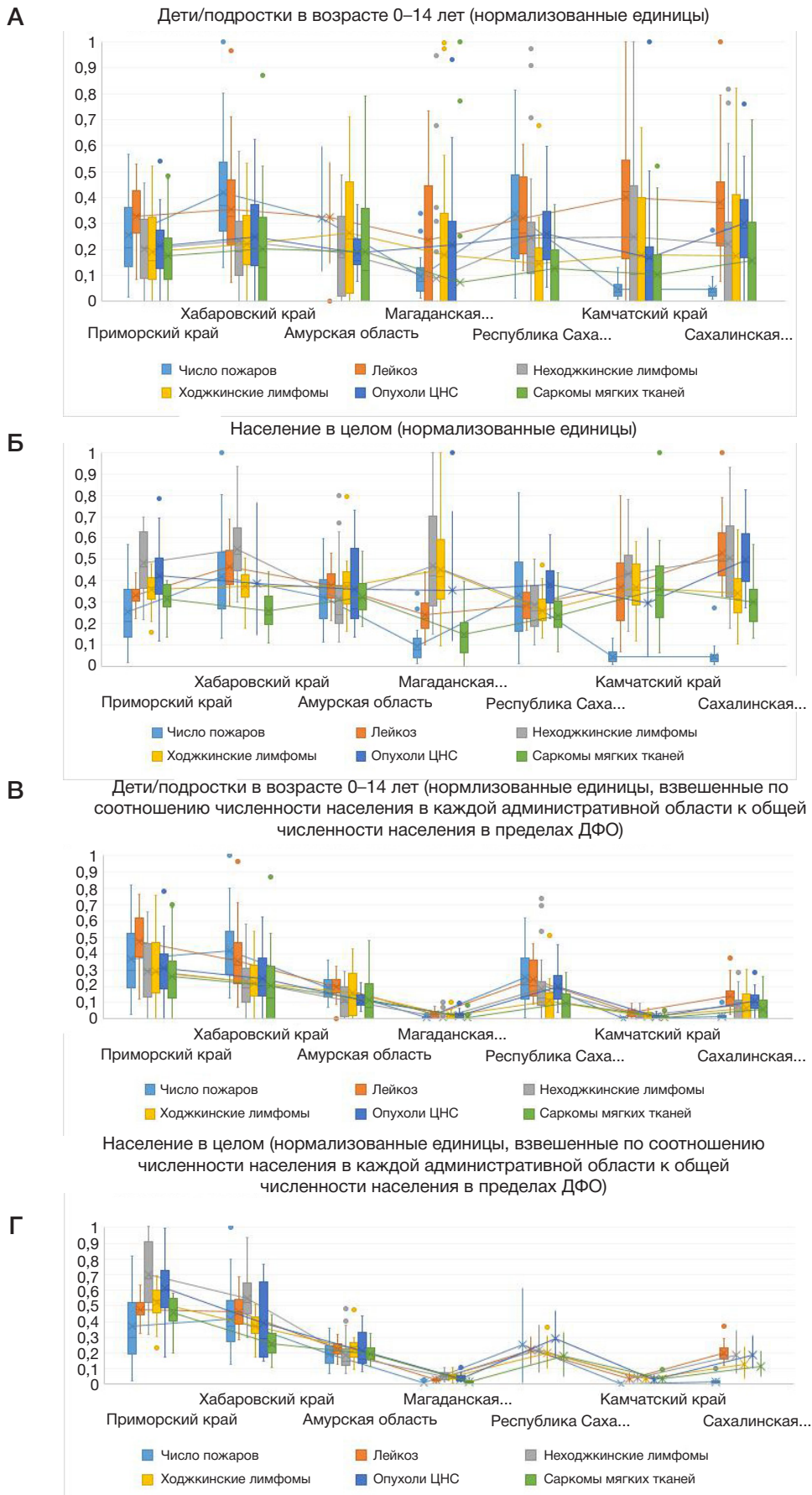
Анализ временных зависимостей ЗР (нормированной) от ЧП (нормированного) был обобщен построением распределения числа всех найденных ассоциаций ЗР/ЧП для двух возрастных групп в ДФО при пороге статистической значимости  $\alpha = 0,1$  и  $\alpha = 0,05$ . Приводили абсолютные значения числа найденных ассоциаций ЗР/ЧП, рассчитанных моделью ARIMA, как описано выше, к максимальному из всех пяти видов рака значению и получали относительную силу (ОС) связей между числом пожаров и заболеваемостью пятью видами рака в двух возрастных группах при двух значениях  $\alpha$ .

Для обобщения линейного статистического анализа было построено распределение коэффициента детерминации линейной регрессии ЗР/ЧП по всем видам рака и по доброкачественным опухолям для детей младшего возраста 0–4 года в центральной АЕ ДФО.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Сравнение распределений нормированных показателей заболеваемости раком и числа пожаров для АЕ ДФО**

Мы установили, что значения медиан нормированных показателей ЗР для всех пяти видов рака в каждой из АЕ ДФО имеют статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) как для возрастной группы «дети/подростки в возрасте 0–14 лет», так и для возрастной группы «население в целом», и для нормированных единиц и для нормированных единиц, взвешенных по соотношению численности населения в каждой АЕ к общей численности населения в пределах ДФО (рис. 3А, Г). Медианы почти всех показателей ЗР и ЧП (одиннадцати для нормированных единиц и двенадцати для нормированных взвешенных) имеют статистически значимые различия в группе из семи АЕ ДФО для обеих наших возрастных групп. Исключением является лейкоз для возрастной группы «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» для нормированных единиц ( $p = 0,0536$  близко к пороговому). Взвешивание по соотношению численности населения в каждой АЕ к общей численности населения в пределах ДФО улучшает разделение распределений и ЗР и ЧП по АЕ и статистическую значимость различия медиан и для возрастной группы «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» (рис. 3А, В) и для возрастной группы «население в



**Рис. 3.** Сравнение распределений нормированных показателей заболеваемости раком и числа пожаров для АЕ ДФО. **А.** Возрастная группа «дети/подростки в возрасте 0–14 лет». **Б.** Возрастная группа «население в целом». **В.** Возрастная группа «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» при взвешивании по соотношению численности населения в каждой АЕ к общей численности населения в пределах ДФО. **Г.** Возрастная группа «население в целом» при взвешивании по соотношению численности населения в каждой АЕ к общей численности населения в пределах ДФО

Коэффициент детерминации регрессии между числом пожаров и заболеваемостью раком для детей младшего возраста 0–4 года в Хабаровском крае при статистической значимости менее 0,05

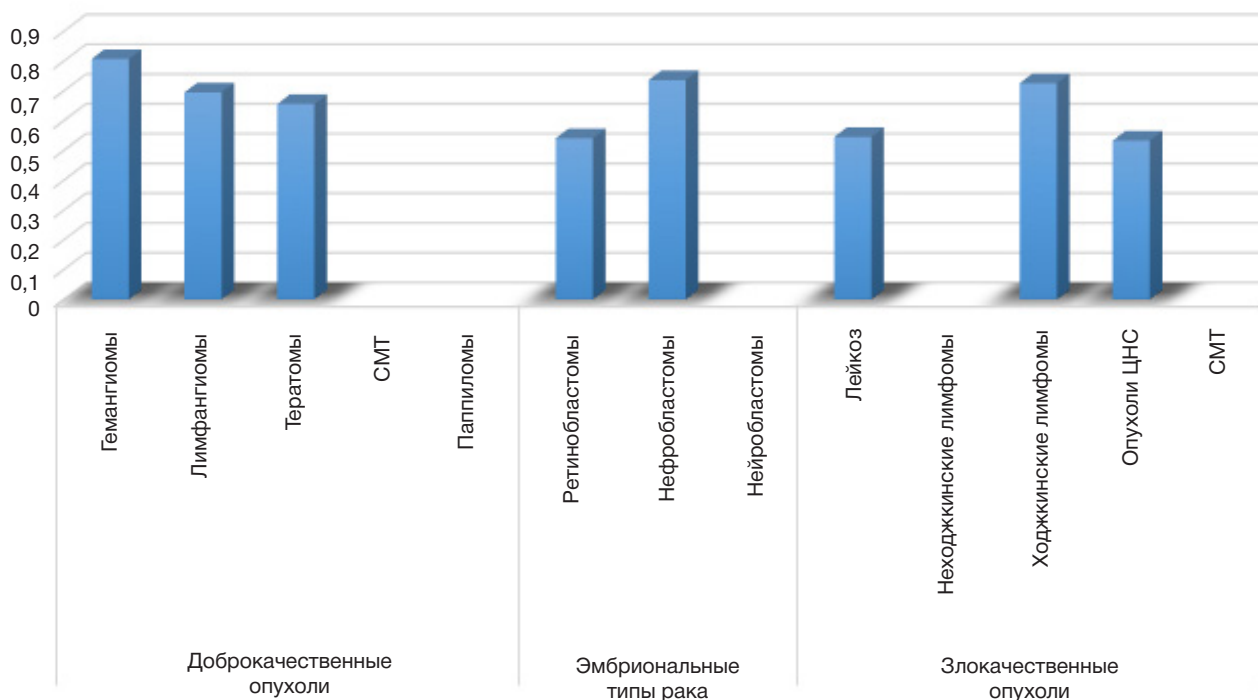


Рис. 4. Коэффициент детерминации  $R^2$  для линейной регрессии между числом пожаров и заболеваемостью раком для детей младшего возраста 0–4 года в Хабаровском крае

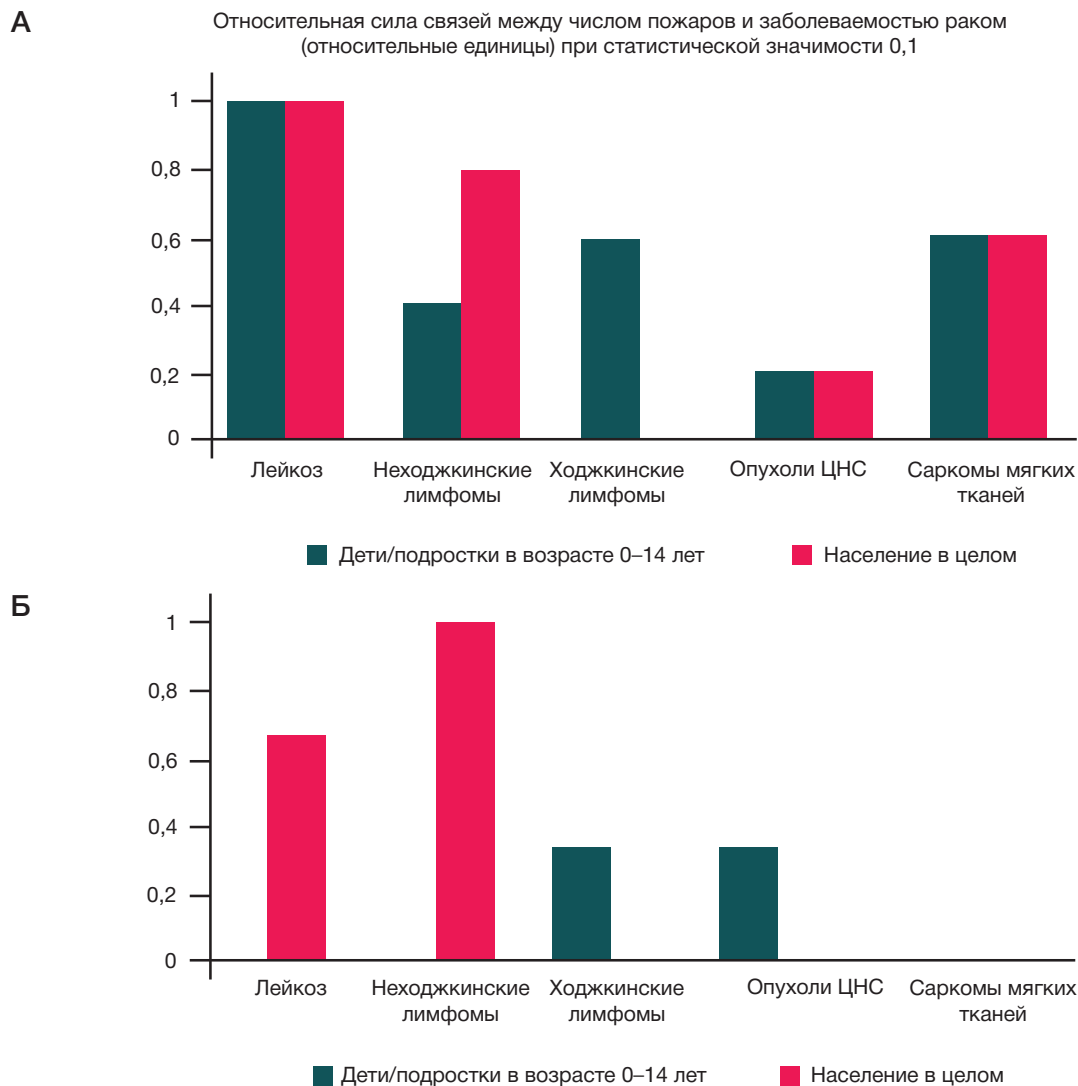
целом» (рис. 3Б, Г). Разброс нижних и верхних квартилей распределений ЗР для возрастной группы «дети/подростки в возрасте 0–14 лет», как правило, выше, чем для возрастной группы «население в целом». Распределения ЧП и ЗР расходятся наиболее выражено и по значению медианы и по значениям нижнего и верхнего квартилей для Камчатского края и Сахалинской области.

#### Временной анализ связи между ЧП и ЗР по видам рака и пространственным районам с различными АЕ

Статистически значимые ассоциации между временными рядами нормированных ЧП и ЗР для различных видов рака при маргинальном пороге значимости  $\alpha = 0,1$ , полученных с применением двух методов объединения с лагом 0–3 года при контроле групповой вероятности ошибки первого рода при многократном применении ARIMA, были выявлены для 27 пространственных районов из различных комбинаций АЕ в двух возрастных группах — «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» и «население в целом». При пороге статистической значимости  $\alpha = 0,05$  ассоциации ЧП/ЗР были выявлены для восьми пространственных районов (см. приложение «Перечень пространственных районов с наличием ассоциаций ARIMA между числом пожаров и заболеваемостью раком по видам рака с коэффициентами регрессии и уровнями значимости ( $p$ ) с порогом значения  $\alpha = 0,1$  и  $\alpha = 0,05$  после применения поправки Холма–Бонферрони»). Большинство (шесть из восьми) ассоциаций ЧП/ЗР, выявленных для порогового значения статистической значимости  $\alpha = 0,05$ , были найдены для метода объединения АЕ с взвешиванием временных рядов по популяционному вкладу. Камчатский край и Сахалинская область, для которых распределения ЧП и ЗР значительно расходятся (см. выше), не встречаются во всех

27 выявленных пространственных районах с статистически значимыми ассоциациями ЧП/ЗР. Объединенные друг с другом четыре наиболее густонаселенные АЕ (Приморский край – Хабаровский край – Амурская область – Республика Саха) продемонстрировали наибольшее число (шесть) выявленных статистических ассоциаций между ЧП и ЗР при пороге значимости  $\alpha = 0,1$  (из них две ассоциации найдены при пороге значимости  $\alpha = 0,05$ ). Однако добавление к объединенной комбинации АЕ с меньшей численностью населения может исказить выявленные ранее ассоциации. В ряде случаев полученные с применением модели ARIMA коэффициенты регрессии ЧП относительно ЗР были отрицательными (см. приложение «Перечень пространственных районов с наличием ассоциаций ARIMA между числом пожаров и заболеваемостью раком по видам рака с коэффициентами регрессии и уровнями значимости ( $p$ ) с порогом значения  $\alpha = 0,1$  и  $\alpha = 0,05$  после применения поправки Холма–Бонферрони»). Такие отрицательные коэффициенты регрессии были получены в возрастной группе «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» для лейкоза (только для временного лага 2 года, но не для других значений), опухолей ЦНС (лаг 3 года) и саркомы мягких тканей (лаг 2 года), а также в возрастной группе «население в целом» для лейкоза (только для временных лагов 2 и 3 года, но не для других значений). С помощью анализа с применением модели ARIMA мы установили, что временные лаги статистических ассоциаций между ЧП и ЗР для отдельно взятого вида рака мало зависят от географического региона, но предположительно определяются этиологией этого вида рака. Временные лаги составляют от нуля (НХЛ у детей) до трех лет (опухоли ЦНС у детей/подростков в возрасте 0–14 лет), однако в большинстве случаев они равны 2–3 годам.





**Рис. 5.** Относительная сила связей (от 0 до 1) между нормированными показателями числа пожаров и заболеваемости пятью видами рака в двух возрастных группах при допустимом пороге значимости  $\alpha = 0,1$  (А); при допустимом пороге значимости  $\alpha = 0,05$  (Б)

**Результаты линейного анализа статистических зависимостей между ЧП и заболеваемостью доброкачественными, эмбриональными и злокачественными опухолями по видам в возрастной когорте «дети младшего возраста (до 4 лет)»**

Значимые положительные корреляции между ЧП и заболеваемостью онкологическими заболеваниями в возрастной группе «дети младшего возраста (0–4 года)» были выявлены для периода 1972–1986 г. в Хабаровском крае/Хабаровске. Корреляции имели место во всех трех проанализированных группах — с доброкачественными (в 3 из 5 проанализированных  $0,66 < R^2 < 0,84$ ;  $0,003 < p < 0,014$ ), эмбриональными (в 2 из 3 проанализированных  $0,54 < R^2 < 0,74$ ;  $0,037 < p < 0,046$ ) и злокачественными (в 3 из 5 проанализированных  $0,533 < R^2 < 0,73$ ;  $0,009 < p < 0,036$ ) опухолями (рис. 4).

Ходжкинские лимфомы имеют наибольший коэффициент детерминации  $R^2$  для линейной регрессии между числом пожаров и заболеваемостью раком для детей младшего возраста 0–4 года в Хабаровском крае. В среднем  $R^2$  для доброкачественных опухолей для детей младшего возраста 0–4 года выше, чем для злокачественных опухолей.

В возрастной группе 0–4 года было установлено как пренатальное, так и постнатальное воздействие пожаров,

которое видно из временных лагов (см. приложение «Линейный статистический анализ»), которые близки к временным лагам, используемым при проведении анализа с применением модели ARIMA для подобных видов рака.

**Связь между видами рака и лесными пожарами**

Относительная сила (ОС) связей (от 0 до 1) между нормированными показателями числа пожаров и заболеваемости, просуммированная для пяти видов рака, выше для возрастной группы «население в целом» как при допустимом пороге значимости  $\alpha = 0,1$  (рис. 5А), так и при допустимом пороге значимости  $\alpha = 0,05$  (рис. 5Б). Лейкемия и неходжкинские лимфомы составляют наибольший куммулятивный вклад в относительную силу связей для возрастной группы «население в целом» в обоих случаях.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Статистический анализ временных рядов ЗР по пяти видам рака против ЧП подтверждает наличие статистических ассоциаций ЗР/ЧП в районах, состоящих из комбинаций пяти АЕ ДФО, исключая Камчатский край и Сахалинскую область. Мы предполагаем, что

отсутствие статистических значимых ассоциаций ЗР/ЧП в комбинациях, включающих Камчатский край и Сахалинскую область, может быть объяснено морским климатом в этих двух АЕ, определяющим распространение дыма от лесных пожаров. Эта гипотеза, равно как и гипотеза существования других крупномасштабных экологических пространственных детерминант, определяющих наличие или отсутствие статистически значимых ассоциаций ЗР/ЧП, должна быть изучена в дальнейшем.

По нашим результатам, пространственные районы, состоящие из АЕ с большой численностью населения, демонстрируют наибольшее число статистических ассоциаций между ЧП и ЗР. Это можно объяснить: а) большим размером выборок и/или б) лучшим качеством медицинских информационных систем в регионах с высокой численностью населения. Разъяснение влияния демографических и логистических пространственных причин на наличие или отсутствие статистически значимых ассоциаций ЗР/ЧП в объединениях АЕ ДФО — это тоже тема будущих исследований.

Можно предположить, что отрицательные коэффициенты регрессии ARIMA, полученные в ряде районов объединений АЕ ДФО для некоторых видов рака, обусловлены отсутствием сезонности в данных по заболеваемости. Сезонность в данных по заболеваемости связана с недостаточной регистрацией онкологических заболеваний в период летних отпусков [23]. Можно предположить, что в таких случаях онкологические заболевания возникают под действием задымления от крупных пожаров, летом предыдущего года в период сезонных отпусков, но регистрируются в холодное время в начале следующего года (т. е. к лагу прибавляются 0,5 года, которые следует округлить, прибавив 1 год). Примером такой ситуации может предположительно служить результат анализа ARIMA для лейкоза в возрастной группе «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» в районе, состоящем из Приморского края, Хабаровского края и Республики Саха (см. приложение «Перечень пространственных районов с наличием ассоциаций ARIMA между числом пожаров и заболеваемостью раком по видам рака с коэффициентами регрессии и уровнями значимости ( $p$ ) с порогом значения  $\alpha = 0,1$  и  $\alpha = 0,05$  после применения поправки Холма–Бонферрони»). Коэффициент ARIMA регрессии ЗР (лейкемия)/ЧП в этом случае отрицателен для лага в 2 года и положителен для лага в 3 года. Это может быть объяснено тем, что часть новых летних случаев заболеваемости лейкозом года 2 была зарегистрирована в начале года 3 зимой. Эта гипотеза, однако, требует дальнейшего изучения.

Мы обнаружили более сильную связь (с точки зрения ОС) между ЧП и ЗР в возрастной группе «население в целом» для большинства из пяти видов рака (рис. 5). Это можно объяснить несколькими причинами: 1) только демографическими причинами, т. е. более длительным воздействием содержащихся в дыму канцерогенов по причине больших возрастных границ группы; 2) геронтологическими причинами, т. е. включением в группу пожилых людей, восприимчивых к множеству заболеваний, в том числе онкологических; 3) социально-экономическими причинами, т. е. результатами воздействия сопутствующих факторов, таких как курение сигарет или длительное воздействие промышленных и/или сельскохозяйственных канцерогенов на некую часть «населения в целом». В дальнейшем следует учесть синергический эффект сопутствующей эмиссии твердых

частиц в отношении рака (например, связанную с отоплением эмиссию твердых частиц зимой в ДФО [24]) и совместное воздействие жары и дыма лесных пожаров (например, как во время лесных пожаров в Москве в 2010 г. [25]).

Существует обширный массив экспериментальных данных и данных наблюдения, подтверждающих канцерогенное воздействие дыма лесных пожаров на человека [7]. Попадание в кровь канцерогенных химических веществ и частиц дыма приводит к окислительному стрессу, который, в свою очередь, вызывает мутации и непосредственное повреждение хромосом [26]. Развитие трех видов рака крови (лейкоз, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина), по-видимому, наиболее тесно связаны с лесными пожарами — не только потому, что канцерогены из дыма проникают непосредственно в кровь, но и потому, что имеет место взаимодействие между окислительным стрессом с другими немедленными неблагоприятными внешними воздействиями на человека. Например, хорошо изучена связь заболеваемости неходжкинской лимфомой с экологическими факторами и определенным образом жизни [27]. Установлено, что экологические факторы, которые способствуют более длительному контакту с вирусом или усиливают ответ на вирус (ВИЧ, наиболее активный из таких вирусов среди всего населения), создают риск развития неходжкинских лимфом. Вероятнее всего, лесные пожары влияют на развитие неходжкинских лимфом, ослабляя иммунную систему человека при вдыхании дыма, что в дальнейшем усиливает ответ на вирусы.

Наши результаты показывают статистически значимую связь заболеваемости лимфомой Ходжкина и числа пожаров и в ДФО для возрастной группы «дети/подростки в возрасте 0–14 лет» и для детей младшего возраста 0–4 года в Хабаровском крае (порог значимости  $\alpha < 0,05$ ). Мы полагаем, что воздействие пожаров на развитие лимфомы Ходжкина у детей связано с респираторными заболеваниями от воздействия дыма, ослабляющими иммунитет с дальнейшей активизацией новой или хронической инфекции вирусом Эпштейна–Барра (ВЭБ). ВЭБ относится к первому классу канцерогенов по категории Всемирной организации здравоохранения и педиатрическая лимфома Ходжкина (у детей до 10 лет) на 80% ассоциирована с ВЭБ [28].

Некоторые авторы считают лейкоз предотвратимым заболеванием [29], так как подтверждено повышение риска развития лейкоза у детей младшего возраста под воздействием табачного дыма или выхлопных газов автомобилей в пренатальном и постнатальном периоде [30]. Проведенный нами анализ продемонстрировал неблагоприятное воздействие лесных пожаров на риск развития лейкоза в пренатальном периоде для детей младшего возраста (0–4 года), а также для детей/подростков в возрасте 0–14 лет и населения в целом с различными временными лагами.

На примере детей младшего возраста (0–4 года) г. Хабаровска / Хабаровского края нами обнаружено, что заболеваемость доброкачественными опухолями имеют более сильные корреляции по сравнению с злокачественными и эмбриональными опухолями. Известно, что доброкачественные опухоли значительно превосходят злокачественные по числу, но лишь немногие из доброкачественных опухолей трансформируются в малигнанные [31]. В дальнейшем было бы полезно обобщить на всю территорию ДФО сравнение

ассоциаций между заболеваемостью раком и числом пожаров с ассоциациями между заболеваемостью доброкачественными опухолями и числом пожаров для изучения влияния пожаров на эволюцию опухолей.

## ВЫВОДЫ

Мы провели исследование для большого географического региона. Были сделаны следующие выводы: 1) колебания заболеваемости опухолями гемопозитических, лимфоидных тканей, сосудистыми опухолями, опухолями мягких тканей и ЦНС среди детей младшего возраста (0–4 года), детей/подростков в возрасте 0–14 лет и населения ДФО в целом отчасти связаны с лесными пожарами, для описания которых может быть использован нормированный и взвешенный по численности населения показатель ЧП в год; 2) наиболее чувствительной в отношении влияния ЧП на ЗР оказалась группа «население в целом»; 3) развитие различных видов новообразований имеет разные временные лаги и разную относительную силу статистических связей с лесными пожарами. Среди всех проанализированных в одной возрастной когорте и двух возрастных группах пяти видов рака развитие трех видов гемобластозов (лейкоз, неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина) наиболее тесно связано с лесными пожарами. Они также имеют наиболее широкий диапазон временных лагов — от 2 лет в пренатальном периоде для возрастной когорты «дети младшего возраста» до 0–3 лет

для лейкоза среди «населения в целом»; 4) статистически значимые временные связи «ЧП/ЗР» обнаружены в районах, включающих в себя климатически однородные АЕ ДФО. Наибольшее число таких связей наблюдается для географических регионов с наибольшей численностью населения.

Полученные нами статистически значимые результаты по связям заболеваемости лейкозом и неходжкинскими лимфомами с числом пожаров для всего населения ДФО в целом и по связи заболеваемости лимфомами Ходжкина с числом пожаров для детей/подростков в возрасте 0–14 лет с временными лагами 0–3 года могут быть применены на практике при диагностике этих экологических заболеваний, так как годы с большими пожарами на Дальнем Востоке России хорошо известны. Для дальнейших исследований необходим анализ: экологических, демографических, социоэкономических и логистических детерминант пространственного распределения рака в ДФО; влияния сезонности на статистические ассоциации между заболеваемостью раком и числом пожаров; влияния числа пожаров на отношение доброкачественных опухолей к злокачественным. Открытым остается вопрос о географической переносимости предложенных нами методов анализа взаимоотношений между заболеваемостью раком и числом пожаров на другие пожароопасные районы России (Сибирский или Уральский федеральные округа) или близлежащих стран (Казахстана, Китая).

## Литература

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal AD, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71: 209–49. PubMed PMID: 33538338.
- Amin RW, Stafford B, Guttman RP. A spatial study of bladder cancer mortality and incidence in the contiguous US: 2000–2014. *Science of The Total Environment*. 2019; 670: 806–13.
- Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*. 2017; 3 (4): 524–48. PubMed PMID: PMC6103527.
- ONCOLOGY.RU Злокачественные новообразования в России. Доступно по ссылке: [http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant\\_tumors/](http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors/) (доступ: 17.01.2023).
- Доброхлеб В. Г. Старение населения России: региональный аспект // *Вопросы территориального развития*. 2018; 4 (44). DOI: 10.15838/tdi.2018.4.44.4.
- Лупян Е.А., Барташев С.А., Балашов И.В., Егоров В.А., Ершов Д.В., Кобец Д.А. и др. Спутниковый мониторинг лесных пожаров в 21 веке на территории Российской Федерации (цифры и факты по данным детектирования активного горения). Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2017; 14 (6): 158–75. DOI: 10.21046/2070-7401-2017-14-6-158-175.
- Navarro KM, Kleinman MT, Mackay CE, Reinhardt TE, Balmese JR, Broyles GA, et al. Wildland firefighter smoke exposure and risk of lung cancer and cardiovascular disease mortality. *Environmental Research*. 2019; 173: 462–8. PubMed PMID: 30981117.
- РОСГИДРОМЕТ. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации. Доступно по ссылке: <https://www.meteorf.gov.ru/product/infomaterials/90/>.
- Гамбарян М. Г., Драпкина О. М. Распространенность потребления табака в России: динамика и тенденции. Анализ результатов глобальных и национальных опросов. *Профилактическая медицина*. 2018; 21 (5): 45–62. DOI: 10.17116/profmed20182105145.
- Reid CE, Brauer M, Johnston FH, Jerrett M, Balmes JR, Elliott CT. Critical review of health impacts of wildfire smoke exposure. *Environmental health perspectives*. 2016; 124 (9): 1334–43. PubMed PMID: 27082891.
- Turner MC, Krewski D, Diver WR, Pope III CA, Burnett RT, Jerrett M, et al. Ambient air pollution and cancer mortality in the cancer prevention study II. *Environmental health perspectives*. 2017; 125 (8): 087013. PubMed PMID: 28886601.
- Добрых В. А., Захарычева Т. А. Дым лесных пожаров и здоровье. Хабаровск: изд-во ГОУ ВПО ДВГМУ, 2009; 201 с.
- Korsiak J, Pinault L, Christidis T, Burnett RT, Abrahamowicz M, Weichenthal S. Long-term exposure to wildfires and cancer incidence in Canada: a population-based observational cohort study. *The Lancet Planetary Health*. 2022; 6 (5): e400–e9. PubMed PMID: 35550079.
- Чижов А. Я., Пинаев С. К. Системный анализ влияния солнечной радиации и дыма лесных пожаров на риск лейкоза у детей. *Радиация и риск*. 2018; 27 (4): 87–94. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-4-87-94.
- Пинаев С. К., Чижов А. Я., Пинаева О. Г. Связь дыма и солнечной активности с новообразованиями человека. *Казанский медицинский журнал*. 2022; 103 (4): 650–7. DOI: 10.17816/KMJ2022-650.
- Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. *International Classification of Childhood Cancer, third edition*. *Cancer*. 2005; 103 (7): 1457–67. DOI: 10.1002/cncr.20910. PubMed PMID: 15712273.
- Bleyer A, Barr R, Ries J, Whelan A, Ferrari, editors. *Cancer in Adolescents and Young Adults: Pediatric Oncology*: Springer International Publishing AG; 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-33679-4.

18. Botsivali M, Kyrtopoulos SA. Transplacental exposure to carcinogens and risks to children: evidence from biomarker studies and the utility of omic profiling. *Archives of Toxicology*. 2019; 93 (4): 833–57. PubMed PMID: 30859261.
19. Ponomarev EI. Estimation of Direct Fire Emissions from Forests Burning in Siberia. *Environmental Sciences Proceedings*. 2021; 4 (1): 12. PubMed PMID: DOI: 10.3390/ecas2020-08114. PubMed PMID: 35513193.
20. Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC, Ljung GM. Time series analysis. Forecasting and control. Wiley, 2016; p. 712. DOI: 10.1111/jtsa.12194.
21. Jesus CSLd, Delgado RC, Wanderley HS, Teodoro PE, Pereira MG, Lima M, et al. Fire risk associated with landscape changes, climatic events and remote sensing in the Atlantic Forest using ARIMA model. *Remote Sensing Applications: Society and Environment* 2022; 26: 100761.
22. Arul E, Sue ME, Fanny S, Jeremy M. Forecasting annual incidence and mortality rate for prostate cancer in Australia until 2022 using autoregressive integrated moving average (ARIMA) models. *BMJ Open*. 2019; 9: e031331.
23. Wikén I, Andersson TML, Radkiewicz C. Seasonal effects on cancer incidence and prognosis. *Acta Oncologica*. 2023; 62: 103–9.
24. Lin C, Labzovskii LD, Mak HWL, Fung JC, Lau AK, Kenea ST, et al. Observation of PM<sub>2.5</sub> using a combination of satellite remote sensing and low-cost sensor network in Siberian urban areas with limited reference monitoring. *Atmospheric Environment*. 2020; 227: 117410. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2020.117410.
25. Shaposhnikov D, Revich B, Bellander T, Bedada GB, Bottai M, Kharkova T, et al. Mortality related to air pollution with the Moscow heat wave and wildfire of 2010. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2014; 25 (3): 359–64. PubMed PMID: 24598414.
26. Hayes JD, Dinkova-Kostova TA, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020; 38 (2): 167–97. PubMed PMID: 32649885.
27. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T. Current Understanding of Lifestyle and Environmental Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: An Epidemiological Update. *Journal of Cancer Epidemiology*. 2012; 2012: 978930. PubMed PMID: 23008714.
28. Наумова А. С., Тиганова О. А., Кондратчик К. Л.. Роль вируса Эпштейна-Барр в патогенезе лимфомы Ходжкина у детей. *Педиатрия*. 2019; 98 (1): 178–85.
29. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2018; 18 (8): 471–4. PubMed PMID: 29784935.
30. Cárceles-Álvarez A, Ortega-García JA, López-Hernández FA, Orozco-Llamas M, Espinosa-López B, Tobarra-Sánchez E, et al. Spatial clustering of childhood leukaemia with the integration of the Paediatric Environmental History. *Environmental Research*. 2017; 156: 605–12. PubMed PMID: 28454012.
31. Marino-Enriquez A, Fletcher CDM. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nature Reviews Cancer*. 2014; 14: 701–2.

## References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal AD, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71: 209–49. PubMed PMID: 33538338.
2. Amin RW, Stafford B, Guttman RP. A spatial study of bladder cancer mortality and incidence in the contiguous US: 2000–2014. *Science of The Total Environment* 2019; 670: 806–13.
3. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*. 2017; 3 (4): 524–48. PubMed PMID: PMC6103527.
4. ONCOLOGY.RU Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii. Dostupno po ssylke: [http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant\\_tumors/](http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors/) (dostup: 17.01.2023). Russian.
5. Dobroxele VG. Starenie naseleniya Rossii: regional'nyj aspekt // Voprosy territorial'nogo razvitiya. 2018; 4 (44). DOI: 10.15838/tdi.2018.4.44.4. Russian.
6. Lupyan EA, Bartalev SA, Balashov IV, Egorov VA, Ershov DV, Kobec DA, et al. Sputnikovyy monitoring lesnyh pozharov v 21 veke na territorii Rossijskoj Federacii (cifry i fakty po dannym detektirovaniya aktivnogo gorenija). *Sovremennye problemy distancionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa*. 2017; 14 (6): 158–75. DOI: 10.21046/2070-7401-2017-14-6-158-175. Russian.
7. Navarroa KM, Kleinman MT, Mackay CE, Reinhardt TE, Balmese JR, Broyles GA, et al. Wildland firefighter smoke exposure and risk of lung cancer and cardiovascular disease mortality. *Environmental Research*. 2019; 173: 462–8. PubMed PMID: 30981117.
8. ROSGIDROMET. Obzor sostoyaniya i zagryazneniya okruzhayushhej sredy v Rossijskoj Federacii. Dostupno po ssylke: <https://www.meteor.gov.ru/product/infomaterials/90/>. Russian.
9. Gambaryan MG, Drapkina OM. Rasprostranennost' potrebleniya tabaka v Rossii: dinamika i tendencii. *Analiz rezul'tatov global'nyh i nacional'nyh oprosov. Profilakticheskaya medicina*. 2018; 21 (5): 45–62. DOI: 10.17116/profmed20182105145. Russian.
10. Reid CE, Brauer M, Johnston FH, Jerrett M, Balmes JR, Elliott CT. Critical review of health impacts of wildfire smoke exposure. *Environmental health perspectives*. 2016; 124 (9): 1334–43. PubMed PMID: 27082891.
11. Turner MC, Krewski D, Diver WR, Pope III CA, Burnett RT, Jerrett M, et al. Ambient air pollution and cancer mortality in the cancer prevention study II. *Environmental health perspectives*. 2017; 125 (8): 087013. PubMed PMID: 28886601.
12. Dobrykh VA, Zakharycheva TA. Forest fire smoke and health. *Khabarovsk: Publishing House of the Far Eastern State Medical University*, 2009. 201 p. ISBN 5-85797-172-1. <http://www.fesmu.ru/elib/PdfViewer/default.aspx?id=33&res=1366%2c657>.
13. Korsiak J, Pinault L, Christidis T, Burnett RT, Abrahamowicz M, Weichenthal S. Long-term exposure to wildfires and cancer incidence in Canada: a population-based observational cohort study. *The Lancet Planetary Health*. 2022; 6 (5): e400–e9. PubMed PMID: 35550079.
14. Chizhov AY, Pinaev SK. Sistemnyj analiz vliyaniya solnechnoj radiacii i dyma lesnyh pozharov na risk lejkoza u detej. *Radiaciya i risk*. 2018; 27 (4): 87–94. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-4-87-94. Russian.
15. Pinaev SK, Chizhov AY, Pinaeva OG. Svyaz' dyma i solnechnoj aktivnosti s novoobrazovaniyami cheloveka. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2022; 103 (4): 650–7. DOI: 10.17816/KMJ2022-650. Russian.
16. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer*. 2005; 103 (7): 1457–67. DOI: 10.1002/cncr.20910. PubMed PMID: 15712273.
17. Bleyer A, Barr R, Ries J, Whelan A, Ferrari, editors. *Cancer in Adolescents and Young Adults: Pediatric Oncology*: Springer International Publishing AG; 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-33679-4.
18. Botsivali M, Kyrtopoulos SA. Transplacental exposure to carcinogens and risks to children: evidence from biomarker studies and the utility of omic profiling. *Archives of Toxicology*. 2019; 93 (4): 833–57. PubMed PMID: 30859261.
19. Ponomarev EI. Estimation of Direct Fire Emissions from Forests Burning in Siberia. *Environmental Sciences Proceedings*. 2021; 4 (1): 12. PubMed PMID: DOI: 10.3390/ecas2020-08114. PubMed PMID: 35513193.
20. Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC, Ljung GM. Time series analysis. Forecasting and control. Wiley, 2016; p. 712. DOI: 10.1111/jtsa.12194.



- 10.1111/jtsa.12194.
21. Jesus CSLd, Delgado RC, Wanderley HS, Teodoro PE, Pereira MG, Lima M, et al. Fire risk associated with landscape changes, climatic events and remote sensing in the Atlantic Forest using ARIMA model. *Remote Sensing Applications: Society and Environment* 2022; 26: 100761.
  22. Arul E, Sue ME, Fanny S, Jeremy M. Forecasting annual incidence and mortality rate for prostate cancer in Australia until 2022 using autoregressive integrated moving average (ARIMA) models. *BMJ Open*. 2019; 9: e031331.
  23. Wikén I, Andersson TML, Radkiewicz C. Seasonal effects on cancer incidence and prognosis. *Acta Oncologica*. 2023; 62: 103–9.
  24. Lin C, Labzovskii LD, Mak HWL, Fung JC, Lau AK, Kenea ST, et al. Observation of PM<sub>2.5</sub> using a combination of satellite remote sensing and low-cost sensor network in Siberian urban areas with limited reference monitoring. *Atmospheric Environment*. 2020; 227: 117410. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2020.117410.
  25. Shaposhnikov D, Revich B, Bellander T, Bedada GB, Bottai M, Kharkova T, et al. Mortality related to air pollution with the Moscow heat wave and wildfire of 2010. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2014; 25 (3): 359–64. PubMed PMID: 24598414.
  26. Hayes JD, Dinkova-Kostova TA, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020; 38 (2): 167–97. PubMed PMID: 32649885.
  27. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T. Current Understanding of Lifestyle and Environmental Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: An Epidemiological Update. *Journal of Cancer Epidemiology*. 2012; 2012: 978930. PubMed PMID: 23008714.
  28. Naumova AS, Tiganova OA, Kondratchik KL. Rol' virusa Ehpshtejna-Barr v patogeneze limfomy Xodzhkina u detej. *Pediatrics*. 2019; 98 (1): 178–85. Russian.
  29. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2018; 18 (8): 471–4. PubMed PMID: 29784935.
  30. Cárceles-Álvarez A, Ortega-García JA, López-Hernández FA, Orozco-Llamas M, Espinosa-López B, Tobarra-Sánchez E, et al. Spatial clustering of childhood leukaemia with the integration of the Paediatric Environmental History. *Environmental Research*. 2017; 156: 605–12. PubMed PMID: 28454012.
  31. Marino-Enriquez A, Fletcher CDM. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nature Reviews Cancer*. 2014; 14: 701–2.

## НЕИНВАЗИВНОЕ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА АНЕУПЛОИДИИ

О. И. Лисицына<sup>✉</sup>, А. Н. Екимов, Е. Е. Атапина, А. Г. Сыркашева, Е. Г. Горяйнова, Н. П. Макарова, Д. Ю. Трофимов, Н. В. Долгушина

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

В настоящее время в мире идет активная работа по оптимизации применения подходов к определению хромосомной патологии эмбрионов. Целью исследования было оценить возможность использования неинвазивного преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ниПГТ-А) путем анализа внеклеточной ДНК в отработанной культуральной среде (ОКС). Проведено ниПГТ-А анеуплоидных эмбрионов путем анализа внеклеточной ДНК в ОКС. Все blastocysts были анеуплоидными по результатам предшествующего преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) с биопсией трофобласта (ТФЭ). В исследование было включено 11 эмбрионов от семи супружеских пар. Все эмбрионы размораживали и культивировали в каплях по 10 мкл в течение 9 ч. Весь объем ОКС собирали и анализировали путем ниПГТ-А. Полученные результаты сравнивали на соответствие с предшествующими данными по ПГТ-А. Суммарно выполнили анализ 12 образцов ОКС: 11 образцов, в которых были культивированы эмбрионы, и один контрольный образец. В одном случае (9,1%) из 11 были получены хаотичные результаты по данным ниПГТ-А, не позволяющие провести диагностику состояния кариотипа. Полное соответствие результатов ПГТ-А и ниПГТ-А получено в семи случаях из 10 (70%), клиническое соответствие результатов — в девяти случаях из 10 (90%). В одном случае (10%) по данным ниПГТ-А кариотип blastocysts был диагностирован как эуплоидный. Вывод: ниПГТ-А может быть перспективным, не требующим биопсии, методом диагностики хромосомного статуса преимплантационных эмбрионов.

**Ключевые слова:** неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование, неинвазивное ПГТ-А, ниПГТ-А, ПГТ-А, отработанная культуральная среда, ОКС, биопсия трофобласта, анеуплоидия, внеклеточная ДНК

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №23-25-00346.

**Вклад авторов:** Н. П. Макарова, О. И. Лисицына, Н. В. Долгушина — концепция и дизайн исследования; О. И. Лисицына, Н. П. Макарова, Н. В. Долгушина, А. Г. Сыркашева, А. Н. Екимов — написание и редактирование текста; О. И. Лисицына — статистическая обработка результатов; Е. Г. Горяйнова, Н. П. Макарова — сбор биологического материала; А. Н. Екимов, Е. Е. Атапина — лабораторный этап; Н. В. Долгушина, Д. Ю. Трофимов — утверждение публикации.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» (протокол № 10 от 28 октября 2021 г.). Пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Игоревна Лисицына  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; o\_yazykova@inbox.ru

**Статья получена:** 18.06.2023 **Статья принята к печати:** 09.08.2023 **Опубликована онлайн:** 30.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.034

## NONINVASIVE PREIMPLANTATION GENETIC TESTING FOR ANEUPLOIDY

Lisitsyna OI<sup>✉</sup>, Ekimov AN, Atapina EE, Syrkasheva AG, Goryainova EG, Makarova NP, Trofimov DYu, Dolgushina NV

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

To date the world community is actively working to optimize the approaches to determining chromosomal abnormalities in embryos. The study was aimed to assess the possibility of using noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy (niPGT-A) through analysis of cell-free DNA in spent culture medium (SCM). We conducted niPGT-A of aneuploid embryos by analysis of cell-free DNA in SCM. All blastocysts were considered to be aneuploid based on the results of previous preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) with trophoctoderm (TE) biopsy. The study involved 11 embryos from seven couples. All the embryos were warmed and individually cultured in the 10 µL drops for 9 h. All SCM was collected and analyzed by niPGT-A. The results obtained were tested for concordance with previous PGT-A data. A total of 12 SCM samples were assessed: 11 samples, in which the embryos were cultured, and one control sample. Chaotic niPGT-A results not allowing the karyotype diagnosis were obtained in one case (9.1%) out of 11. Full concordance of the PGT-A and niPGT-A results was revealed in seven cases out of 10 (70%), while clinical concordance was found in nine cases out of 10 (90%). In one case (10%), the blastocyst was considered to have euploid karyotype based on the niPGT-A data. It has been concluded that niPGT-A can be a promising method of preimplantation embryonal chromosomal status diagnosis that requires no biopsy.

**Keywords:** noninvasive preimplantation genetic testing, noninvasive PGT-A, niPGT-A, PGT-A, spent culture medium, SCM, trophoctoderm biopsy, aneuploidy, cell-free DNA

**Funding:** the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research under research project №23-25-00346.

**Author contribution:** Makarova NP, Lisitsyna OI, Dolgushina NV — study concept and design; Lisitsyna OI, Makarova NP, Dolgushina NV, Syrkasheva AG, Ekimov AN — manuscript writing and editing; Lisitsyna OI — statistical processing of the results; Goryainova EG, Makarova NP — biomaterial collection; Ekimov AN, Atapina EE — laboratory phase; Dolgushina NV, Trofimov DYu — publication approval.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 10 of 28 October 2021). The patients submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga I. Lisitsyna  
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; o\_yazykova@inbox.ru

**Received:** 18.06.2023 **Accepted:** 09.08.2023 **Published online:** 30.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.034

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) появилось в клинической практике с конца 1980-х гг. (ранее его называли преимплантационной генетической диагностикой (ПГД) и преимплантационным генетическим скринингом). Целью первых программ ПГД было исключение передачи по наследству заболеваний, сцепленных с X-хромосомой. С последующим развитием технологий эмбриологического и лабораторного этапов спектр определения возможных генетических заболеваний значительно расширился, а задачами метода стали не только профилактика наследственных заболеваний, но и повышение шансов рождения здорового ребенка у сложных категорий пациентов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [1].

С развитием возможностей эмбриологических и генетических лабораторий, наибольшую эффективность и распространение в настоящее время приобрело преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (*next generation sequencing*, NGS) с биопсией трофэктодермы (ТФЭ). Многочисленные исследования показывают высокие значения чувствительности и специфичности данного подхода, однако одним из его недостатков остается необходимость инвазивного вмешательства [1, 2].

Другая проблема, привлекающая внимание исследователей, — мозаицизм эмбрионов, а также соответствие хромосомного состава ТФЭ эмбриона его внутренней клеточной массе (ВКМ) [3, 4]. И хотя биопсия нескольких клеток позволяет частично преодолеть указанную проблему, полностью избежать риска отвергнуть эмбрион, перенос которого в полость матки способен привести к рождению здорового ребенка, не представляется возможным.

Новой перспективной технологией ПГТ-А является неинвазивный анализ внеклеточной ДНК отработанной культуральной среды (ОКС), в которой развивался эмбрион. Получение адекватных результатов требует определенных условий культивирования эмбриона и сбора образцов среды (для увеличения концентрации ДНК и снижения возможной контаминации), но не требует инвазивного вмешательства [5–7]. Ряд ученых полагают, что неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ниПГТ-А) — это более информативный метод ПГТ-А, особенно в связи с тем, что, по данным литературы, внеклеточная ДНК ОКС происходит не только из клеток ТФЭ, но и ВКМ [8, 9]. Другие авторы, напротив, утверждают о его нерепрезентативности, так как до сих пор остается не до конца решенным вопрос об истинном происхождении внеклеточной ДНК в ОКС [10, 11]. Тем не менее, данный подход интенсивно изучается исследователями, и, вероятно, может быть использован в клинической практике.

Целью работы было оценить эффективность ниПГТ-А. Для этого был проведен повторный анализ бластоцист, анеуплоидных по результатам ПГТ-А с биопсией ТФЭ, методом ниПГТ-А.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эмбриологический этап проводили на базе отделения ВРТ в лечении бесплодия имени Б. В. Леонова, ПГТ-А и ниПГТ-А выполняли в Институте репродуктивной генетики.

В исследовании было включено 11 эмбрионов от семи супружеских пар. Все бластоцисты были анеуплоидными

по результатам предшествующего ПГТ-А с биопсией ТФЭ. Эмбрионы были получены после проведения циклов ВРТ с ПГТ-А методом NGS в период с апреля по сентябрь 2020 г.

## Культивирование эмбрионов, биопсия ТФЭ и ПГТ-А

Оплодотворение ооцитов проводили методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКЦИ), после чего оплодотворенные клетки переносили в культуральную среду Continuous Single Culture Complete (CSCM) (IrvineScientific; США). Все этапы культивирования, а также морфологическую оценку бластоцист выполняли по ранее описанной методике [12]. На 5–6 сутки после оплодотворения была выполнена биопсия клеток ТФЭ у эмбрионов, соответствующих отличному и хорошему качеству согласно морфологическим критериям. Для биопсии использовали боросиликатные иглы. После биопсии эмбрионы криоконсервировали путем витрификации согласно инструкции производителя культуральных сред. Полученные клетки передавали в лабораторию в пробирках типа Эппендорф, содержащих лизирующий буфер, и хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего анализа. ПГТ-А выполняли методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) на платформе Illumina (Illumina; США) согласно протоколу производителя. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения SeqVario («ДНК-Технология»; Россия).

## Размораживание эмбрионов, культивирование и сбор отработанной культуральной среды

Размораживание донированных эмбрионов проводили на средах Kitazato (Kitazato; Япония) согласно протоколу производителя. Далее бластоцисты культивировали в индивидуальных каплях среды CSCM по 10 мкл в течение 9 ч. Отрицательным контролем служила капля культуральной среды (1 образец), находящаяся в тех же условиях культивирования, но не содержащая эмбрион. Весь объем отработанной культуральной среды собирали в пробирки типа Эппендорф и передавали в лабораторию, где их хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 14 дней до дальнейшего анализа.

## Неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

НиПГТ-А проводили с помощью наборов NICSInst (Yicon Genomics; Китай) согласно инструкции производителя. Высокопроизводительное секвенирование осуществляли на приборе NextSeq (Illumina; США). Анализ полученных результатов проводили с помощью оригинальных алгоритмов и программного обеспечения, разработанных в Центре для осуществления проведения ПГТ-А методом NGS SeqVario.

## Анализ полученных данных

Статистический анализ проводили в программе Jamovi (бесплатный свободно распространяемый пакет статистической обработки). Полученные результаты сравнивали на соответствие с предшествующими данными по ПГТ-А. Первичной конечной точкой данного исследования считали частоту полного соответствия кариотипа эмбрионов по данным ПГТ-А и ниПГТ-А. Вторичной

конечной точкой оценивали частоту клинического соответствия эмбрионов (эуплоидный/анеуплоидный) по данным ПГТ-А и ниПГТ-А. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа  $N$  и процентные доли от общего числа в группе  $P$  в формате  $N (P\%)$ . С целью определения статистической значимости полного и клинического соответствия результатов использовали биномиальный тест. Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Суммарно выполнили анализ 12 образцов ОКС: 11 образцов, в которых были культивированы эмбрионы, и один контрольный образец. Все образцы группы исследования успешно прошли полногеномную амплификацию и анализ методом NGS. В контрольном образце ДНК не была детектирована. Результаты ПГТ-А и ниПГТ-А, а также их соответствие для исследуемых эмбрионов представлены в табл. 1.

Обращает на себя внимание, что в одном случае (9,1%) из 11 были получены хаотичные результаты по данным ниПГТ-А, не позволяющие провести диагностику состояния кариотипа (рис. 1).

В одном случае из 10 (10%) вследствие высокого уровня шума сигнала по данным ниПГТ-А анеуплоидию в эмбрионе выявить не удалось, вследствие чего полученный результат рассматривали как эуплоидный (рис. 2).

Полное соответствие результатов получено в семи из 10 случаев (70%) (рис. 3). Соответствие результатов по половым хромосомам получено в девяти из 10 случаев (90%). Клиническое соответствие результатов — в девяти из 10 случаев (90%).

Сравнение полного и клинического соответствия результатов ПГТ-А и ниПГТ-А представлено в табл. 2. Статистически значимой разницы по данным биномиального теста не было найдено для частоты полного соответствия результатов ПГТ-А и ниПГТ-А ( $p = 0,344$ ), но был найден статистически значимый результат для клинического соответствия ПГТ-А и ниПГТ-А ( $p = 0,021$ ).

Таблица 1. Результаты ПГТ-А и ниПГТ-А исследуемых эмбрионов

№	Результат ПГТ-А	Результат ниПГТ-А	Полное соответствие (+/-)	Клиническое соответствие (+/-)	Соответствие пола
1	(11)х3 Пол – XX	(11)х3 Пол – XX	+	+	+
2	(20)х3, (21)х1 Пол – XX	(20)х3, (21)х1 Пол – XX	+	+	+
3	(17)х1, (22)х1 Пол – XY	(17)х1, (22)х1 Пол – XY	+	+	+
4	(8)х3, (21)х1	«гетероплоидный»			
5	(22)х3 Пол – XY	(22)х3 Пол – XY	+	+	+
6	(8)х1, (18)х3, (22)х1 Пол – XX	(8)х1, (18)х3, (22)х1 Пол – XX	+	+	+
7	(15)х3, (17)х3 Пол – XY	(15)х3, (17)х3 Пол – XY	+	+	+
8	(21)х3 Пол – XY	(15)х1, (21)х3 Пол – XY	-	+	+
9	(22)х3 Пол – XY	Del 5(p) Пол – XX	-	+	-
10	(21)х2,5 Пол – XY	N, XY	-	-	+
11	(16)х3 Пол – XY	(16)х3 Пол – XY	+	+	+

При оценке результатов по намерению исследовать, т. е. при оценке всех 11 эмбрионов, включенных в исследование, с практической точки зрения, данные результаты означают, что в 81,8% случаев клиническое решение о возможности переноса эмбриона в полость матки не было бы изменено. В 9,1% случаев клиническое решение о возможности переноса эмбриона по данным только ниПГТ-А было бы другим (эуплоидный эмбрион был рекомендован для переноса). В 9,1% случаев клиническое заключение о возможности переноса эмбриона было вынести невозможно.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование было запланировано как пилотный проект и было ограничено небольшой выборкой, наличием только анеуплоидных эмбрионов по данным ПГТ-А, отсутствием анализа хромосомного состава ВКМ исследуемых бластоцист. Тем не менее, результаты работы продемонстрировали 100%-ю частоту детекции внеклеточной ДНК (внДНК) в ОКС, а также высокую долю получения результатов, пригодных для клинической интерпретации (90,9%).

В большинстве исследований, проведенных к настоящему времени, тоже принимали за референс показатели ПГТ-А с биопсией ТФЭ и сравнивали их с результатами ниПГТ-А. Частота соответствия результатов в подобных работах составляла 33,3–89,1% [5, 8, 13–17]. Однако следует отметить, что в упомянутых публикациях чаще описывали протокол ниПГТ-А в нативном цикле. В нашем исследовании был использован протокол работы с размороженными эмбрионами, и частота соответствия результатов согласовалась с данными приведенных исследований (полное соответствие — в 70% случаев, клиническое соответствие — в 90% случаев).

В других работах за референс принимали целый эмбрион, а ОКС собирали после культивирования размороженных эмбрионов. Частота полного соответствия результатов ниПГТ-А и ПГТ-А для всего эмбриона в подобных исследованиях варьировала от 32,2 до 89,9%. Xu et al. оценивали ОКС размороженных



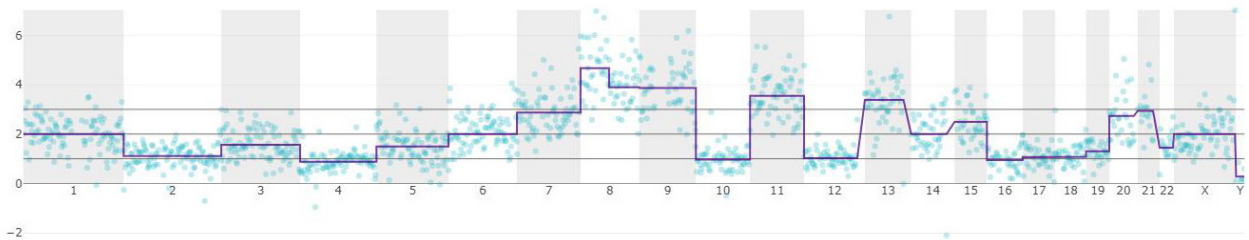


Рис. 1. Пример результата «гетероплоидный» по данным ниПГТ-А

эмбрионов 3 суток развития после их культивирования до 5 суток. Из 42 эмбрионов анализ 66,7% показал полное соответствие результатов [18]. Yin et al. анализировали ОКС 75 размороженных бластоцист 5–6 суток развития после их культивирования в течение 24 ч. Клиническая частота соответствия результатов составила 89,8%, полная частота соответствия — 32,2% [19]. Huang et al. удалось получить информацию по ОКС 48 эмбрионов из 52 на стадии 5–6 суток развития после их размораживания и культивирования тоже в течение 24 ч. Частота полного соответствия результатов составила 85,4% [9]. Shitara et al. показали полную частоту соответствия результатов в 56,3% случаев при анализе ОКС после размораживания и культивирования эмбрионов 5 суток развития в течение 24 ч, 6 суток — в течение 3 ч [20]. Xu et al. анализировали 35 размороженных эмбрионов 3-х или 5-х суток развития. Минимальное время культивирования составило 24 ч. Успешную полногеномную амплификацию прошли 88,6% образцов ОКС. Полная частота соответствия результатов ниПГТ-А и ПГТ-А по ВКМ составила 58,3% (14/24) [21].

Следует отметить, что объем капли культуральной среды в указанных исследованиях с культивированием размороженных эмбрионов варьировал от 10 до 30 мкл, а объем анализируемых образцов — от 3,5 мкл до 25 мкл.

Время культивирования в большинстве случаев составляло не менее 24 ч. В нашем исследовании показана успешная детекция и анализ вДНК в ОКС при культивировании размороженных бластоцист в течение 9 ч в капле объемом 10 мкл, что продемонстрировало возможность получения адекватных результатов после культивирования размороженных эмбрионов в более короткий период времени.

Особый интерес представляет изучение дополнительных возможностей применения ниПГТ-А в клинической практике. Заслуживает внимания работа, авторы которой проводили ниПГТ-А для мозаичных эмбрионов по результатам предшествующего ПГТ-А с биопсией ТФЭ. Они разморозили и рекультивировали в течение 14–18 ч 41 мозаичный эмбрион, а далее повторно провели ПГТ-А с биопсией ТФЭ и всего эмбриона, а также ниПГТ-А по ОКС. Результаты анализа ВКМ показали нормальный хромосомный набор для 84,4% (35/41) эмбрионов. Данные ниПГТ-А соответствовали результатам ПГТ-А по биопсии всего эмбриона в 74,4% случаев [22]. В рамках опубликованной работы авторы доложили ретроспективные данные о переносе мозаичных эмбрионов для 60 пар, не имевших зуплоидные эмбрионы. У 30 пациенток впоследствии

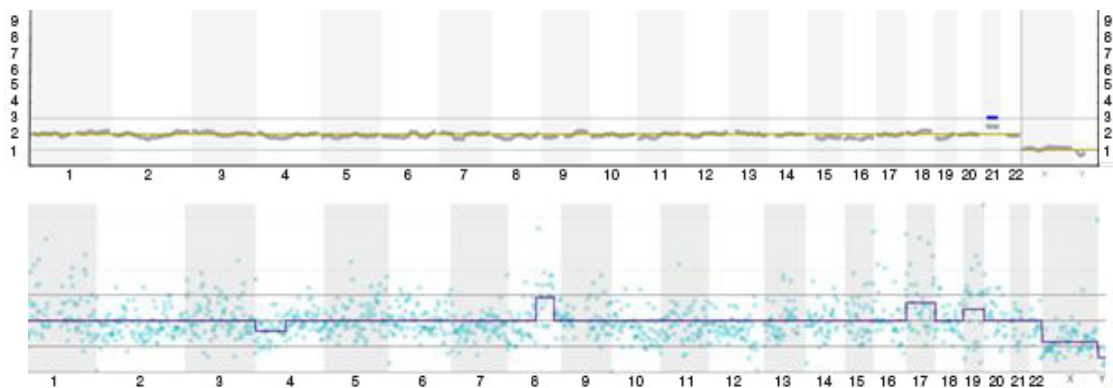


Рис. 2. Результаты ПГТ-А и ниПГТ-А эмбриона с разнотением ПГТ-А и ниПГТ-А: верхний график — результат «анеуплоидный» по данным ПГТ-А, нижний график — «эуплоидный» по данным ниПГТ-А

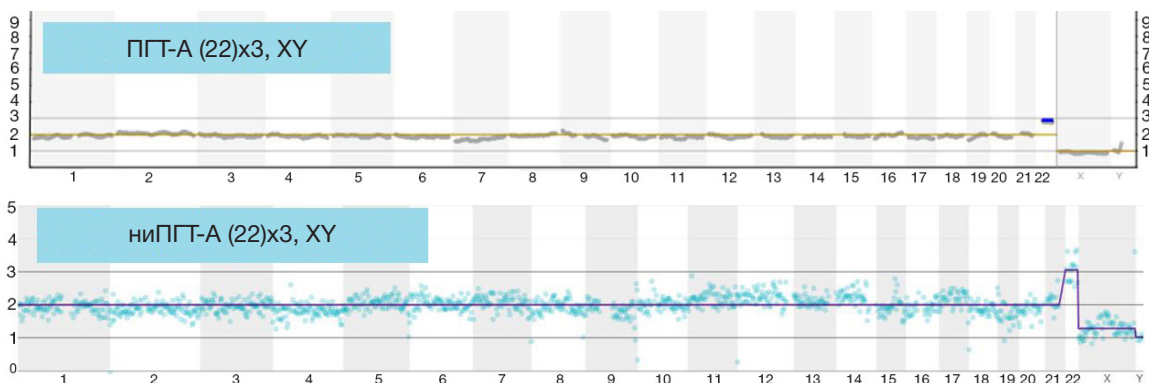


Рис. 3. Пример полного соответствия результатов по данным ПГТ-А и ниПГТ-А

Таблица 2. Сравнение частоты полного и клинического соответствия результатов ПГТ-А и ниПГТ-А по данным биномиального теста

Соответствие	Да / Нет	Доля	Всего	Пропорция	$p$
Полное	Да	7	10	0,7	$p = 0,344$
	Нет	3		0,3	
Клиническое	Да	9	10	0,9	$p = 0,021$
	Нет	1		0,1	

была диагностирована клиническая беременность. Таким образом, исследователи сделали предположение о возможном преимуществе дополнительного применения ниПГТ-А в подобных клинических случаях.

В нашем исследовании также в одном случае был получен эуплоидный результат ниПГТ-А для анеуплоидного эмбриона (кариотип (21)–1,5) по данным предшествующего ПГТ-А с биопсией ТФЭ. Причем отсутствие нарушений именно по 21 паре хромосом было четко фиксировано (рис. 2). Учитывая вышесказанное, целесообразно собирать ОКС в циклах с ПГТ-А с целью изучения возможности дополнительного проведения ниПГТ-А в сложных или сомнительных случаях для более корректной установки диагноза в случае необходимости.

Также интересна работа 2022 г., в которой оценивали возможность клинического применения ниПГТ-А в циклах ВРТ с переносом размороженного эмбриона (РЭ) [23]. Во всех случаях эмбрионы размораживали и культивировали в течение 6 ч в капле объемом 20 мкл перед переносом в полость матки. Авторы ретроспективно проанализировали исходы переносов РЭ для 210 пациенток, в зависимости от результатов ниПГТ-А. Частота клинической беременности, продолжающейся беременности и живорождения была значительно выше для эмбрионов, эуплоидных по ниПГТ-А, в сравнении с анеуплоидными (56,2% против 29,4%). Однако не были обнаружены значимые различия для указанных репродуктивных исходов для «эуплоидных» и «хаотичных» эмбрионов по данным ниПГТ-А (56,2% против 60,4%). Доля анеуплоидных эмбрионов была значительно выше среди эмбрионов низкого и среднего качества по морфологии, в сравнении с эмбрионами хорошего качества (46%, 34,6% и 21,5% соответственно;  $p = 0,013$ ). Исследователи отметили возможное преимущество применения комбинированного подхода (морфологическая оценка в сочетании с ниПГТ-А) к выбору наиболее перспективного эмбриона для переноса в полость матки. Причем авторы предложили ранжировать эмбрионы в порядке снижения приоритета

для ПЭ следующим образом: 1) эуплоидные эмбрионы хорошего качества; 2) «хаотичные» эмбрионы хорошего качества; 3) эуплоидные эмбрионы среднего качества по морфологии; 4) «хаотичные эмбрионы» среднего качества по морфологии.

Следует подчеркнуть, что и другие исследователи советуют с осторожностью трактовать хаотичные результаты ниПГТ-А, с большей вероятностью отражающие условия хранения биологического материала и процессы деградации ДНК, чем хромосомный состав эмбрионов [8, 24]. Мы в своей работе тоже в одном случае (9,1%) получили хаотичные результаты ниПГТ-А (рис. 1).

Таким образом, следует отметить, что работа с вндНК и ниПГТ-А имеет ряд особенностей, которые следует учитывать при интерпретации результатов и выборе наиболее перспективных эмбрионов для переноса в полость матки. Однако как главную его черту необходимо выделить неинвазивность метода. Учитывая, что в ряде научных работ появляются данные, свидетельствующие о возможном негативном влиянии биопсии ТФЭ на течение беременности (гипертензивные расстройства, преждевременные роды, нарушения плацентации) и здоровье новорожденного, изучение именно ниПГТ-А представляется особенно актуальным [25–27]. Тем не менее, следует отметить, что в значительном количестве других работ данной взаимосвязи не обнаружено [28–30].

## Выводы

Неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии — перспективный, не требующий биопсии, метод диагностики хромосомного статуса эмбрионов. Необходимо проведение дополнительных исследований для дальнейшей разработки и усовершенствования методики, определения возможности и показаний ее использования в клинической практике.

## Литература

- Sciorio R, Tramontano L, Catt J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecol. Endocrinol.* 2020; 36 (1): 6–11.
- Малышева О. В., Пендина А. А., Ефимова О. А., Чиряева О. Г. Предимплантационное генетическое тестирование. В книге: Коган И. Ю., редактор. Экстракорпоральное оплодотворение: практическое руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021; с. 357–67.
- Жигалина Д. И., Скрыбин Н. А., Канбекова О. Р., Артюхова В. Г., Светлаков А. В., Лебедев И. Н. Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости бластоцисты человека. *Медицинская генетика.* 2018; 17 (2): 46–52.
- Макарова Н. П., Екимов А. Н., Кулакова Е. В., Драпкина Ю. С., Сысоева А. П., Краснова Н. А. и др. Особенности мозаицизма у эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2021; (7): 144–51.
- Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reprod. Biomed. Online.* 2022; 44 (5): 817–28.
- Brouillet S, Martinez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod. Biomed. Online.* 2020; 40 (6): 779–6.
- Лисицына О. И., Макарова Н. П., Долгушина Н. В. Оценка внеклеточной ДНК как метод неинвазивного преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2022; 6: 13–19.
- Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J*

- Obstet Gynecol. 2020; 223 (5): 751.e1–13.
9. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116 (28): 14105–12.
  10. Rubio C, Racowsky C, Barad DH, Scott RT, Simon C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent culture medium as a substitute for trophectoderm biopsy. *Fertil Steril*. 2021; 115 (4): 841–9.
  11. Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy and the mystery of genetic material: a review article. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (7): 3568.
  12. Макарова Н. П., Лисицына О. И., Непша О. С., Красный А. М., Садекова А. А., Незлина Е. А. и др. Особенности профиля экспрессии митохондриальной ДНК в среде культивирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2022; (3): 89–96.
  13. Chen L, Sun Q, Xu J, Fu H, Liu Y, Yao Y, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 708322.
  14. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018; 110 (3): 467–475.e2.
  15. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril*. 2019; 112 (3): 510–19.
  16. Vera-Rodríguez M, Díez-Juan A, Jiménez-Almazán J, Martínez S, Navarro R, Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018; 33 (4): 745–56.
  17. Yeung QSY, Zhang YX, Chung JPW, Lui WT, Kwok YKY, Gui B, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *J Assist Reprod Genet*. 2019; 36 (8): 1609–21.
  18. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113 (42): 11907–12.
  19. Yin B, Zhang H, Xie J, Wei Y, Zhang C, Meng L. Validation of preimplantation genetic tests for aneuploidy (PGT-A) with DNA from spent culture media (SCM): concordance assessment and implication. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19 (1): 41.
  20. Shitara A, Takahashi K, Goto M, Takahashi H, Iwasawa T, Onodera Y, et al. Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy. *PLoS One*. 2021; 16 (2): e0246438.
  21. Xu CL, Wei YQ, Tan QY, Huang Y, Wu JJ, Li CY, et al. Concordance of PGT for aneuploidies between blastocyst biopsies and spent blastocyst culture medium. *Reprod Biomed*. 2023; 46 (3): 483–90.
  22. Li X, Hao Y, Chen D, Ji D, Zhu W, Zhu X, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Hum Reprod*. 2021; 36 (7): 2020–34.
  23. Chen R, Tang N, Du H, Yao Y, Zou Y, Wang J, et al. Clinical application of noninvasive chromosomal screening for elective single-blastocyst transfer in frozen-thawed cycles. *J Transl Med*. 2022; 20 (1): 553.
  24. Rubio C, Simón C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy: Is the glass half-empty or half-full? *Fertil Steril*. 2021; 115 (6): 1426–7.
  25. Kakourou G, Mamas T, Vrettou C, Traeger-Synodinos J. An Update on Non-invasive Approaches for Genetic Testing of the Preimplantation Embryo. *Curr Genomics*. 2022; 23 (5): 337–52.
  26. Alteri A, Cermisoni GC, Pozzoni M, Gaeta G, Cavoretto PI, Viganò P. Obstetric, neonatal, and child health outcomes following embryo biopsy for preimplantation genetic testing. *Hum Reprod Updat*. 2023; 29 (3): 291–306.
  27. Makhijani R, Bartels CB, Godiwala P, Bartolucci A, DiLuigi A, Nulsen J, et al. Impact of trophectoderm biopsy on obstetric and perinatal outcomes following frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. 2021; 36 (2): 340–8.
  28. Awadalla MS, Park KE, Latack KR, McGinnis LK, Ahmady A, Paulson RJ. Influence of Trophectoderm Biopsy Prior to Frozen Blastocyst Transfer on Obstetrical Outcomes. *Reprod Sci*. 2021; 28 (12): 3459–65.
  29. He H, Jing S, Lu CF, Tan YQ, Luo KL, Zhang SP, et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. *Fertil Steril*. 2019; 112 (2): 82–88.
  30. Swanson K, Huang D, Kaing A, Blat C, Rosenstein MG, Mok-Lin E, et al. Is Preimplantation Genetic Testing Associated with Increased Risk of Abnormal Placentation After Frozen Embryo Transfer? *Am J Perinatol*. 2021; 38 (2): 105–10.

## References

1. Sciorio R, Tramontano L, Catt J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecol. Endocrinol*. 2020; 36 (1): 6–11.
2. Malysheva OV, Pendina AA, Efimova OA, Chiryaeva OG. Predymplantacionnoe geneticheskoe testirovanie. V knige: Kogan I. Yu., redaktor. *Ehkstrakorporal'noe oplodotvorenje: prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachej*. M.: GEHOTAR-Media, 2021; s. 357–67. Russian.
3. Zhigalina DI, Skryabin NA, Kanbekova OR, Artyukhova VG, Svetlakov AV, Lebedev IN. Comparative cytogenetics of embryoblast, trophectoderm and blastocoele fluid of human blastocyst. *Medical Genetics*. 2018; 17 (2): 46–52. Russian.
4. Makarova NP, Ekimov AN, Kulakova EV, Drapkina YuS, Sysoeva AP, Krasnova NA, et al. Characteristics of embryonic mosaicism in infertility treatment with assisted reproductive technologies. *Obstetrics and gynecology*. 2021; (7): 144–51. Russian.
5. Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reprod. Biomed. Online*. 2022; 44 (5): 817–28.
6. Brouillet S, Martínez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod. Biomed. Online*. 2020; 40 (6): 779–6.
7. Lisitsyna OI, Makarova NP, Dolgushina NV. Evaluation of extracellular DNA as a method for non-invasive preimplantation genetic testing of embryos in infertility treatment programs using assisted reproductive technologies. *Obstetrics and gynecology*. 2022; (6): 13–19. Russian.
8. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223 (5): 751.e1–13.
9. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116 (28): 14105–12.
10. Rubio C, Racowsky C, Barad DH, Scott RT, Simon C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent culture medium as a substitute for trophectoderm biopsy. *Fertil Steril*. 2021; 115 (4): 841–9.
11. Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy and the mystery of genetic material: a review article. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (7): 3568.
12. Makarova NP, Lisitsyna OI, Nepsha OS, Krasnyi AM, Sadekova AA, Nezlina AL, et al. Mitochondrial DNA expression profile in embryo culture medium in assisted reproductive technology. *Obstetrics and gynecology*. 2022; (3): 89–96. Russian.
13. Chen L, Sun Q, Xu J, Fu H, Liu Y, Yao Y, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 708322.

14. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018; 110 (3): 467–475.e2.
15. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril*. 2019; 112 (3): 510–19.
16. Vera-Rodríguez M, Díez-Juan A, Jiménez-Almazan J, Martínez S, Navarro R., Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018; 33 (4): 745–56.
17. Yeung QSY, Zhang YX, Chung JPW, Lui WT, Kwok YKY, Gui B, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *J Assist Reprod Genet*. 2019; 36 (8): 1609–21.
18. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113 (42): 11907–12.
19. Yin B, Zhang H, Xie J, Wei Y, Zhang C, Meng L. Validation of preimplantation genetic tests for aneuploidy (PGT-A) with DNA from spent culture media (SCM): concordance assessment and implication. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19 (1): 41.
20. Shitara A, Takahashi K, Goto M, Takahashi H, Iwasawa T, Onodera Y, et al. Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophoctoderm biopsy. *PLoS One*. 2021; 16 (2): e0246438.
21. Xu CL, Wei YQ, Tan QY, Huang Y, Wu JJ, Li CY, et al. Concordance of PGT for aneuploidies between blastocyst biopsies and spent blastocyst culture medium. *Reprod Biomed*. 2023; 46 (3): 483–90.
22. Li X, Hao Y, Chen D, Ji D, Zhu W, Zhu X, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Hum Reprod*. 2021; 36 (7): 2020–34.
23. Chen R, Tang N, Du H, Yao Y, Zou Y, Wang J, et al. Clinical application of noninvasive chromosomal screening for elective single-blastocyst transfer in frozen-thawed cycles. *J Transl Med*. 2022; 20 (1): 553.
24. Rubio C, Simón C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy: Is the glass half-empty or half-full? *Fertil. Steril*. 2021; 115 (6): 1426–7.
25. Kakourou G, Mamas T, Vrettou C, Traeger-Synodinos J. An Update on Non-invasive Approaches for Genetic Testing of the Preimplantation Embryo. *Curr Genomics*. 2022; 23 (5): 337–52.
26. Alteri A, Cermisoni GC, Pozzoni M, Gaeta G, Cavoretto PI, Viganò P. Obstetric, neonatal, and child health outcomes following embryo biopsy for preimplantation genetic testing. *Hum Reprod Updat*. 2023; 29 (3): 291–306.
27. Makhijani R, Bartels CB, Godiwala P, Bartolucci A, DiLuigi A, Nulsen J, et al. Impact of trophoctoderm biopsy on obstetric and perinatal outcomes following frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. 2021; 36 (2): 340–8.
28. Awadalla MS, Park KE, Latack KR, McGinnis LK, Ahmady A, Paulson RJ. Influence of Trophoctoderm Biopsy Prior to Frozen Blastocyst Transfer on Obstetrical Outcomes. *Reprod Sci*. 2021; 28 (12): 3459–65.
29. He H, Jing S, Lu CF, Tan YQ, Luo KL, Zhang SP, et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. *Fertil Steril*. 2019; 112 (2): 82–88.
30. Swanson K, Huang D, Kaing A, Blat C, Rosenstein MG, Mok-Lin E, et al. Is Preimplantation Genetic Testing Associated with Increased Risk of Abnormal Placentation After Frozen Embryo Transfer? *Am J Perinatol*. 2021; 38 (2): 105–10.



## КАТАБОЛИТЫ ТРИПТОФАНА И ГЕНЫ ФЕРМЕНТОВ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА

О. П. Шатова<sup>1,2</sup>✉, А. М. Гапонов<sup>3</sup>, Т. В. Григорьева<sup>4</sup>, И. Ю. Васильев<sup>4</sup>, Л. С. Столетова<sup>5</sup>, В. В. Макаров<sup>6</sup>, С. М. Юдин<sup>6</sup>, С. А. Румянцев<sup>1,3,7</sup>, А. В. Шестопалов<sup>1,5,7</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр цифровой и трансляционной биомедицины ООО «Центр молекулярного здоровья», Москва

<sup>4</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия

<sup>5</sup> Национальный медицинский исследовательский центр Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

<sup>6</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>7</sup> Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

Общеизвестна сигнальная роль триптофана и его катаболитов. Однако до сих пор не изучено их влияние на потенциальную метаболическую активность микробиоты. Целью исследования было провести анализ согласованности изменений прогностической представленности генов ферментов микробиома кишечника и катаболитов триптофана. В исследовании приняли участие 109 здоровых добровольцев и 114 больных с ожирением. Количественный анализ катаболитов обмена триптофана в кале проводили методом ВЭЖХ. Из образцов фекалий выделяли бактериальную ДНК и проводили секвенирование (V3-V4 региона) гена 16S рРНК. Первичную обработку данных секвенирования осуществляли в программе «QIIME v.1.9.1». Анализ предположительной метаболической роли участников микробиоты проводили путем реконструкции ненаблюдаемых состояний при помощи PICRUSt. Максимальное количество статистически значимых взаимосвязей между катаболитами триптофана и прогностической представленностью генов ферментов микробиома у лиц с ожирением было установлено для индол-3-лактата. Показана статистически значимая взаимосвязь индол-3-лактата и представленности генов ферментов обмена фруктозы, аминокислот, полиаминов и сульфосахаров. Установлено, что у больных ожирением происходит трехкратное увеличение индол-3-лактат-продуцирующей микробиоты. Показано, что микробиотическая популяция кишечника представлена совершенно другими родами и видами микроорганизмов у лиц, имеющих ожирение. Сделан вывод, что при ожирении индол-3-лактат значимо влияет на прогностическую представленность генов ферментов микробиома кишечника.

**Ключевые слова:** микробиом кишечника, катаболиты обмена триптофана, индол-3-лактат, индол, микробные катаболиты триптофана (МИКТ).

**Финансирование:** работа выполнена в рамках договора № 037310012219000041 по проекту «Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов систем quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринную и метаболическую функцию жировой ткани».

**Вклад авторов:** О. П. Шатова — сбор первичного материала, статистическая обработка, подготовка текста статьи и рисунков; А. М. Гапонов — подготовка текста статьи; Т. В. Григорьева — исследование микробиома; И. Ю. Васильев — исследование микробиома и статистическая обработка данных; Л. С. Столетова — анализ материала; В. В. Макаров, С. М. Юдин — написание разделов статьи; С. А. Румянцев — идея исследования, редактирование статьи; А. В. Шестопалов — идея исследования, анализ материала, написание и редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 186 от 26 июня 2019 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на использование биологического материала в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Петровна Шатова  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, Россия; 117997; shatova.op@gmail.com

**Статья получена:** 21.06.2023 **Статья принята к печати:** 20.07.2023 **Опубликована онлайн:** 07.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.027

## TRYPTOPHAN CATABOLITES AND PREDICTED GUT FLORA ENZYME-ENCODING GENE

Shatova OP<sup>1,2</sup>✉, Gaponov AM<sup>3</sup>, Grigoryeva TV<sup>4</sup>, Vasiliev IYu<sup>4</sup>, Stoletova LS<sup>5</sup>, Makarov VV<sup>6</sup>, Yudin SM<sup>6</sup>, Roumiantsev SA<sup>1,3,7</sup>, Shestopalov AV<sup>1,5,7</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Center for Digital and Translational Biomedicine, Center for Molecular Health, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>5</sup> Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>7</sup> National Medical Research Center of Endocrinology, Moscow, Russia

The signaling role of tryptophan and its catabolites is well known. However, their effects on the potential microbiota metabolic activity is still poorly understood. The study was aimed to assess concordance between changes in the predicted gut microbiome enzyme-encoding gene abundance and the tryptophan catabolites. The study involved 109 healthy volunteers and 114 obese patients. Quantification of tryptophan catabolites in the feces was performed by HPLC. Bacterial DNA was extracted from fecal samples, and the 16S rRNA gene V3-V4 region was sequenced. Primary processing of the sequencing data was performed using the QIIME v.1.9.1 tool. The alleged metabolic role of microbiota members was explored via reconstruction of unobservable states using PICRUSt. The maximum number of significant correlations between the unobservable states and the predicted gut microbiome enzyme-encoding gene abundance in obese individuals was reported for indole-3-lactate. A significant correlation between indole-3-lactate and the abundance of genes encoding the enzymes involved in metabolism of fructose, amino sugars, nucleotides, amino acids, polyamines, and sulfosaccharides was revealed. It has been found that obese patients show a threefold increase in the indole-3-lactate-producing microbiota. It has been shown that in obese individuals microbial population of the intestine is represented by the totally different genera and species of microorganisms. It is concluded that indole-3-lactate has a significant effect on the predicted gut microbiome enzyme-encoding gene abundance in obese patients.

**Keywords:** gut microbiome, tryptophan metabolites, indole-3-lactate, indole, microbial tryptophan catabolites (MICT)

**Funding:** the study was performed as part of the Assignment № 037310012219000041 for the project "Creation of a bank of blood serum and fecal samples from healthy donors and patients with obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, impaired mucosal barrier of the gastrointestinal tract with the aim of identifying candidate species-specific mediators of the quorum sensing human microbiota systems modulating the endocrine and metabolic function of adipose tissue".

**Author contribution:** Shatova OP — primary data acquisition, statistical processing, manuscript writing and preparation of figures; Gaponov AM — manuscript writing; Grigoryeva TV — microbiome assessment; Vasiliev IYu — microbiome assessment and statistical data processing; Stoletova LS — data analysis; Makarov VV, Yudin SM — writing parts of the manuscript; Roumiantsev SA — study concept, manuscript editing; Shestopalov AV — study concept, data analysis, manuscript writing and editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 186 of 26 June 2019). All patients submitted the informed consent to the use of biomaterial for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga P. Shatova  
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; shatova.op@gmail.com

**Received:** 21.06.2023 **Accepted:** 20.07.2023 **Published online:** 07.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.027

В последнее десятилетие исследования, направленные на понимание роли хлогенома, вышли на новый уровень благодаря достижениям в области высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS), которые помогли точно идентифицировать виды микроорганизмов и связанные с ними метаболические пути. Хлогеном описывает генетическую совокупность генов-хозяина и симбиотических/мутуалистических микробных генов [1]. Опубликовано множество работ по изучению таксономической представленности микробиоты кишечника при различных физиологических и патологических состояниях. Многие исследователи уделяют пристальное внимание изучению роли дисбиоза при развитии ожирения и сахарного диабета [2], неспецифического язвенного колита [3] и других заболеваний кишечника [4–6]. Не вызывает сомнения тот факт, что микробиота кишечника является одним из основных игроков в развитии метаболических заболеваний и так называемого «метаболического воспаления» [7]. Известно, что метаболиты, образуемые микробиотой, выполняют роль сигнальных молекул [8]. Установлено, что индол-3-этанол, индол-3-пируват и индол-3-альдегид через арилуглеводородные рецепторы (AhR) энтероцитов регулируют целостность апикального соединительного комплекса и обеспечивают нормальную проницаемость кишечника [9, 10]. Таким образом, микробные метаболиты триптофана (MICT) модулируют барьерную функцию кишечника и устойчивость к кишечным патогенам [11]. Однако до сих пор мало данных о регуляции триптофановыми производными ферментов микробиоты кишечника. В связи с чем одной из задач нашего исследования было установить взаимосвязь прогностической представленности генов ферментов у кишечного микробиома с содержанием триптофановых катаболитов.

Многие исследователи проводят анализ особенностей таксономического состава микробиоты кишечника в норме и при различных патологиях [12, 13], включая ожирение, или изучают содержание катаболитов триптофана в кале, которые с большой вероятностью образуются исключительно микробиотой [8]. Однако все это еще предстоит доказать, так как состав микробиоты для больных с ожирением еще до конца не изучен [12]. Некоторые авторы считают индол-3-ацетат исключительно микробиотическим метаболитом [13], но при этом у человека экспрессируется фермент, который потенциально может образовывать данный метаболит. Это фермент, который превращает индол-3-ацетальдегид в индол-3-ацетат, — альдегиддегидрогеназа (EC: 1.2.1.3) [14]. В связи с чем второй задачей нашего исследования было оценить согласованность изменений содержания триптофановых метаболитов и ферментов, которые потенциально могут принимать участие в их продукции. В настоящее время принято считать, что к MICT относятся: индол, триптамин, скатол, индол-3-пируват, индол-3-лактат, индол-3-акрилат, индол-3-пропионат, индол-3-ацетамид, индол-3-этанол, индол-3-альдегид и индол-3-ацетальдегид [8]. Необходимо отметить, что из всех MICT самая высокая концентрация в кишечнике установлена для индола, который является как молекулой quorum sensing (QS) микробиоты, так и сигнальной молекулой в организме человека [15]. К основным MICT общепринято также относить индол-3-ацетат и индол-3-лактат [16]. Триптофан, получаемый из пищи, может метаболизироваться в индол-3-ацетат микробиотой кишечника через индол-3-ацетамидный путь при катализе триптофанмонооксигеназой

(EC: 1.13.12.3) и индол-3-ацетамидгидролазой (EC: 3.5.1.4). Индол-3-лактат образуется из индол-3-пирувата в результате реакции восстановления, которую катализирует ароматическая 2-оксоислоторедуктаза (EC: 1.1.1.110), тогда как индол-3-пируват образуется благодаря трем ферментам: триптофантрансаминазе (EC: 2.6.1.27), L-триптофанпируватаминотрансферазе (EC: 2.6.1.99) и оксидазе-L-аминокислот (EC: 1.4.2.2). Дальнейшее превращение индол-3-лактата возможно в индол-3-акрилат ферментом 3-(арил)-акрилоил-КоА(арил)лактат-КоА-трансферазой (EC: 2.8.3.17) [17]. Следует отметить, что метаболит, который образуется из индол-3-лактата (индол-3-акрилат), активирует фермент индолпируватдекарбоксилазу (EC: 4.1.1.74), который принимает участие в превращении индол-3-пирувата по индол-3-ацетатному пути [17] (рис. 1).

В работах, посвященных изучению ожирения, показано, что происходит повышение концентрации индол-3-ацетата, индол-3-лактата и индола в крови больных [8, 18]. В то же время многие авторы описывают таксономическое обеднение микробиоты у больных с ожирением [19, 20]. Доказана роль индол-3-ацетата и индол-3-пропионата в подавлении воспаления, которое способствует ремоделированию жировой ткани и развитию инсулинорезистентности [21]. Не вызывает сомнений, что коррекция диеты значительно меняет таксономический состав микробиоты в кишечнике. Однако насколько стойкими будут эти изменения и как быстро произойдет возврат к характерному для ожирения фенотипу дисбиоза, ответить пока сложно, и очень часто эти показатели будут носить индивидуальный характер для каждого конкретного больного [22].

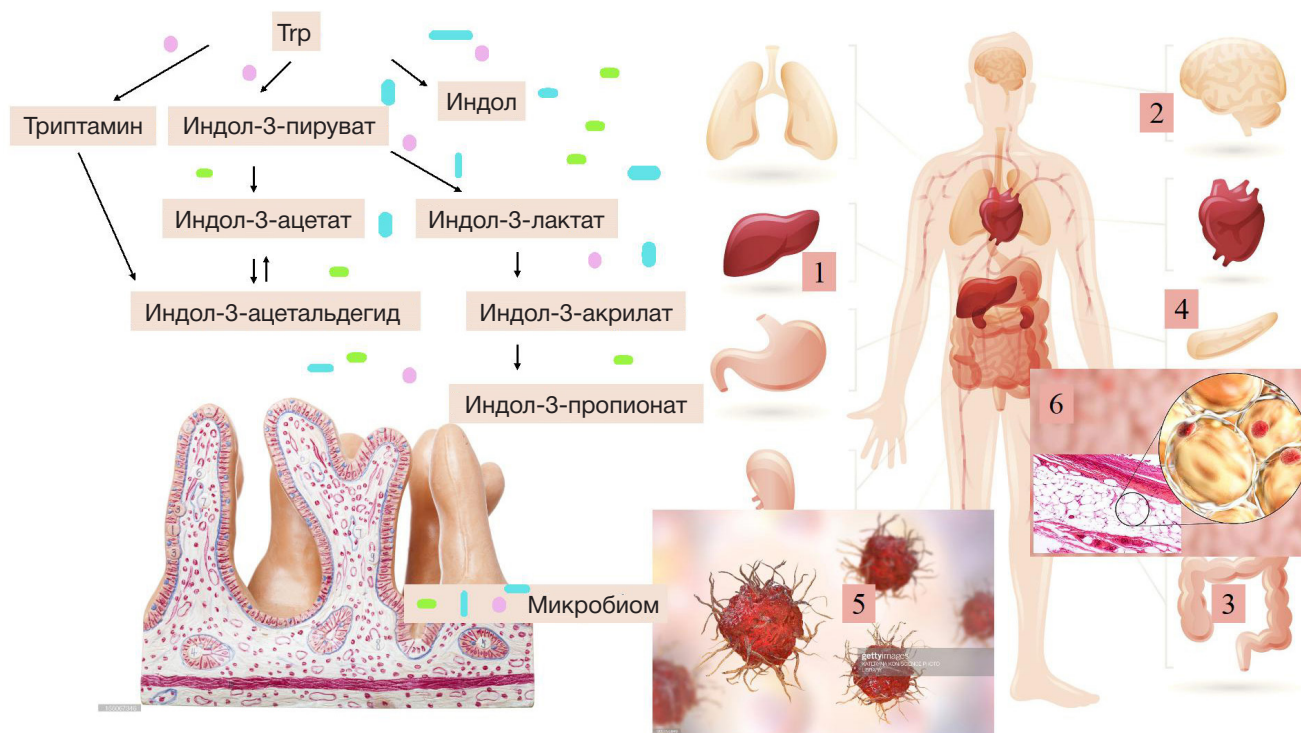
Таким образом, остается открытым вопрос о составе продуцентов отдельных метаболитов триптофана, гомеостатической стабильности этого состава в норме и при ожирении, а также места этих метаболитов в общем метаболическом профиле микробного сообщества кишечника и их влияние на ферментативный ландшафт микробиома кишечника. Под «ферментативным ландшафтом» (представленностью генов ферментов) мы понимаем наличие и содержание (в условных единицах) генов различных ферментов, т. е. возможное ферментативное присутствие в соответствии с представленностью ДНК микроорганизмов, которые потенциально могут экспрессировать тот или иной фермент.

Целью нашего исследования было изучение содержания метаболитов обмена триптофана в экстрактах кала и их взаимосвязи с прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника у больных ожирением.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Группа исследования

Обследовано 223 пациента, средний возраст которых составил  $39,9 \pm 4,2$  года. Сформированы две клинические группы. Группа 1 ( $n = 109$ ) — контрольная группа здоровых добровольцев, не имеющих ожирения и/или метаболического синдрома, со средним индексом массы тела (ИМТ) —  $19,8 [18,5–22,0]$  кг/м<sup>2</sup> и объемом талии (ОТ) —  $73,0 [68,0–74,5]$  см. Критерии включения в группу 1: возраст от 30 до 50 лет, ИМТ < 25 кг/м<sup>2</sup>, ОТ < 80 см для женщин и < 94 см для мужчин; отсутствие приема антибиотиков, пребиотических и пробиотических препаратов в течение трех месяцев до включения в



**Рис. 1.** Образование МИСТ и их роль в организме человека: индол-3-ацетат и индол-3-пропионат регулируют липогенез в печени и препятствуют жировому перерождению печени (1); индол-3-пропионат оказывает нейропротекторную функцию; индол-3-лактат отвечает за рост аксонов и когнитивные способности (2); индол-3-пропионат регулирует проницаемость мукозального барьера — повышает синтез белков плотных контактов, снижает продукцию фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и выполняет антиоксидантную функцию (3); в поджелудочной железе МИСТ подавляют аутоиммунное воспаление, препятствуют развитию сахарного диабета 1-го типа; кроме того, показано, что индол-3-ацетат подавляет пролиферацию опухолевых клеток в поджелудочной железе (4); индол-3-ацетат уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами; индол-3-ацетальдегид повышает продукцию интерлейкина-22 (ИЛ-22) в иммунных клетках, и в том числе клетках кишечника (5); в жировой ткани индол-3-ацетат и индол-3-пропионат оказывают противовоспалительное действие, таким образом препятствуют развитию инсулинорезистентности (6)

исследование подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения из группы 1: беременность и грудное вскармливание, декомпенсация хронических заболеваний, наличие онкопатологии, наследственные патологии триптофанового обмена в анамнезе, острые респираторные вирусные инфекции; любые заболевания желудочно-кишечного тракта (в том числе неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника); депрессия; алкоголизм и отсутствие ожирения и/или метаболического синдрома. Группа 2 ( $n = 114$ ) — группа наблюдения с ожирением и/или метаболическим синдромом со средним ИМТ —  $33,0 [31,0-36,0]$   $\text{кг}/\text{м}^2$  и ОТ —  $90,0 [96,0-105,0]$  см. Критерии включения в группу 2: возраст от 30 до 50 лет, ИМТ —  $30-34,9 \text{ кг}/\text{м}^2$ , ОТ  $> 80$  см для женщин и  $> 94$  см для мужчин; отсутствие приема антибиотиков, пребиотических и пробиотических препаратов в течение трех месяцев до включения в исследование, подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения из группы 2: беременность и грудное вскармливание, декомпенсация хронических заболеваний, наличие онкопатологии, наследственные патологии триптофанового обмена в анамнезе, острые респираторные вирусные инфекции; любые заболевания желудочно-кишечного тракта (в том числе неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, синдром раздраженного кишечника); депрессия; алкоголизм. Пациенты групп наблюдения не придерживались какой-либо диеты. От каждого участника исследования был получен образец фекалий. С целью минимизации влияния климатических условий, характера питания и этнических факторов на кишечный микробиом в исследование были включены

лица, проживающие на одной территории (Ростовская область и город Ростов-на-Дону) в осенне-летний период.

### Хроматографический анализ

От всех участников исследования были получены образцы кала согласно протоколу исследования. Транспортировку и хранение образцов осуществляли с соблюдением холодной цепи при температуре не выше  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Количественный анализ метаболитов обмена триптофана в кале проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Анализ проводили при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1290 (Agilent inc.; США) с системой автоматического ввода образцов, термостатом колонки и дегазатором. Для подготовки образцов кала его лиофилизировали до сухого остатка, далее навеску около 5 мг экстрагировали 50% метанолом в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты. После центрифугирования образец анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографическое разделение проводили с использованием аналитической колонки Discovery PFP HS F5 ( $2,1 \times 150$  мм; 3 мкм, Supelco Inc, St. Louis, Missouri, USA). Для детектирования использовали масс-спектрометрический детектор на основе тройного квадрупольного Agilent 6470 (Agilent inc.; США) MRM и электрораспылительной ионизацией. Характеристические для каждого соединения родительские и дочерние ионы для режима MRM, а также параметры ионизации и диссоциации оптимизировали с использованием стандартов исследуемых метаболитов. Полученный сигнал



обрабатывали при помощи программного обеспечения Masshunter (Agilent inc.; США).

Температуру колонки и скорость потока устанавливали на 40 °C и 0,4 мл/мин соответственно. Подвижные фазы состоят из 0,1% водного раствора муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Программа градиента была следующей: 0 мин — 1% В; 4 мин — 10% В; 9 мин — 90% В; 10 мин — 90% В; 10,1 — 1% В; 12 мин — 1% В. Ионизация электрораспылением работала в положительном режиме. Основные параметры МС были следующими: температура газа — 300 °C; расход газа — 8 л/мин; газ для распыления — 20 фунтов на квадратный дюйм; нагреватель защитного газа — 300; расход защитного газа — 10 л/мин; капиллярное напряжение — 3500 кВ.

Расчет концентраций метаболитов проводили методом внутреннего стандарта (2-гидроксиникотиновая кислота). Стандарты определяемых соединений готовили с использованием искусственной матрицы, содержащей бычий сывороточный альбумин и хлорид натрия. В матрицу добавляли исследуемые метаболиты и проводили подготовку согласно методике анализа.

Методика была валидирована по показателям селективности, линейности, точности, воспроизводимости, матричному эффекту и стабильности анализа. Валидацию проводили в соответствии с руководством по валидации биоаналитических методик FDA. Образцы кала лиофилизировали до сухого остатка, затем образец массой около 5 мг экстрагировали 50%-ным раствором метанола в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты. Пробоподготовку проводили следующим образом: 100 мкл каловых спиртовых экстрактов (калибраторы или КК) смешивали с раствором внутреннего стандарта 10 мкл исходного раствора, 10 мкг/мл раствора 2-гидроксиникотиновой кислоты и 400 мкл ацетонитрила. Затем смесь встряхивали, центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 об./мин и выпаривали досуха в вакуумном центрифужном испарителе при 37 °C. Остатки далее восстанавливали 100 мкл раствора 0,02% аскорбиновой кислоты в 10%-м метаноле, центрифугировали и переносили в пробирку для ЖХ-МС. 5 мкл экстракта вводили в жидкостный хроматограф для последующего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

### Секвенирование (V3-V4 региона) гена 16S рРНК

Из образцов фекалий проводили выделение бактериальной ДНК с использованием наборов QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH; Германия). Полученную бактериальную ДНК амплифицировали с использованием праймеров, специфичных к варибельному участку V3-V4 гена 16S рРНК. После очистки смеси парамагнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter; США) ПЦР-продукты индексировали с помощью индекс-праймеров Nextera XT Index Kit (Illumina, Inc.; США). Повторно выполняли очистку смеси парамагнитными частицами и сформированные библиотеки секвенировали на платформе MiSeq (Illumina, Inc.; США) согласно протоколу производителя.

### Техническая обработка результатов секвенирования

Для полученных ридов был проведен контроль качества с помощью программы fastQC по следующим критериям: 1) распределение качества оснований — минимум 90% с качеством > 25; 2) распределение длины ридов — минимум

90% прочтений достигают длины в 300 нуклеотидов; 3) максимальный процент неопределенных оснований — 1.

Полученные последовательности генов были проанализированы с помощью программы «QIIME v.1.9.1» с использованием референсной базы данных «Greengenes v.13.8» с 97%-ным порогом сходства между последовательностями. Данные представленности бактериальных таксонов в общем пуле ридов были получены в долях (от 0 до 1), рассчитанных на основе количества картированных ридов для каждого таксона. Для характеристики альфа-разнообразия кишечного микробиома было рассчитано общее количество наблюдаемых операционных таксономических единиц (Observed OTUs). Операционная таксономическая единица — суррогатный таксономический уровень, результат кластерного объединения результатов секвенирования генов 16S рРНК бактерий.

### Биоинформационный анализ

Первичную обработку данных секвенирования и получение списка OTU осуществляли в программе «QIIME v.1.9.1» [23]. Вторым этапом проводили анализ предположительной метаболической роли участников микробиоты путем реконструкции ненаблюдаемых состояний при помощи PICRUSt [24].

Изучение прогностической представленности генов ферментов проводили с использованием биоинформационного анализа, в процессе которого было предусмотрено сопоставление данных метагеномного секвенирования с базой данных энциклопедии KEGG Enzymes, при помощи PICRUSt [24]. Результаты анализа прогностической представленности генов ферментов указаны в относительных единицах, и их можно сравнивать между образцами и когортами исследуемых групп в рамках одного проекта.

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием пакета программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc; США). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Распределение носило нормальный характер и данные были представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

В таблицах приведен коэффициент корреляции Спирмена. Корреляционный анализ проведен с оценкой статистической значимости коэффициента корреляции. Статистически значимым различие принимали при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Содержание катаболитов триптофана в кале

При анализе содержания триптофановых катаболитов в кале нами установлено, что доминантными МІСТ являются индол и индол-3-лактат (табл. 1).

В кале взрослых больных ожирением статистически значимо снижена концентрация восьми метаболитов обмена триптофана по сравнению со здоровыми донорами: индол-3-лактата, хинолиновой кислоты, 3-гидросиндол-ацетоуксусной кислоты, антраиловой кислоты, ксантуреновой кислоты, индол-3-карбоксальдегида, индол-3-акрилата и индол-3-пропионата. Следует отметить, что содержание индол-3-лактата в кале у больных с ожирением резко снижено, и среднее значение содержания данного метаболита триптофана на 78% снижено в сравнении с нормой (табл. 1).



Таблица 1. Концентрация метаболитов обмена триптофана у взрослых в кале, нмоль/г

Метаболит	Здоровые взрослые (n = 109)	Взрослые ожирение (n = 114)
Индол	464 ± 462	389 ± 361
Индол-3-лактат	454 ± 18,6	101 ± 218*
Индол-3-ацетат	21,9 ± 40,6	21,9 ± 42,9
Индол-3-пропионат	21,51 ± 29,9	8,28 ± 11,3*
Кинуреновая кислота	7,68 ± 9,15	5,59 ± 9,71
Индол-3-карбоксальдегид	5,14 ± 4,31	2,60 ± 2,24*
Хинолиновая кислота	5,13 ± 4,71	2,23 ± 2,26*
Триптамин	2,59 ± 7,42	2,11 ± 8,52
Ксантуруеновая кислота	2,36 ± 4,18	1,06 ± 2,22*
3-гидроксииндол-ацетоуксусная кислота	2,35 ± 4,28	1,45 ± 2,13*
Кинуренин	0,651 ± 0,961	0,551 ± 0,571
Анраниловая кислота	0,321 ± 0,231	0,191 ± 0,261*
Индол-3-акрилат	0,161 ± 0,211	0,051 ± 0,081*

Примечание: \* — разница достоверна при  $p < 0,05$ .

### Взаимосвязь содержания катаболитов триптофана в кале с прогностической представленностью генов ферментов кишечной микробиоты

С помощью PICRUSt-анализа таксономического разнообразия микробиома мы оценили количественную прогностическую представленность генов различных ферментов в соответствии с количественной представленностью ДНК тех или иных микроорганизмов кишечника в норме и при ожирении, а затем провели корреляционный анализ между прогностической ферментативной представленностью микробиоты кишечника и содержанием триптофановых катаболитов в кале.

Установили, что у лиц с ожирением наблюдается более выраженное сопряжение между прогностической представленностью генов ферментов микробиоты

кишечника и метаболитами обмена триптофана. Так, у здоровых обследуемых нами установлена 251 статистически значимая корреляционная связь (significance level = 3,  $p \leq 0,001$ ), тогда как у лиц с ожирением — 479 статистически значимых взаимосвязи с таким же уровнем достоверности (рис. 2).

Установили, что при ожирении содержание индола в кале статистически значимо не изменялось (табл. 1), тогда как прогностическая представленность генов ферментов микробиома кишечника, с которыми коррелирует содержание индола, увеличивалась в 10 раз (рис. 2).

Для второго доминантного катаболита обмена триптофана в кишечнике — индол-3-лактата мы установили статистически значимое снижение содержания в кале данного метаболита при ожирении (табл. 1). Однако при этом количество статистически значимых корреляционных пар



Рис. 2. Количественный анализ корреляций «катаболит триптофанового обмена — прогностическая представленность генов ферментов микробиома кишечника». У здоровых лиц анраниловая кислота и индол-3-акрилат являются ключевыми катаболитами, которые тесно взаимосвязаны с прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника. У лиц с ожирением индол, индол-3-лактат, кинуреновая и хинолиновая кислоты взаимосвязаны с прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника

**Таблица 2.** Взаимосвязь «содержание индол-3-лактата в кале и прогностической представленности генов ферментов микробиома кишечника» у больных с ожирением

Ферменты	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	Метаболические пути
Аллозакиназа EC: 2.7.1.55	0,407	Метаболизм фруктозы и монозы
УДФ-4-амино-4-дезоксид-арабинозаформилтрансфераза EC: 2.1.2.13	0,372	Метаболизм аминокислот и нуклеотидных сахаров
УДФ-глюкуроксидаза EC: 1.1.1.305	0,372	Метаболизм аминокислот и нуклеотидных сахаров
УДФ-4-амино-4-дезоксид-арабинозааминотрансфераза EC: 2.6.1.87	0,371	Метаболизм аминокислот и нуклеотидных сахаров
Сульфохинозаизомераза EC: 5.3.1.31	0,37	Распад сульфохинозидов (сульфогликолиз)
Оксалил-КоА-декарбоксилаза EC: 4.1.1.8	0,363	Метаболизм гликолата и дикарбоксилата
Глюкозо-1-фосфатаза EC: 3.1.3.10	0,358	Глюконеогенез
1,4-дигидрокси-2-нафтоил-КоА-гидролаза EC: 3.1.2.28	0,351	Метаболизм витамина К. Биосинтез вторичных метаболитов
N-гидроксиариламин-О-ацетилтрансфераза EC: 2.3.1.118	0,351	N-ацелирование ариламинов и ацелирование арилгидроксаматов
Додецеиноил-КоА-изомераза EC: 5.3.3.8	0,35	Метаболизм липидов
Сульфотриптокиназа EC: 2.7.1.184	0,349	Распад сульфохинозидов (сульфогликолиз)
Формиатдегидрогеназа EC: 1.1.5.6	0,347	Распад сульфохинозидов (сульфогликолиз)
Сукцинилорнитинтрансминаза EC: 2.6.1.81	0,347	Метаболизм аргинина и полиаминов
Рибонуклеаза энтеробактера EC: 3.1.27.6	0,346	Двухстадийное эндонуклеолитическое расщепление с образованием 3'-нуклеотидов
Сульфотриптофосфатазидолаза EC: 4.1.2.57	0,346	Распад сульфохинозидов (сульфогликолиз)
Феррихелатредуктаза (НАДФН) EC: 1.16.1.9	0,345	Восстановление трехвалентного железа, связанного с различными хелаторами железа (сидерофорами)
Сукцинатполуальдегиддегидрогеназа (НАД(+)) EC: 1.2.1.24	0,344	Метаболизм глутамата и глутамина
ДезоксиЦТФ-дифосфатаза EC: 3.6.1.65	0,343	Метаболизм пиримидиновых нуклеотидов
ДезоксиТДФ-4-амино-4,6-дидезокси-D-галактозоацетилтрансфераза EC: 2.3.1.210	0,343	Биосинтез нуклеотидных сахаров
Инозинкиназа EC: 2.7.1.73	0,343	Метаболизм пуриновых нуклеотидов
ТДФ-N-ацетилфукозамин: липид II N-ацетилфукозаминилтрансфераза EC: 2.4.1.325	0,343	Биосинтез общего антигена энтеробактерий
Липид IV(A) пальмитолеилтрансфераза EC: 2.3.1.242	0,342	Биосинтез липида А, липополисахаридов
Глюконат-2-дегидрогеназа EC: 1.1.1.215	0,342	Метаболизм кетоглюконата, пентозофосфатный путь
Сульфолактальдегид-3-редуктаза EC: 1.1.1.373	0,341	Распад сульфохинозидов (сульфогликолиз)
Альфа-D-рибозо-1-метилфосфонат-5-трифосфатсинтаза EC: 2.7.8.37	0,34	Фосфонатный и фосфинатный метаболизм

для индол-3-лактата и прогностической представленности генов различных ферментов микробиома кишечника с пяти пар, установленных нами в норме, увеличивается до 214 пар у лиц с ожирением (рис. 2).

У больных с ожирением нами установлено, что потенциально ключевыми сигнальными метаболитами триптофана, коррелирующими с прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника, являются: индол, индол-3-лактат, кинуреновая и хинолиновая кислоты. Тогда как у лиц без ожирения такими ключевыми сигнальными молекулами являются индол-3-ацрилат и анраниловая кислота (рис. 2).

При дальнейшем анализе нами установлены ферменты, прогностическая представленность генов которых более тесно коррелирует (коэффициент ранговой корреляции Спирмена — 0,407-0,340) с содержанием в кале индол-3-лактата (табл. 2).

Среди ферментов микробиома, прогностическая представленность генов которых коррелирует с содержанием индол-3-лактата в кишечнике у больных с ожирением, нами установлены ферменты обмена углеводов, аминокислот, полиаминов, нуклеотидов и сульфосахаров (табл. 2).

Установлено также, что содержание индол-3-лактата в кале коррелирует с прогностической представленностью генов ферментов метаболизма аминокислот: аргинина, глутамата и глутамина.

#### **Взаимосвязь таксономической представленности микроорганизмов кишечника с содержанием индол-3-лактата в кале**

Анализ представленности бактерий и архей на уровне семейств (Phylum – f), родов (Genus – g) и видов (Species – s) у здоровых обследуемых позволил установить, что с концентрацией индол-3-лактата в кале статистически значимо взаимосвязана представленность следующих семейств микроорганизмов: *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Akkermansiaceae*, *Barnesiellaceae* (приложение 1).

В то же время мы установили, что у больных ожирением с индол-3-лактатом в кале статистически значимо взаимосвязаны другие представители микробиоты кишечника, такие как: *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* (приложение 2). Важно отметить, что

при ожирении микроорганизмы, содержание которых коррелирует с содержанием индол-3-лактата в кишечнике, отличаются от нормы. Если в норме мы установили наличие 54 статистически значимых корреляционных связей между различными видами микроорганизмов в кишечнике и индол-3-лактатом, то у пациентов с ожирением статистически значимых корреляционных связей было в три раза больше (154 пары).

В результате проведенного нами анализа не установлено статистически значимых корреляционных связей между индол-3-лактатом и представленностью в кишечнике *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia-Shigella* для лиц с нормальной массой тела. Очевидно, что при ожирении индол-3-лактат в кишечнике продуцирует преимущественно семейство *Enterobacteriaceae*. Важно отметить, что, согласно литературным данным, ожирение приводит к таксономическому обеднению микробиома кишечника [19]. Однако в нашем исследовании установлено, что при ожирении происходит, напротив, обогащение представленности таксонов микробиоты кишечника, которая является потенциальным продуцентом индол-3-лактата.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интересен тот факт, что у лиц с ожирением снижается содержание катаболитов обмена триптофана в кале, и максимальное снижение установлено именно для индол-3-лактата. При этом именно данный метаболит является доминантным как в норме, так и при ожирении. Однако только при ожирении мы регистрируем ключевую роль индол-3-лактата в плане потенциального регулятора прогностической представленности генов ферментов микробиома кишечника. Нами установлено 214 различных фермента, прогностическая представленность которых потенциально зависит от индол-3-лактата.

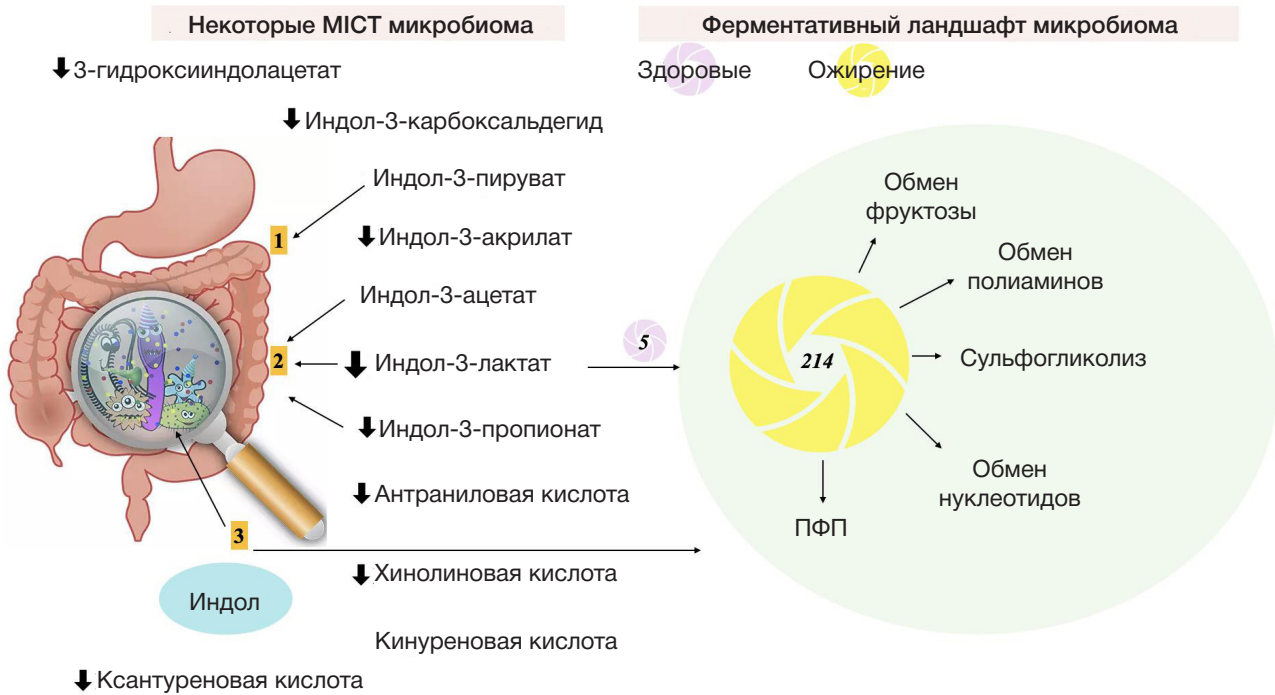
Одной из важных мишеней для индол-3-лактата в патогенезе ожирения мы считаем установленные нами прогностические представленности для ферментов обмена полиаминов. Известно, что полиамины образуются микробиотой кишечника из аргинина и его продукта — орнитина [20]. Метаболизм полиаминов играет центральную роль в регуляции системного и мукозального адаптивного иммунитета. В свою очередь, аргинин — важный модулятор метаболизма макрофагов и Т-клеток, способный влиять на их эффекторные функции. Кроме того, полиамины ингибируют выработку провоспалительных цитокинов и обладают антиоксидантным эффектом [25]. В кишечнике полиамины могут снижать высвобождение цитокинов, что способствует лучшей репарации поврежденного эпителия и восстановлению нормальной барьерной функции. Спермин (полиамин) ингибирует активацию инфламмосомы, представляющей собой белковый комплекс, экспрессируемый эпителиальными клетками, который может регулировать секрецию ИЛ-18 [25]. Было также показано, что присутствие пробиотического штамма *Bifidobacterium animalis* может индуцировать устойчивость к окислительному стрессу и способствовать увеличению продолжительности жизни, которая зависит от усиленного микробного синтеза полиаминов [26]. По литературным данным, повышенный уровень полиаминов в белой жировой ткани, печени или скелетных мышцах может стимулировать энергетический обмен и устойчивость к развитию алиментарного ожирения [27]. Также известно, что метаболиты полиаминов участвуют в адипогенезе

[28]. Было показано, что лечение экзогенным спермином эффективно снижает массу тела и уровень глюкозы натощак, а также улучшает толерантность к глюкозе у мышей с ожирением, связанным с диетой [29]. Кроме того, спермин влияет на рецепцию инсулина и инсулиночувствительность [30]. Таким образом иммунологические и метаболические эффекты полиаминов во многом совпадают с эффектами сигнальной системы «индолы-AhR». Найденные нами корреляции могут свидетельствовать о совместном участии индол-3-лактата и полиаминов в механизмах толерогенности (или их нарушений) у больных с ожирением, а совместное снижение этих двух механизмов толерогенности при ожирении возможно приводит к повышенной проницаемости кишечника.

Взаимосвязь уровня индол-3-лактата в кале и прогностической представленности генов ферментов сульфогликолиза микробиома кишечника пока не совсем изучена. Сульфосахар сульфохиновоза (SQ) вырабатывается практически всеми фотосинтезирующими организмами на Земле и метаболизируется бактериями в процессе сульфогликолиза. Сульфогликолитический путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса метаболизирует SQ с образованием дигидроксиацетонфосфата и сульфолактальдегида и аналогичен классическому пути гликолиза [31, 32]. В литературе есть работы, которые идентифицируют микроорганизмы, принимающие участие в сульфогликолизе [33]. Однако нет исследований, оценивающих взаимосвязь метаболитов сульфогликолиза с содержанием индольных метаболитов триптофанового обмена. Мы установили наличие статистически значимых взаимосвязей между прогностической представленностью генов ферментов сульфогликолиза микробиома кишечника и концентрацией индол-3-лактата в кале у лиц с ожирением (рис. 3). Следует отметить, что сульфосахара являются резервуарами сульфата, который потенциально может быть использован для синтеза гликозаминогликанов и ремоделирования внеклеточного матрикса, что имеет важное значение как для развития хронического вялотекущего воспаления при ожирении, так и для формирования протуморогенного фенотипа, что характерно для лиц с ожирением [21].

Важно отметить, что нами не было установлено статистически значимых взаимосвязей между содержанием катаболитов триптофана в кале и прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника, которые принимают участие в их продукции.

При ожирении происходит изменение генотипа и возможно фенотипа микробиоты кишечника: в три раза увеличивается количество таксонов, которые потенциально могут быть поставщиками индол-3-лактата. При этом значимое снижение концентрации индол-3-лактата в кале может отражать выраженное бактериальное обсеменение кишечника и повышенное потребление данного триптофанового катаболита соответствующими таксонами микробиоты, которые характерны для больных с ожирением. Именно для содержания индол-3-лактата в кале количественно увеличиваются статистически значимые взаимосвязи с прогностической представленностью генов ферментов углеводного, липидного, нуклеотидного и аминокислотного обменов, а также сульфогликолиза. На популяционном уровне микробиота, в том числе кишечника, считается стабильной и эволюционно отобранной. При этом комменсальную микробиоту можно качественно и количественно модулировать [19] диетой,



**Рис. 3.** При ожирении происходит существенная девиация в сопряжении содержания индол-3-лактата и прогностической представленности генов ферментов кишечного микробиома. У здоровых доноров установлено пять статистически значимых корреляционных пар для индол-3-лактата и прогностической представленности генов ферментов микробиома кишечника, тогда как у лиц с ожирением отмечается значимое обогащение микробиома, который имеет статистически значимые пары для содержания в кале индол-3-лактата и прогностической представленности генов ферментов различных метаболических путей. ↓ — снижение концентрации МІСТ в образцах кала; 1 — индол-3-пируват действует (через AhR) на клетки кишечника и определяет целостность плотных контактов; 2 — индол-3-ацетат, индол-3-пропионат и индол-3-лактат (через AhR) действуют на иммунные клетки кишечника — повышают устойчивость к патогенам и снижают проницаемость кишечника; 3 — межвидовая молекула QS — индол, концентрация которого константна

различными сигнальными молекулами и цитокинами. Возможно, что обогащение таксонов, продуцирующих индол-3-лактат, происходит компенсаторно с целью подавления продукции провоспалительных цитокинов, которая, как правило, сопровождает пациентов с ожирением. Так, известно, что индол-3-лактат оказывает выраженное противовоспалительное действие — участвует в индукции иммунорегуляторных Т-клеток и подавлении воспалительных Т-клеток [34]. Из недавних исследований известно, что индол-3-лактат является доминантным катаболитом триптофана для *Bifidobacterium (B. longum subsp. infantis)*. Кроме того, достаточно высокий уровень индол-3-лактата содержится в грудном молоке женщин [34]. Нами же показано, что содержание индол-3-лактата в кале у пациентов с ожирением потенциально зависит от таксономической представленности семейства Enterobacteriaceae. Снижение данного семейства микробиоты кишечника коррелирует со снижением индол-3-лактата у лиц с ожирением. Однако, если учитывать установленное нами ранее повышение индол-3-лактата в сыворотке крови лиц с ожирением [18], вполне вероятно, что образование данного МІСТ в кишечнике стабильное или даже повышенное, тогда как транспорт из кишечника в кровь индол-3-лактата у больных с ожирением может быть интенсифицирован. Ответ еще предстоит найти, так как источником индол-3-лактата может быть не только микробиота кишечника, но и микробиота других экологических ниш организма человека.

## ВЫВОДЫ

Доминантными катаболитами триптофана являются индол и индол-3-лактат как у здоровых лиц, так и у лиц с ожирением.

В кале у пациентов с ожирением статистически значимо снижена концентрация: индол-3-лактата, хинолиновой кислоты, 3-гидроксииндолацетатукусусной кислоты, антраниловой кислоты, ксантуреновой кислоты, индол-3-карбоксальдегида, индол-3-акрилата и индол-3-пропионата. Максимальное снижение отмечено именно для индол-3-лактата. У лиц с ожирением отмечается более выраженное сопряжение между прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника и МІСТ. В группе здоровых обследуемых представленность генов ферментов микробиома кишечника коррелирует с содержанием индол-3-акрилата и антраниловой кислоты. Тогда как для лиц с ожирением другие МІСТ (индол и индол-3-лактат), а также хинолиновая и кинуреновая кислоты, определяют «ферментативный ландшафт» микробиома кишечника. Более тесные корреляционные связи между прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника и МІСТ были установлены именно для индол-3-лактата. Установлено, что содержание индол-3-лактата в кале коррелирует с прогностической представленностью генов ферментов микробиома кишечника, включающих метаболизм углеводов, нуклеотидов, аминокислот, полиаминов и сульфосахаров. Не установлено статистически значимых корреляционных связей между содержанием катаболитов триптофана и прогностической представленностью генов ферментов, которые принимают участие в их образовании. У пациентов с ожирением исследуемой популяции установлено увеличение разнообразия таксонов потенциальных продуцентов индол-3-лактата. Потенциальная коррекция метаболической активности микробиоты кишечника катаболитами триптофана может иметь профилактическое и терапевтическое значение для больных ожирением.



## Литература

- Bharti K, Grimm DJ. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis Briefings. in *Bioinformatics*. 2021; 22 (1): 178–93. PubMed PMID: 31848574.
- Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R. Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 13 (1): 3–15. PubMed PMID: 30791839.
- Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2019; 4 (2): 293–305. PubMed PMID: 30531976.
- Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017; 13 (2): 17004. PubMed PMID: 28741610.
- Kiyohara H, Sujino T, Teratani T, Miyamoto K, Arai MM, Nomura E, et al. Toll-like receptor 7 agonist-induced dermatitis causes severe dextran sulfate sodium colitis by altering the gut microbiome and immune cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018; 25 (7): 135–56. PubMed PMID: 30510995.
- Desai SN, Landay AL. HIV and aging: role of the microbiome. *Curr Opin HIV AIDS*. 2018; 13 (1): 22–27. PubMed PMID: 29035948.
- Burcelin R. HIV and aging: role of the microbiome. *Biol Aujourd'hui*. 2017; 211 (1): 1–18. PubMed PMID: 28682223. French.
- Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3294. PubMed PMID: 30120222.
- Scott SA, Fu J, Chang PV. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020; 117 (32): 19376–87. PubMed PMID: 32719140.
- Wong CB, Tanaka A, Kuhara T, Xiao JZ. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Microorganisms*. 2020; 8 (3): 398. PubMed PMID: 32178456.
- Aust AC, Benesova E, Vidova V, Coufalikova K, Smetanova S, Borek I, et al. Profiling tryptophan catabolites of human gut microbiota and acute-phase protein levels in neonatal dried blood specimens. *Front Microbiol*. 2021; 12: 665743. PubMed PMID: 34777268.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017; 474: 1823–36. PubMed PMID: 34777268.
- Vyhřádalová B, Krasulová K, Pečínková P, Vyhřádalová B, Krasulová K, Pečínková P, et al. Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (7): 2614. PubMed PMID: 32283770.
- Yoval-Sánchez B, Pardo JP, Rodríguez-Zavala JS. New insights into the half-of-the-sites reactivity of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*. 2013; 81 (8): 1330–9. DOI: 10.1002/prot.24274.
- Qu Y, Dai C, Zhang X, Ma Q. A new interspecies and interkingdom signaling molecule-Indole. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2019; 35 (11): 2177–88. PubMed PMID: 31814363. Chinese.
- Ji Y, Gao Y, Chen H, Yin Y, Zhang W. Indole-3-acetic acid alleviates nonalcoholic fatty liver disease in mice via attenuation of hepatic lipogenesis, and oxidative and inflammatory stress. *Nutrients*. 2019; 11 (9): 2062. PubMed PMID: 31484323.
- Available from: <https://www.genome.jp/pathway/map00380+C00954>
- Shestopalov AV, Shatova OP, Karbyshev MS, Gaponov AM, Moskaleva NE, Appolonova SA, et al. «Kynurenine switch» and obesity. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20: 103–11. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-4-103-111].
- Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front Microbiol*. 2016; 7: 455. PubMed PMID: 27065999.
- Ramos-Molina B, Queipo-Ortuño MI, Lambertos A, Tinahones FJ, Peñafiel R. Dietary and gut microbiota polyamines in obesity- and age-related diseases. *Front Nutr*. 2019; 6: 24. PubMed PMID: 30923709.
- Silveira EA, da Silva Filho RR, Spexoto MC, Haghghatdoost F, Sarrafzadegan N, de Oliveira C. The role of sarcopenic obesity in cancer and cardiovascular disease: a synthesis of the evidence on pathophysiological aspects and clinical implications. *Int J Mol Sci*. 2012; 22 (9): 4339. PubMed PMID: 33919368.
- Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G, Shen J, et al. Dietary modulation of gut microbiota contributes to alleviation of both genetic and simple obesity in children. *EBioMedicine*. 2015; 2 (8): 968–84. PubMed PMID: 26425705.
- Available from: <http://qiime.org/>
- Available from: <https://picrust.github.io/picrust/>
- Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Dev*. 2016; 30 (14): 1589–97. PubMed PMID: 27474437.
- Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23652. PubMed PMID: 21858192.
- Bonhoure N, Byrnes A, Moir RD, Hodroj W, Preitner F, Praz V, et al. Loss of the RNA polymerase III repressor MAF1 confers obesity resistance. *Genes Dev*. 2015; 29 (9): 934–47. PubMed PMID: 25934505.
- Ishii I, Ikeguchi Y, Mano H, Wada M, Pegg AE, Shirahata A. Polyamine metabolism is involved in adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Amino Acids*. 2012; 42 (2–3): 619–26. PubMed PMID: 21809076.
- Sadasivan SK, Vasamsetti B, Singh J, Marikunte VV, Oommen AM, Jagannath MR, et al. Exogenous administration of spermine improves glucose utilization and decreases bodyweight in mice. *Eur J Pharmacol*. 2014; 729: 94–99. PubMed PMID: 24530553.
- Pedersen SB, Hougaard DM, Richelsen B. Polyamines in rat adipocytes: their localization and their effects on the insulin receptor binding. *Mol Cell Endocrinol*. 1989; 62 (2): 1661–6. PubMed PMID: 2663568.
- Sharma M, Abayakoon P, Epa R, Jin Y, Lingford JP, Shimada T, et al. Molecular basis of sulfosugar selectivity in sulfolipid synthesis. *ACS Cent Sci*. 2021; 7 (3): 476–87. PubMed PMID: 33791429.
- Frommeyer B, Fiedler AW, Oehler SR, Hanson B, Loy A, Franchini P, et al. Environmental and intestinal phylum firmicutes bacteria metabolize the plant sugar sulfoquinovose via a 6-deoxy-6-sulfofructose transaldolase pathway. *iScience*. 2020; 23 (9): 101510. PubMed PMID: 32919372.
- Haange SB, Groeger N, Froment J. Multiplexed quantitative assessment of the fate of taurine and sulfoquinovose in the intestinal microbiome. *Metabolites*. 2020; 10 (11): 430. PubMed PMID: 33114761.
- Huang W, Cho KY, Meng D, Walker WA. The impact of indole-3-lactic acid on immature intestinal innate immunity and development: a transcriptomic analysis. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 8088. PubMed PMID: 33850185.

## References

- Bharti K, Grimm DJ. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis Briefings. in *Bioinformatics*. 2021; 22 (1): 178–93. PubMed PMID: 31848574.
- Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R. Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 13 (1): 3–15. PubMed PMID: 30791839.
- Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2019; 4 (2): 293–305. PubMed PMID: 30531976.
- Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017; 13 (2): 17004. PubMed PMID: 28741610.
- Kiyohara H, Sujino T, Teratani T, Miyamoto K, Arai MM, Nomura E, et al. Toll-like receptor 7 agonist-induced dermatitis causes severe

- dextran sulfate sodium colitis by altering the gut microbiome and immune cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018; 25 (7): 135–56. PubMed PMID: 30510995.
6. Desai SN, Landay AL. HIV and aging: role of the microbiome. *Curr Opin HIV AIDS*. 2018; 13 (1): 22–27. PubMed PMID: 29035948.
  7. Burcelin R. HIV and aging: role of the microbiome. *Biol Aujourd'hui*. 2017; 211 (1): 1–18. PubMed PMID: 28682223. French.
  8. Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3294. PubMed PMID: 30120222.
  9. Scott SA, Fu J, Chang PV. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020; 117 (32): 19376–87. PubMed PMID: 32719140.
  10. Wong CB, Tanaka A, Kuhara T, Xiao JZ. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Microorganisms*. 2020; 8 (3): 398. PubMed PMID: 32178456.
  11. Aust AC, Benesova E, Vidova V, Coufalikova K, Smetanova S, Borek I, et al. Profiling tryptophan catabolites of human gut microbiota and acute-phase protein levels in neonatal dried blood specimens. *Front Microbiol*. 2021; 12: 665743. PubMed PMID: 34777268.
  12. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017; 474: 1823–36. PubMed PMID: 34777268.
  13. Vyhřádalová B, Krasulová K, Pečňková P, Vyhřádalová B, Krasulová K, Pečňková P, et al. Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (7): 2614. PubMed PMID: 32283770.
  14. Yoval-Sánchez B, Pardo JP, Rodríguez-Zavala JS. New insights into the half-of-the-sites reactivity of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*. 2013; 81 (8): 1330–9. DOI: 10.1002/prot.24274.
  15. Qu Y, Dai C, Zhang X, Ma Q. A new interspecies and interkingdom signaling molecule-Indole. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2019; 35 (11): 2177–88. PubMed PMID: 31814363. Chinese.
  16. Ji Y, Gao Y, Chen H, Yin Y, Zhang W. Indole-3-acetic acid alleviates nonalcoholic fatty liver disease in mice via attenuation of hepatic lipogenesis, and oxidative and inflammatory stress. *Nutrients*. 2019; 11 (9): 2062. PubMed PMID: 31484323.
  17. Available from: <https://www.genome.jp/pathway/map00380+C00954>
  18. Shestopalov AV, Shatova OP, Karbyshev MS, Gaponov AM, Moskaleva NE, Appolonova SA, et al. «Kynurenine switch» and obesity. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20: 103–11. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-4-103-111].
  19. Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front Microbiol*. 2016; 7: 455. PubMed PMID: 27065999.
  20. Ramos-Molina B, Queipo-Ortuño MI, Lambertos A, Tinahones FJ, Peñafiel R. Dietary and gut microbiota polyamines in obesity- and age-related diseases. *Front Nutr*. 2019; 6: 24. PubMed PMID: 30923709.
  21. Silveira EA, da Silva Filho RR, Spexoto MC, Haghighatdoost F, Sarrafzadegan N, de Oliveira C. The role of sarcopenic obesity in cancer and cardiovascular disease: a synthesis of the evidence on pathophysiological aspects and clinical implications. *Int J Mol Sci*. 2012; 22 (9): 4339. PubMed PMID: 33919368.
  22. Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G, Shen J, et al. Dietary modulation of gut microbiota contributes to alleviation of both genetic and simple obesity in children. *EBioMedicine*. 2015; 2 (8): 968–84. PubMed PMID: 26425705.
  23. Available from: <http://qiime.org/>
  24. Available from: <https://picrust.github.io/picrust/>
  25. Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Dev*. 2016; 30 (14): 1589–97. PubMed PMID: 27474437.
  26. Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23652. PubMed PMID: 21858192.
  27. Bonhoure N, Byrnes A, Moir RD, Hodroj W, Preitner F, Praz V, et al. Loss of the RNA polymerase III repressor MAF1 confers obesity resistance. *Genes Dev*. 2015; 29 (9): 934–47. PubMed PMID: 25934505.
  28. Ishii I, Ikeguchi Y, Mano H, Wada M, Pegg AE, Shirahata A. Polyamine metabolism is involved in adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Amino Acids*. 2012; 42 (2-3): 619–26. PubMed PMID: 21809076.
  29. Sadasivan SK, Vasamsetti B, Singh J, Markunte VV, Oommen AM, Jagannath MR, et al. Exogenous administration of spermine improves glucose utilization and decreases bodyweight in mice. *Eur J Pharmacol*. 2014; 729: 94–99. PubMed PMID: 24530553.
  30. Pedersen SB, Hougaard DM, Richelsen B. Polyamines in rat adipocytes: their localization and their effects on the insulin receptor binding. *Mol Cell Endocrinol*. 1989; 62 (2): 1661–6. PubMed PMID: 2663568.
  31. Sharma M, Abayakoon P, Epa R, Jin Y, Lingford JP, Shimada T, et al. Molecular basis of sulfosugar selectivity in sulfoglycolysis. *ACS Cent Sci*. 2021; 7 (3): 476–87. PubMed PMID: 33791429.
  32. Frommeyer B, Fiedler AW, Oehler SR, Hanson B, Loy A, Franchini P, et al. Environmental and intestinal phylum firmicutes bacteria metabolize the plant sugar sulfoquinovose via a 6-deoxy-6-sulfofructose transaldolase pathway. *iScience*. 2020; 23 (9): 101510. PubMed PMID: 32919372.
  33. Haange SB, Groeger N, Froment J. Multiplexed quantitative assessment of the fate of taurine and sulfoquinovose in the intestinal microbiome. *Metabolites*. 2020; 10 (11): 430. PubMed PMID: 33114761.
  34. Huang W, Cho KY, Meng D, Walker WA. The impact of indole-3-lactic acid on immature intestinal innate immunity and development: a transcriptomic analysis. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 8088. PubMed PMID: 33850185.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ И ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Н. С. Баранова<sup>1</sup>✉, М. С. Грись<sup>1</sup>, А. А. Баранов<sup>1</sup>, Н. Н. Спиринов<sup>1</sup>, А. С. Артюхов<sup>2</sup>, К. М. Шакирова<sup>2</sup>, Е. Л. Насонов<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой, Москва, Россия

<sup>4</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

В возникновении и развитии обострений рассеянного склероза (РС) участвуют персистирующие инфекции: вирусы Эпштейна–Барр, герпеса 6-го типа, простого герпеса 1-го и 2-го типов, варицелла-зостер-вирус. Выработка цитокинов имеет ключевое значение в ограничении распространения герпетической инфекции в организме человека, а дисбаланс их продукции является фактором прогрессирования РС. Целью исследования было определить уровень цитокинов в сыворотке крови у пациентов РС, оценить их клиническое значение и взаимосвязь с реактивацией герпетической инфекции. Обследовано 36 пациентов (12 мужчин и 24 женщины), с достоверным РС (критерии McDonald) и ремитирующим течением. У 18 человек выявлена реактивация периферической герпес-вирусной инфекции. Сывороточный уровень 15 цитокинов: IL1 $\beta$ , IL4, IL6, ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$ , IL10, IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL23, IL25, IL31, IL33, sCD40L исследовали с помощью мультиплексной технологии xMAP. При РС, в сравнении с контролем, выявлено увеличение IL10, IL33 ( $p < 0,001$ ). Наиболее часто выявляли высокие значения IL33 — у 20 (52,8%) пациентов. При обострении заболевания средний уровень IL10 был выше ( $p < 0,01$ ), достоверно чаще встречались высокие значения IL31 (соответственно 42,8 и 6,9%;  $p = 0,04$ ) и превалировало сочетанное повышение IL33 с другими цитокинами (IL17A, IL17F, IL21, IL31) (соответственно в 57,1 и 6,9% случаев;  $p = 0,008$ ). При реактивации герпес-вирусной инфекции уровень IL1 $\beta$ , IL23 и IL33 был выше, чем без нее ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно). Высокие значения IL33 значимо чаще регистрировали в этой группе пациентов (77,7 и 33,3%;  $p = 0,008$ ). Обсуждается участие IL10, IL31, IL33 и других цитокинов в патогенезе ассоциированного с вирусами герпеса РС.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, герпес, цитокины, интерлейкин 10, интерлейкин 31, интерлейкин 33

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

**Вклад авторов:** Н. С. Баранова, М. С. Грись — планирование, дизайн исследования, анализ данных, подготовка рукописи; М. С. Грись, А. С. Артюхов, К. М. Шакирова — сбор данных, проведение исследования; А. А. Баранов — анализ данных; все авторы — редактирование рукописи.

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

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

**Статья получена:** 24.07.2023 **Статья принята к печати:** 20.08.2023 **Опубликована онлайн:** 31.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.032

## CLINICAL SIGNIFICANCE OF CYTOKINE COUNTING IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS AND ITS RELATIONSHIP WITH HERPES INFECTION

Baranova NS<sup>1</sup>✉, Gris MS<sup>1</sup>, Baranov AA<sup>1</sup>, Spirin NN<sup>1</sup>, Artyukhov AS<sup>2</sup>, Shakirova KM<sup>2</sup>, Nasonov EL<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Nasonov Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

There are persistent infections that contribute to the emergence and development of multiple sclerosis (MS) exacerbations; they are triggered by the Epstein–Barr, herpes type 6, herpes simplex types 1 and 2, varicella-zoster viruses. Cytokines are crucial to arresting the spread of a herpes infection in a body. If their production is out of balance, MS can progress faster. This study aimed at determining the level of cytokines in the blood serum of MS patients, assessing their clinical significance and how they affect reactivation of herpes infection. We examined 36 patients (12 male and 24 female) with confirmed MS (McDonald criteria) in remission. In 18 of them, we diagnosed reactivation of peripheral herpes virus. Serum levels of 15 cytokines (IL1 $\beta$ , IL4, IL6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL10, IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL23, IL25, IL31, IL33, sCD40L) were determined with the help of xMAP multiplexing. Compared to the control group, MS patients had increased levels of IL10, IL33 ( $p < 0.001$ ), with high IL33 identified most often (20 patients; 52.8%). During exacerbations, the average level of IL10 grew up ( $p < 0.01$ ), as did that of IL31, the high levels of which were detected significantly more often (42.8 and 6.9%, respectively;  $p = 0.04$ ). In addition, a prevailing scenario was the increased levels of IL33 and other cytokines (IL17A, IL17F, IL21, IL31) (57.1 and 6.9% of cases, respectively;  $p = 0.008$ ). Reactivation of herpes translated into higher levels of IL1 $\beta$ , IL23 and IL33 compared to cases without reactivation ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). High levels of IL33 were significantly more frequently recorded in this group of patients (77.7 and 33.3%;  $p = 0.008$ ). We discuss involvement of IL10, IL31, IL33 and other cytokines in the pathogenesis of herpes-associated MS.

**Keywords:** multiple sclerosis, herpes, cytokines, interleukin 10, interleukin 31, interleukin 33

**Funding:** the work was supported by the Innovations Assistance Fund within the framework of the UMNIC program: Participant of the youth scientific and innovative competition (contracts № 3560GU1/2014 of 23.09.2014, № 8815GU2/2015 of 17.12.2015).

**Author contribution:** NS Baranova, MC Gris — study planning and design, data analysis, manuscript authoring; MC Gris, AS Artyukhov, KM Shakirova — data collection and research; AA Baranov — data analysis; all authors — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Yaroslavl State Medical University (Minutes № 1 of October 1, 2013). All patients signed a voluntary informed consent.

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

**Received:** 24.07.2023 **Accepted:** 20.08.2023 **Published online:** 31.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.032

Рассеянный склероз (РС) — хроническое заболевание центральной нервной системы с аутоиммунно-воспалительными и нейродегенеративными механизмами развития [1]. В иммунопатогенезе болезни большое значение имеют процессы, связанные с проникновением через гематоэнцефалический барьер в ткань мозга активированных Т-клеток (Т-хелперы 1-го типа (Th1), Th17-клетки) и макрофагов, местной активацией астроцитов и микроглии, выработкой ими противовоспалительных цитокинов [2, 3], которые приводят к демиелинизации и дегенерации нейронов. Этиология РС остается неизвестной. Полагают, что в его развитии, кроме генетических факторов, принимают участие различные персистирующие инфекции [4]. Вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ1 и ВПГ2) [5], варицелла-зостер-вирусу (ВЗВ) [6], вирусу герпеса человека 6-го типа (ВГЧ6) [7] и вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ) отводится основная роль в возникновении РС, развитии обострений и прогрессировании патологического процесса [8–11].

Известно, что выработка цитокинов клетками врожденного иммунитета имеет ключевое значение в ограничении распространения герпетической инфекции в организме человека [11, 12]. При РС в качестве основного фактора развития его обострений и прогрессирования иммуновоспалительного процесса рассматривают также дисбаланс продукции про- и противовоспалительных цитокинов. Наиболее хорошо изучены интерлейкины (IL) IL1- $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, IL23, фактор некроза опухоли — (ФНО- $\alpha$ ) и интерферон- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ) с применением как стандартных, так и мультиплексных технологий [2, 3, 13–15]. Значение других цитокинов, в частности IL31 и IL33, в патогенезе РС изучено недостаточно и представлено только данными из зарубежных источников [16–21]. Кроме того, как в России, так и за рубежом не проводили определение цитокинов в сыворотке крови при реактивации герпетической инфекции у пациентов РС и оценку их клинического значения. Отсутствие в доступной литературе данных по этим вопросам послужило

основанием для настоящего исследования. Цель работы — определение уровня цитокинов в сыворотке крови у пациентов с РС, оценка их клинического значения и взаимосвязи с реактивацией герпетической инфекции.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе Научно-образовательного центра демиелинизирующих заболеваний ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России и Центра рассеянного склероза в ГБУЗ ЯО «Клиническая больница № 2» г. Ярославля (Россия).

В исследование было включено 36 пациентов (12 мужчин и 24 женщины) с достоверным диагнозом РС по критериям McDonald [22] (табл.1). Средний возраст пациентов на момент исследования составил 38,5 (28,0; 48,5) года, возраст дебюта — 27,00 (21,5; 38,0) лет и длительность заболевания — 9,50 (3,5; 12,5) года. У всех пациентов было ремитирующее течение РС (PPC), 29 (80,6%) человек находились в стадии ремиссии, у 7 (19,4%) имело место обострение заболевания.

У 30 (83,3%) пациентов проводили терапию препаратами, изменяющими течение рассеянного склероза (ПИТРС) (у 14 пациентов — глатирамера ацетатом (ГА), у 16 — высокодозными интерферонами (ИНФ)), длительность лечения составила в среднем 30,0 (9,0; 67,0) месяцев. Шесть (16,7%) человек на момент осмотра были без терапии ПИТРС.

Клиническую оценку неврологического статуса проводили с использованием двойной оценочной системы J. F. Kurtzke [23]: шкалы неврологического дефицита (FSS) и расширенной шкалы инвалидности (EDSS). Средний балл по шкале EDSS составил 3,25 (2,00; 4,50), а сумма неврологического дефицита — 6,50 (3,00; 9,00) балла. В соответствии с классификацией F. Lublin [24] пациенты PPC были разделены на группы с активным РС — 17 (47,2%) и неактивным РС — 19 человек (52,8%). Среди пациентов с активным РС дополнительно выделялись пациенты с высоко активным РС (шесть человек (35,3%), имеющие два и более обострений в год.

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

Признак	Значение
Пол, м/ж, $n$ (%)	12/24 (33,3/66,7)
Возраст (годы)	38,50 (28,0; 48,5)
Возраст дебюта (годы)	27,00 (21,5; 38,0)
Длительность заболевания (лет)	9,50 (3,5; 12,5)
MPT+ обострения (активность при PPC), $n$ (%)	17 (47,2)
Высокоактивный, $n$ (%)	6 (35,3)
Наличие обострения, $n$ (%)	7/29 (19,4/80,6)
EDSS на момент осмотра (баллы)	3,25 (2,00; 4,50)
Общее число обострений	4,00 (3,00; 6,00)
Среднегодовая частота обострений	0,58 (0,33; 1,00)
Скорость прогрессирования (балл/год)	0,40 (0,21; 0,75)
Продолжительность 1-й ремиссии (месяцы)	12,00 (6,00; 24,00)
Индекс прогрессирования	0,78 (0,35; 1,50)
Сроки достижения инвалидизации EDSS=3 (лет)	2,25 (0,00; 7,00)
Выраженность гриппоподобного синдрома (баллы)	6,00 (2,00; 11,00)
Сумма неврологического дефицита по шкале FS (баллы)	6,50 (3,00; 9,00)
Проходили терапию ПИТРС на момент исследования, $n$ (%)	30 (83,3)
Длительность терапии ПИТРС (месяцы)	30,00 (9,00; 67,00)
ПИТРС ( $n = 30$ ): ИНФ/ГА, $n$ (%)	16/14 (53,3/46,7)



Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов с РС с клиническими проявлениями реактивации ПГВИ и без таковых (Ме (25-й, 75-й перцентили))

Признак	РС с клиническими проявлениями ПГВИ (n = 18)	РС без клинических проявлений ПГВИ (n = 18)
Пол, мужчины, n (%)	4 (22,2)	8 (44,4)
Женщины, n (%)	14 (77,8)	10 (55,6)
Возраст на момент осмотра (годы)	36,50 (28,00; 43,00)	39,00 (28,00; 57,00)
Возраст дебюта (годы)	24,00* (19,00; 30,00)	33,00 (23,00; 41,00)
Длительность заболевания (лет)	8,50 (3,00; 20,00)	10,50 (4,00; 12,00)
МРТ + обострение (активность при РС), n (%)	8 (44,4)	9 (50,0)
Высокоактивный, n (%)	3 (16,7)	3 (16,7)
Наличие обострений, n (%)	5 (27,8)	2 (11,1)
Число обострений	4,50 (3,00; 6,00)	4,00 (3,00; 5,00)
Среднегодовая частота обострений	0,67 (0,32; 1,00)	0,42 (0,33; 1,00)
EDSS на момент осмотра (баллы)	3,25 (2,00; 4,00)	3,25 (2,00; 4,50)
Скорость прогрессирования (балл/год)	0,44 (0,19; 0,75)	0,40 (0,23; 0,65)
Продолжительность 1-й ремиссии (месяцы)	12,50 (8,00; 36,00)	12,00 (6,00; 20,00)
СННД (баллы)	0,65 (0,25; 1,50)	0,91 (0,36; 1,50)
Сроки достижения инвалидизации EDSS=3 (лет)	3,00 (0,00; 8,00)	1,00 (0,00; 7,00)
СНД Куртцке (баллы)	6,50 (3,00; 9,00)	6,50 (4,00; 8,00)
Получали ПИТРС на момент исследования, n (%)	16 (88,9)	14 (77,8)
Длительность ПИТРС (месяцы)	29,50 (5,00; 69,00)	34,50 (14,00; 63,00)
ПИТРС: ИНФ, n (%)	10 (62,5)	6 (42,9)
ПИТРС: ГА, n (%)	6 (37,5)	8 (57,1)
Гриппоподобный синдром на ПИТРС (баллы)	8,00 (1,00; 12,00)	5,00 (2,00; 6,00)
Наличие серологических маркеров перенесенной инфекции ВПГ1 и ВПГ2, ВЗВ, n (%)	18 (100)	18 (100)
Наличие серологических маркеров перенесенной инфекции ВЭБ, n (%)	18 (100)	18 (100)
Наличие серологических маркеров перенесенной инфекции ЦМВ, n (%)	14 (77,8)	17 (94,4)
Наличие серологических маркеров перенесенной микст-инфекции двумя вирусами ВПГ1, ВПГ2/ВЗВ и ВЭБ, n (%)	3 (16,7)	0
Наличие серологических маркеров перенесенной микст-инфекции тремя вирусами ВПГ1, ВПГ2/ВЗВ, ВЭБ или ЦМВ, n (%)	4 (22,2)	8 (44,4)
Наличие серологических маркеров перенесенной микст-инфекции четырьмя вирусами ВПГ1, ВПГ2, ВЗВ, ВЭБ, ЦМВ, n (%)	11 (61,1)	10 (55,6)

Примечание: \* —  $p < 0,05$  между группами.

Учитывали также основные показатели течения заболевания: первые симптомы, длительность первой ремиссии, возраст больного к периоду начала болезни, сумму баллов неврологического дефицита по шкале Куртцке (СНД), количество и тяжесть обострений. Обострения РС классифицировали как легкие при увеличении неврологического дефицита по шкале EDSS на 0,5–1 балл; средние — на 1–2 балла; тяжелые — более чем на 2 балла [25]. Среднегодовая частота обострений была равна отношению количества обострений заболевания к длительности этого периода, выраженного в годах. Скорость прогрессирования болезни рассчитывали как отношение степени инвалидизации (EDSS) в баллах к длительности болезни в годах (балл/год).

Индекс прогрессирования, отражающий скорость нарастания неврологического дефицита (СННД), рассчитывали как отношение показателя FSS (СНД) к длительности заболевания, выраженной в годах. Для оценки прогноза РС вычисляли временной интервал до наступления стойкой инвалидности (оценка по шкале EDSS = 3 балла), продолжительность первой ремиссии, время до наступления вторичного прогрессирования.

В анамнезе заболевания особое внимание уделяли перенесенным герпесвирусным заболеваниям. С целью

уточнения факторов риска развития и обострений РС был разработан специальный опросник (наличие/отсутствие частых обострений лабиального и генитального герпеса, наличие вирус-ассоциированных обострений РС, наличие хронического стресса, субфебрилитета, хронических очагов инфекции, частых респираторных вирусных заболеваний и их связь с обострениями РС), производили также осмотр на наличие герпетических высыпаний.

На основании полученных данных пациенты были разделены на две группы. В первую вошли пациенты с достоверным РС и реактивацией периферической герпес-вирусной инфекции (ПГВИ) (вирус-ассоциированная форма РС) — 18 (50%) человек. Критерии включения: достоверный РС в сочетании с признаками ПГВИ — наличие одновременно клинических (типичные везикулезные высыпания, субфебрилитет, лимфаденопатия, артралгии, миалгии и др.) и серологических признаков активной герпесвирусной инфекции; наличие только клинических признаков герпесвирусной инфекции на момент обострения или в интервале двух недель до и после него. Серологические признаки: низкий индекс avidности типоспецифичных антител IgG (менее 50%) и повышение коэффициента позитивности (КП) IgG в три и более раза или появление в крови специфичных IgM-антител. Вторую

Таблица 3. Концентрация (Ме (25-й, 75-й перцентили)) цитокинов в сыворотке крови пациентов с РС и доноров

Показатель (пг/мл)	Контроль (n = 18)	Пациенты РС (n = 36)	РС обострение (n = 7)	РС без обострения (n = 29)
IL1 $\beta$	1,45 (0,16; 2,18)	0,04 (0,00; 0,08)*	0,06 (0,00; 0,12)	0,04 (0,00; 0,05)
IL4	0,01 (0,73; 3,24)	4,43 (2,22; 10,95)	12,33 (2,89; 16,36)	5,51 (2,22; 5,75)
IL6	1,36 (0,27; 3,68)	0,59 (0,30; 1,07)	0,81 (0,15; 1,48)	0,59 (0,30; 0,96)
IL10	0,01 (0,00; 0,01)	2,03 (0,90; 2,73)*	3,67 (1,80; 5,25) <sup>o</sup>	1,80 (0,90; 2,73)
IL17A	0,58 (0,00; 1,74)	0,57 (0,28; 0,89)	0,92 (0,42; 1,56)	0,57 (0,28; 0,78)
IL17 F	6,76 (4,02; 10,6)	0,01 (0,00; 0,78)*	0,01 (0,01; 5,10)	0,01 (0,01; 0,62)
IL21	0,01 (0,00; 0,49)	0,01 (0,00; 0,01)	0,01 (0,00; 0,01)	0,01 (0,00; 0,01)
IL22	47,43 (38,42; 72,64)	0,01 (0,00; 0,32)*	0,63 (0,00; 2,21)	0,01 (0,00; 0,32)
IL23	80,11 (0,00; 114,44)	2,94 (0,00; 8,81)	10,26 (0,00; 19,74)	2,94 (0,00; 7,34)
IL25	13,73 (6,1; 28,99)	0,11 (0,00; 0,32)*	0,32 (0,11; 0,84)	0,11 (0,00; 0,32)
IL31	6,28 (2,87; 8,62)	6,33 (3,85; 10,37)	8,81 (6,33; 15,73)	6,33 (3,00; 9,43)
IL33	0,52 (0,17; 0,78)	4,32 (1,40; 7,49)*	6,67 (2,79; 11,60)	4,18 (1,12; 6,67)
ИНФ- $\gamma$	0,45 (0,00; 5,33)	0,49 (0,49; 1,36)	0,49 (0,49; 1,48)	0,49 (0,49; 0,99)
ФНО- $\alpha$	17,38 (13,65; 31,61)	0,53 (0,45; 1,04)*	1,01 (0,49; 1,39)	0,51 (0,44; 0,68)
sCD40L	110,81 (83,58; 122,55)	76,77 (36,82; 115,04)	115,00 (69,49; 158,01)	69,02 (34,36; 110,35)

Примечание: \* —  $p < 0,001$  по сравнению с контролем, <sup>o</sup> —  $p < 0,01$  по сравнению с группой РС без обострения.

группу составили 18 (50%) пациентов с достоверным РС без признаков реактивации ПГВИ по данным клиники, анамнеза и результатов серологических исследований. В табл. 2 представлена клиническая характеристика данных групп.

При реактивации ПГВИ заболевание дебютировало достоверно в более раннем возрасте ( $p < 0,05$ ), преимущественно у женщин, с меньшей длительностью болезни. Был отмечен более выраженный гриппоподобный синдром на терапию ПИТРС, а обострения заболевания возникали практически в два раза чаще (в 27,8%), чем в сравниваемой группе (11,1%). Не выявлено различий между данными группами пациентов по другим признакам, включая возраст на момент осмотра, активность заболевания, степень инвалидизации, наличие терапии ПИТРС. В обеих группах в большинстве случаев имела место герпесвирусная микст-инфекция, но только у пациентов с ПГВИ выявлено наличие серологических маркеров двух инфекций (ВПГ1, ВПГ2/ВЗВ и ВЭБ).

В качестве контроля обследовано 18 практически здоровых доноров без клинико-анамнестических и серологических признаков ПГВИ. В нее вошли лица без хронических неврологических заболеваний и соматической патологии в стадии обострения. Всем проводили стандартный неврологический осмотр и тщательный сбор анамнеза с целью исключения заболеваний, способных повлиять на результаты обследования. Группа была сопоставима по полу — семь (38,9%) мужчин и 11 (61,1%) женщин; возрасту — 39,10 (29,00; 49,60) лет с группой пациентов РС.

Всем пациентам РС и группе контроля было проведено исследование сыворотки крови для определения уровня типоспецифических антител IgM и IgG к ВПГ 1-го и 2-го типов, IgM и IgG к ВВЗ, IgM и IgG к капсидному антигену VCA ВЭБ, IgG к ранним антигенам EA и ядерному антигену NA ВЭБ, IgM и IgG к ЦМВ с помощью иммуноферментного метода (ИФМ) с использованием стандартных наборов («Вектор-Бест»; Россия) в клинико-диагностической лаборатории ООО «Сеть» (г. Ярославль) в соответствии с инструкцией производителя. При определении антител к ВПГ 1-го и 2-го типов, ВВЗ, ВЭБ и IgM к ЦМВ

референтными значениями считали КП более 1 ЕД/мл, при определении IgG к ЦМВ — 0,25 РЕ/мл. Положительным результатом считали превышение КП специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) в 3 и более раза, низкий индекс avidности IgG (менее 50%) или появление в крови специфических иммуноглобулинов класса M (IgM) в сочетании с клиническими данными активация латентной герпетической инфекции.

Концентрацию 15 цитокинов в сыворотке крови (IL1 $\beta$ , IL4, IL6, IL10, IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL23, IL25, IL31, IL33, ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , sCD40L) определяли с помощью мультиплексной технологии xMAP на анализаторе Bio-Plex™ 200 System (Bio-Rad; США) с использованием реагентов производителя в лаборатории НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова МЗ России. Анализировали как средний уровень каждого цитокина, так и частоту его повышения (превышение верхней границы нормы  $M+3\sigma$  в группе контроля).

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Результаты исследования цитокинов в общей группе пациентов с РС, при обострении и ремиссии заболевания

У пациентов с РС не отмечено различий в среднем уровне цитокинов между мужчинами и женщинами.

**Таблица 4.** Концентрация (Ме (25-й, 75-й перцентили) цитокинов в сыворотке крови пациентов с РС с клиническими проявлениями реактивации ПГВИ и без таковых

Показатель (пг/мл)	РС с клиническими проявлениями ПГВИ ( <i>n</i> = 18)	РС без клинических проявлений ПГВИ ( <i>n</i> = 18)
IL1 $\beta$	0,05 (0,01; 0,08) *	0,01 (0,00; 0,05)
IL4	4,88 (2,35; 0,05)	2,66 (1,75; 6,04)
IL6	0,78 (0,30; 1,55)	0,44 (0,30; 0,74)
IL10	2,73 (1,80; 2,73)	1,50 (0,60; 2,26)
IL17A	0,75 (0,42; 0,99)	0,50 (0,14; 0,57)
IL17 F	0,16 (0,00; 0,93)	0,01 (0,00; 0,01)
IL21	0,01 (0,00; 2,37)	0,01 (0,00; 0,01)
IL22	0,32 (0,00; 0,63)	0,01 (0,00; 0,32)
IL23	8,80 (0,00; 11,72)*	1,10 (0,00; 5,87)
IL25	0,27 (0,11; 0,53)	0,11 (0,00; 0,21)
IL31	6,95 (5,09; 9,43)	6,33 (3,00; 13,78)
IL33	6,26 (3,63; 9,96) **	2,37 (1,12; 5,02)
ИНФ- $\gamma$	0,74 (0,49; 1,48)	0,49 (0,49; 0,99)
ФНО- $\alpha$	0,56 (0,44; 1,06)	0,52 (0,45; 0,74)
sCD40L	76,77 (34,36; 110,35)	74,66 (39,5; 127,72)

Примечание: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  между группами.

Обнаружены значимые положительные связи между возрастом пациентов на момент осмотра и концентрацией IL6 ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ), ФНО- $\alpha$  ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,05$ ) и sCD40L ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ), длительность болезни не коррелировала с уровнем ни одного цитокина.

В общей группе пациентов с РС, в сравнении с контролем, выявлено достоверное увеличение средних значений IL10 и IL33 ( $p < 0,001$ ) и тенденция к повышению IL4 ( $p > 0,05$ ) (табл. 3). Концентрации IL1- $\beta$ , IL17F, IL22, IL25 и ФНО- $\alpha$  при РС были достоверно ниже ( $p < 0,001$ ), чем у доноров, а снижение IL23 не достигало значимых различий ( $p > 0,05$ ). Уровни IL6, IL17A, IL21, IL31, ИНФ- $\gamma$  и sCD40L не различались в сравниваемых группах.

Среди всех изучаемых цитокинов наиболее часто наблюдали гиперпродукцию IL33 — у 20 (52,8%) пациентов. Значительно реже регистрировали высокие значения IL17A, IL17F, IL21, IL31 (соответственно в 2,8, 5,6, 5,6 и 13,8% случаев). Уровень других цитокинов ни в одном случае не превышал верхнюю границу нормы. Повышение IL17A, IL17F, IL21 всегда сочеталось с увеличением IL33. Гиперпродукция IL31 только у одного из пяти пациентов носила изолированный характер, а у остальных происходила совместно с IL33. Напротив, у большинства (14 (70%) из 20 пациентов) имело место изолированное увеличение концентрации IL33, а у шести пациентов вместе с другими цитокинами наиболее часто (четыре случая) с IL31. Высокие значения IL33 достоверно ассоциировались с повышением концентрации IL17A ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,05$ ), IL17F ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,05$ ), IL21 ( $r = 0,54$ ;  $p < 0,001$ ) и IL31 ( $r = 0,68$ ;  $p < 0,001$ ).

При обострении РС средний уровень IL10 был достоверно выше, чем без него ( $p < 0,01$ ). В эту фазу болезни отмечена также тенденция к увеличению IL4, IL23, IL31, IL33 и sCD40L ( $p > 0,05$ ). Средние значения IL1 $\beta$ , IL6, IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL25, ФНО $\alpha$  и ИНФ- $\gamma$  не различались между сравниваемыми группами.

Высокие значения IL31 регистрировали достоверно чаще при обострении (соответственно в 42,8% и 6,9% случаев;  $p = 0,04$ ), преобладала и продукция IL33 (71,4 и 51,7%;  $p > 0,05$ ). При этом превалировало сочетанное

повышение уровня IL33 с другими цитокинами (IL17A, IL17F, IL21, IL31) (соответственно в 57,1 и 6,9% случаев;  $p = 0,008$ ). Выявлены положительные ассоциации между обострением заболевания и высокими значениями IL17A ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ), IL17F ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ) и IL31 ( $r = 0,41$ ;  $p < 0,01$ ). Сочетанная гиперпродукция IL33 также достоверно коррелировала с обострением болезни ( $r = 0,53$ ;  $p = 0,001$ ).

#### Результаты исследования цитокинов у пациентов с РС в зависимости от клинических проявлений реактивации ПГВИ

У пациентов с РС с клиническими проявлениями ПГВИ средний уровень IL1 $\beta$ , IL23 и IL33 был достоверно выше, чем без ПГВИ ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно, отмечена также тенденция к увеличению средних значений IL4 ( $p > 0,05$ ; табл. 4). Не выявлено различий в сравниваемых группах концентраций IL6, IL10, IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL25, IL31, ИНФ- $\gamma$ , ФНО $\alpha$  и sCD40L.

Повышение IL31 одинаково часто происходило в обеих группах пациентов (16,7 и 11,1%;  $p > 0,05$ ). Напротив, высокие значения IL33 достоверно чаще (77,7%) регистрировали при реактивации ПГВИ, чем без таковой (33,3%;  $p = 0,008$ ). Клинические проявления ПГВИ несколько чаще выявлялись при сочетанном, чем при изолированном, повышении IL33 (соответственно в 83,3 и 64,3% случаев), а при его нормальной концентрации их частота составила только 25,0% ( $p = 0,02$ ). Гиперпродукция IL33 достоверно ассоциировалась с реактивацией ПГВИ ( $r = 0,45$ ;  $p = 0,006$ ), подобной закономерности не выявлено для IL17A, IL17F, IL21 и IL31 (соответственно  $r = 0,17$ ,  $r = 0,17$ ,  $r = 0,24$  и  $r = 0,08$ ;  $p > 0,05$  во всех случаях).

Изолированное или сочетанное повышение IL33 достоверно ассоциировалось с частыми (более одного раза в год) проявлениями Herpes labialis ( $r = 0,42$  и  $r = 0,38$ ,  $p < 0,01$  в обоих случаях), а одновременное увеличение IL33 с другими цитокинами — с повторными эпизодами опоясывающего герпеса во взрослом возрасте ( $r = 0,55$ ;  $p < 0,001$ ).

Значения АТ к капсидному белку ВЭБ IgG достоверно положительно коррелировали только с концентрацией IL1 $\beta$  ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ). Взаимосвязей между уровнем других цитокинов и лабораторными маркерами герпетической инфекции выявлено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клиническое значение определения цитокинов при РС неоднозначно. В ряде работ отмечено влияние на их уровень гендерных различий: обнаружено повышение IL31 и sCD40L у мужчин с РС [26] и увеличение IL33 у женщин [18]. По данным других исследователей, концентрация IL33 в сыворотке не зависит от пола и возраста пациентов с РС [27], или его повышение наблюдается преимущественно у пожилых пациентов [28]. Отмечено увеличение IL31 и sCD40L в ранние (до 5 лет) сроки болезни [19]. Подобную закономерность выявили и другие авторы [21]. Они установили достоверные отрицательные корреляции между длительностью заболевания и значениями IL1 $\beta$ , IL17, IL21, IL23, IL31 и IL33. В нашем исследовании не выявлено различий в концентрациях цитокинов между мужчинами и женщинами, также не обнаружено связи с длительностью болезни, возраст пациентов положительно коррелировал только со значениями IL6, ФНО $\alpha$  и sCD40L.

У наших пациентов, по сравнению с контролем, наблюдалось значимое повышение концентраций IL10, IL33 и тенденция увеличения уровня IL4, при одновременном снижении IL1- $\beta$ , IL17F, IL22, IL25 и ФНО- $\alpha$ . Эти результаты в определенной мере согласуются с данными других авторов. Так, при исследовании с помощью мультиплексного анализа 15-ти цитокинов у пациентов с РС, по сравнению с донорами, было выявлено повышение в плазме крови концентраций IL4, IL33, sCD40L и снижении ФНО- $\alpha$ , а в спинномозговой жидкости отмечены высокие значения IL1 $\beta$ , IL10, IL33 и низкий уровень sCD40L [17].

Низкий уровень провоспалительных цитокинов у пациентов с РС связывают с влиянием терапии ПИТРС [26, 29]. Большинство наших пациентов (83,3%) тоже находилось на терапии ПИТРС. Однако есть исследование, в котором все пациенты с PPC на момент обследования не получали данные препараты [17]. Кроме того, авторы другой работы зарегистрировали у 32 пациентов PPC высокую концентрацию IL33 до начала терапии ГК или ПИТРС [16]. При исследовании с помощью мультиплексного анализа концентрации 41-го цитокина у 56 наивных пациентов РС было обнаружено снижение, по сравнению со здоровыми донорами, значений IL2, IL4, IL7, IL8, IL17A, ФНО- $\alpha$  и sCD40L [15].

Во время обострения РС, как правило, повышены уровни IL1 $\beta$ , IL2, IL6, IL17, IL23, ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$  и снижены IL4 и IL10 [2, 3, 30]. Однако, по некоторым данным, в эту фазу болезни имело место снижение IL17, а уровень ФНО- $\alpha$  и IL10 не отличался от контроля [31], а у пациентов с PPC в период ремиссии обнаружено достоверное снижение концентрации IL10 [32]. У наших пациентов при обострении концентрация IL10 значимо выше, чем в ремиссию, наблюдались также гиперпродукция IL31 и повышение уровня IL33 вместе с уровнем других (IL17A, IL17F, IL21, IL31) цитокинов.

Одной из основных задач настоящего исследования была оценка влияния герпетической инфекции на уровень цитокинов у пациентов с РС. В доступной нам литературе не найдены исследования взаимосвязи их продукции с реактивацией герпес-вирусной инфекции.

При РС наибольшие доказательства участия в качестве этиологического фактора получены для  $\gamma$ -герпесвирусов, в частности ВЭБ [10, 33] и ВГЧ-6 [7], которые вызывают хроническую латентную инфекцию в В-клетках и Т-клетках [12]. Инфицирование этими вирусами пациентов подросткового возраста, имеющих генетическую предрасположенность, приводит к развитию РС [11, 12, 33]. Рецидивы РС, возможно, связаны с дефектным контролем реактивации ВЭБ со стороны CD8 $^+$ -Т-клеток [34]. Напротив,  $\beta$ -герпесвирусная инфекция ЦМВ может играть защитную роль при РС и снижает риск его возникновения [35].

Однако  $\alpha$ -герпесвирусы (ВПГ 1- и 2-го типа и ВЗВ) тоже участвуют в патогенезе РС. Вирусы данной группы способны к длительной персистенции в нейронах, периодической реактивации и литической репликации, что сопровождается развитием рецидивов с коротким репродуктивным циклом и быстрым разрушением инфицированных клеток-хозяев [36]. В исследовании «случай–контроль» ДНК ВПГ-1 в моноцитах периферической крови была обнаружена у 45,1% пациентов с PPC и только у 3,4% здоровых людей [37]. ВПГ-1 чаще обнаруживают в ткани мозга пациентов с РС, чем у здоровых [38].

У пациентов с РС отмечается преобладание герпесвирусной микст-инфекции над моноинфекцией. Наиболее распространено сочетание четырех герпесвирусов: ВПГ-1 и -2 + ВЗВ + ВЭБ + ЦМВ [39]. Во время развития клинических обострений PPC обнаружена реактивация ВПГ-1 в моноцитах периферической крови [40]. Серопозитивность по ВПГ-1 связана с повышенным риском развития РС у лиц, не имеющих аллеля DRB1\*15 [41]. Эти данные подтверждают возможное участие ВПГ-1 и ВПГ-2 и ВЗВ в развитии РС и его обострений у пациентов с определенной генетической предрасположенностью.

При анализе клинических признаков группы пациентов с реактивацией ПГВИ нами был выявлен ряд характерных для нее особенностей, который заключался в более раннем возрасте дебюта заболевания и наличии частых обострений. Это согласуется с данными других исследователей [42] и результатами, опубликованными нами ранее [39]. У наших пациентов с PPC с клиническими проявлениями ПГВИ были достоверно выше средние значения IL1 $\beta$ , IL23 и IL33, а также преобладала продукция IL4. При этом повышение IL1 $\beta$  и IL23 не обнаружено в других группах пациентов. При ПГВИ значимо чаще встречались высокие значения IL33, как изолированно, так и в сочетании с IL17A, IL17F, IL21 или IL31. Высокие значения IL33 достоверно ассоциировались с клиническими проявлениями рецидивов инфекции, характерными для группы  $\alpha$ -герпесвирусов ВПГ-1 и ПВПГ-2 и ВЗВ.

Полученные нами результаты позволяют обсуждать особое участие цитокинов в патогенезе РС, ассоциированного с вирусом герпеса, что очевидно связано с реализацией их биологических функций. Так, IL10 обладает мощным противовоспалительным эффектом, влияет на врожденный и на приобретенный иммунный ответ. Под его воздействием происходит снижение выработки IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL12, IL23 и ФНО- $\alpha$ , который тоже обладает нейропротективным действием [43]. Традиционно повышение концентрации IL10 при РС связывают с развитием ремиссии заболевания, на фоне подавления продукции IL17, IL23 и IL25 [2]. По нашим данным, при обострении PPC одновременно можно наблюдать увеличение IL10 и провоспалительных цитокинов.



Эти отличия могут быть обусловлены использованием нами для определения цитокинов технологии мультиплексного анализа, которая в отличие от наиболее распространенных униплексных методик, применяемых ранее, позволяет одновременно определять комплекс молекул, а не отдельные показатели. Например, при использовании техники мультиплексного анализа у пациентов РС в стадии ремиссии обнаружено как увеличение IL10, так и повышение IL17 и IL23 [21].

В то же время избыточный синтез IL10 можно наблюдать при вирусных инфекциях, что имеет особое значение при РС. В активную фазу воспаления его выработка направлена на ограничение нежелательных для организма последствий, возникающих при чрезмерной активации механизмов врожденного иммунитета в ответ на патоген [44]. Тем не менее, в процессе эволюции вирусы разработали механизмы, использующие иммунорегуляторную функцию IL10 для уклонения от иммунной системы хозяина и способствующие их собственному выживанию. В активную фазу воспаления противовирусные CD4- и CD8-Т-клетки становятся основными источниками IL10 [45], который, подавляя функцию Th1-клеток, уменьшает их способность к представлению антигена. Повышенный синтез IL10 в условиях длительного воздействия антигена может истощить резервы противовирусных Т-клеток и переключить их фенотип в преимущественно IL10-продуцирующие клетки, которые неспособны активироваться при повторном представлении антигена [44].

Кроме того, ВЭБ кодирует синтез белка, который является гомологом человеческого IL10 (вирусный гомолог IL10 (vбIL10)), а также синтез клетками обычного IL10 (кIL10) [46]. ВЭБ IL10, белок поздней литической фазы, кодируемый геном BCRF-1, примерно на 80% гомологичен человеческому IL10. Гомологи IL10 позволяют вирусу ускользнуть или ограничить противовирусный ответ хозяина. ВЭБIL10 индуцирует значительно более низкое, чем IL10, фосфорилирование STAT3 в моноцитах периферической крови и менее эффективен в подавлении воспалительных генов [47]. Он снижает экспрессию CD163 на моноцитах, что сопровождается ингибированием их поляризации в M2-клетки, обладающие противовоспалительной активностью. Нарушается также участие моноцитов в процессе клиренса апоптотических клеток, накопление которых приводит к усилению вторичного некроза. Полагают, что IL10, синтезирующийся клетками при инфекции ВЭБ, и vбIL10 действуют одновременно и функционально скоординированным образом, помогая вирусу длительно находиться в В-лимфоцитах и нивелировать противовирусный потенциал Т-клеток [46]. ВЭБIL10 может активировать В-клетки [48]. Оба этих цитокина присутствуют в ЦНС и поддерживают резервуар латентно ВЭБ-инфицированных В-клеток, которые локально стимулируют патогенные Т-клетки. Учитывая наличие у всех пациентов РС серологических маркеров перенесенной инфекции ВЭБ, возможно, что эти механизмы вовлечены в продукцию IL10 и в нашем случае.

Известно, что IL17 является одним из ключевых цитокинов в патогенезе РС [2]. Он также играет важную роль в иммунном ответе на вирусные инфекции [12]. Стимуляция ВПГ Th17-клеток сопровождается выработкой ими IL17 [49]. Установлено, что экспрессия KIR2DL2-рецептора на NK-клетках у пациентов с РС делает их более восприимчивыми к инфекции ВПГ-1 [50]. При этом основное количество IL17A секретируется именно

KIR2DL2+NK-клетками [51]. В нашем исследовании при РС концентрации IL17A и IL17F не были повышены по сравнению с контролем, не различались между собой в фазу обострения или ремиссии заболевания, в группах пациентов с реактивацией ПГВИ и без таковой.

IL23 также участвует в патогенезе РС. Пациенты с РС имеют значительно более высокие значения IL23 в сыворотке крови по сравнению с донорами [52]. Кроме того, IL23 играет важную роль при инфекции ВПГ. Он индуцирует пролиферацию Т-клеток памяти [53] и может быть обнаружен уже на 3-й день заражения в нервных ганглиях мышей, инфицированных ВПГ [54]. IL23 стимулирует выработку IL17 NK-клетками, способствует привлечению нейтрофилов в очаг воспаления и локальному синтезу провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$ , IL6 и ФНО- $\alpha$ . Нами зарегистрировано достоверное, в отличие от IL17, повышение IL23 в группе пациентов с реактивацией герпетической инфекции.

IL31 является членом семейства IL6, его синтез осуществляют преимущественно Th2-клетки и он зависит от IL4 [55, 56]. Действие IL31 опосредуется через гетеродимерный рецептор, состоящий из цепи IL31RA и  $\beta$ -цепи рецептора онкостатина М, и направлено на тучные клетки, которые присутствуют в периферических тканях, иннервируемых чувствительными нервными волокнами малого калибра, и в эндоневральном отделе периферических нервов, а также в мозговых оболочках и кровеносных сосудах головного мозга [57]. Экспрессия IL31RA выявлена на различных субпопуляциях лейкоцитов, эпителиальных, стромальных клетках, спинно-мозговых ганглиях, кератиноцитах и фибробластах [20, 58]. IL31 и его рецептор принимают важное участие в регуляции нейровоспаления. IL31 способствует ремоделированию тканей и воспалению за счет индукции синтеза IL6, хемокинов и матриксных металлопротеиназ [59, 60]. У пациентов с РС выявлены высокие, по сравнению с донорами, значения IL31 в сыворотке крови, которые снижались во время ремиссии заболевания [19, 52]. У наших пациентов гиперпродукция IL31 тоже происходила в фазу обострения заболевания, но не была связана с реактивацией ПГВИ.

IL33, член семейства IL1, которое включает IL1 $\beta$  и IL18, играет важную роль в иммунопатогенезе различных заболеваний, включая РС [55]. У пациентов с РС, по сравнению с контролем, обнаружено достоверное увеличение уровня IL33 в сыворотке крови [16, 18] и спинномозговой жидкости [17, 61]. Действие IL33 реализуется через связывание со своим рецептором — ST2, который представлен растворимой (pST2) и мембранно-связанной (ST2) формами. Первая является рецептором-приманкой, изолирует свободный IL33, что приводит к локальному ограничению активности для внеклеточного IL33 и позволяет избежать нежелательных последствий воспалительных реакций [62]. IL33 оказывает влияние на разные типы клеток, имеющих на своей поверхности ST2-рецепторы, такие как эозинофилы и базофилы, тучные клетки, Th1- и Th2-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, естественные киллеры (NK) и врожденные лимфоидные клетки типа 2 (ВЛК типа 2) [63]. Мембранно-связанная форма ST2 активирует сигнальный путь MyD88/NF- $\kappa$ B для усиления функций тучных клеток, Th2-клеток, регуляторных Т-клеток и ВЛК типа 2 [62].

Полагают, что важную роль в развитии РС играет полиморфизм генов IL33 и его рецептора ST2. По некоторым данным, однонуклеотидный полиморфизм

rs1929992 в гене IL33 связан с различными вариантами течения РС [64]. Другие авторы не выявили существенных различий, по сравнению с контролем, в частоте обнаружения трех однонуклеотидных полиморфизмов: IL4 (rs2070874), IL17A (rs2275913) и IL33 (rs7044343) у пациентов с РС [65]. Показано, что на фоне повышения уровня IL33 только генетический полиморфизм rs10204137 гена его рецептора ассоциирован с РС [66].

Несмотря на то что IL33 — один из наиболее изученных цитокинов при патологии нервной системы и РС, его участие в нейровоспалении и нейродегенерации неоднозначно. Экспрессию IL33 наблюдают не только на астроцитах и олигодендроцитах, но и на нейронах и клетках микроглии [67]. Его рецептор ST2 обнаруживают преимущественно на нейронах и олигодендроцитах. Наличие перекрестной экспрессии IL33 и ST2 на различных клетках ЦНС свидетельствует о сложных аутокринных и паракринных механизмах сигнализации IL33/ST2 в ЦНС в дополнение к его иммуномодулирующей роли при воспалении [67].

IL33 усиливает проникновение в ЦНС иммунных клеток из кровотока и активацию резидентных иммунных клеток [55]. IL33 оказывает прямое воздействие на олигодендроциты и активирует астроциты [67–69].

При РС периферические лейкоциты и астроциты являются важным источником повышенной продукции IL33, который активирует клетки микроглии [16, 70]. Высвобождаемый глиальными клетками IL33 активирует соседние клетки для производства воспалительных молекул, оказывающих неблагоприятное действие на нейроны [71, 72]. Фактор созревания глии также вызывает повышенную продукцию астроцитами IL33, который в свою очередь действует синергично с ним и способствует синтезу этими клетками ФНО- $\alpha$  [73]. Инкубация смешанных астроцитов и нейронов или только нейронов с IL33 приводит к уменьшению их количества, потере нейронами своих отростков, разрушению их сети и формированию невритоподобных внешних изменений клеток [73].

IL33 также принимает участие в повреждении и нарушении репарации миелина. В экспериментальных исследованиях, проводимых на кокультурах миелинизирующих клеток ЦНС крысы, показано, что IL33 не влияя на плотность аксонов, способен значительно подавлять их миелинизацию [67]. При РС уровни мРНК IL33 и самого IL33 резко повышены в очагах активных поражений [16]. В них также обнаружена усиленная локальная экспрессия ST2 в аксонах и в поврежденном миелине, в отличие от его диффузного распределения в нормальной коре головного мозга человека [67].

При этом обсуждаются и нейропротекторные эффекты IL33. Показано, что плазменные уровни IL33 повышены у пациентов с легкой формой PPC, а его концентрация в плазме крови отрицательно коррелирует с количеством T2-гиперинтенсивных поражений на МРТ [21]. Увеличение IL17A и IL33 в сыворотке крови пациентов с РС не связано с EDSS [65]. Известно, что макрофаги активно участвуют в воспалении при РС [74]. IL33 модулирует поляризацию микроглии в M2-фенотип и способствует нейропротекции [75].

Введение рекомбинантного IL33 мышам с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ) после начала заболевания переключает иммунный ответ с провоспалительного, опосредованного Th1 и Th17-клетками, на противовоспалительный Th2-зависимый. На фоне уменьшения выработки M2-поляризованными макрофагами IL17 и ИФН- $\gamma$  увеличивается продукция ими IL5 и IL13 [76]. При ЭАЭ высокие уровни циркулирующего IL33

рассматривают в качестве механизма самоограничения хронического воспаления. Недостаточные эффекты низкой концентрации IL33 могут быть компенсированы выработкой других цитокинов, таких как IL1. По-видимому, эти механизмы имеют универсальное значение и также важны для предотвращения развития генерализованного энцефалита на фоне герпетической инфекции, что подтверждается увеличением уровня IL1 $\beta$  и IL33 в группе пациентов РС с реактивацией ПГВИ.

Определенное значение имеют и гендерные различия. В экспериментах на мышах линии SJL (модели ЭАЭ) показано, что у самцов концентрация тестостерона увеличивается при иммунизации пептидом миелина (PLP139-151) и стимулирует выработку IL33 тучными клетками, несущими на своей поверхности андрогеновый рецептор [77]. IL33 активирует IL13-продуцирующие ВЛК типа 2, которые накапливаются в лимфатических узлах, мозговых оболочках и ЦНС и способствуют протективному Th2-зависимому ответу. У самцов IL33-чувствительные ST2+ тучные клетки и базофилы за счет выработки IL4 и IL13 усиливают поляризацию Th2-клеток.

В условиях низкого тестостерона тучные клетки самок экспрессируют вместо IL33 молекулы IL1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , а при его недостатке не происходит активация ВЛК типа 2. Известно, что ВЛК типа 2 способствуют восстановлению тканей, отличаются высокой экспрессией на своей мембране рецептора для IL33 и способностью вырабатывать IL4, IL5, IL9, IL13 [63, 78]. Без подавляющего влияния IL33 у самок преобладает энцефалитогенный Th17-зависимый иммунный ответ, который может быть ингибирован введением экзогенного IL33.

IL33 через активацию ВЛК-типа 2 контролирует накопление регуляторных Т-клеток в очагах воспаления, их эффекторные функции и поляризацию макрофагов [79]. IL33 стимулирует также регуляторные В-клетки, которые играют важную роль в поддержании периферической толерантности и подавлении воспалительных аутоиммунных реакций, а введение IL33 мышам увеличивает количество IL10-продуцирующих В-клеток [80, 81].

IL33 участвует во врожденном иммунном ответе на повреждение тканей, возникающем при инфекциях. При этом механизмы появления в циркуляции и функциональные свойства IL33 отличны от тех, которые характерны для IL1 $\beta$  и IL18 [79]. IL33 в основном высвобождается из клеток в виде биологически активной полноразмерной молекулы в процессе некроза или некроптоза, но не апоптоза клеток [82, 83]. Для формирования биологически активной формы IL33, в отличие от IL1 $\beta$  и IL18, не требуется предварительная обработка каспазой-1 и участия инфламмосомы. Напротив, его молекула может подвергаться расщеплению каспазами-3 и -7, связанными с апоптозом, что приводит к сокращению периода полураспада IL33 и снижению его биологической активности [84]. Инактивация IL33 через каспазы подавляет, не усиливает иммунный ответ. IL33 содержится также в ядре клеток в виде хроматин-ассоциированного фактора, который быстро высвобождается при их некрозе [85, 86]. Взаимодействуя непосредственно с NF- $\kappa$ B, ядерный IL33 изолирует его и предотвращает передачу сигнала, действуя как ядерный супрессор транскрипции, чем снижает провоспалительную активность клеток [87].

Другие ферменты, такие как нейтрофильные сериновые протеазы, катепсин G и эластаза, способны расщеплять IL33 и, в отличие от каспаз, в 10–30 раз увеличивают его биологическую активность, по сравнению

с полноразмерной формой [88, 89]. Специфические для тучных клеток химаза и триптаза генерируют форму IL33 с повышенной способностью активировать ВЛК типа 2 [90], которые в отличие от ВКЛ типа 1 и типа 3 не присутствуют в активных очагах поражения при РС [12], но участвуют в ВПГ-IL2-индуцированной демиелинизации ЦНС на мышинной модели РС [91].

При РС обнаружены явления некроптоза [92]. Так, в образцах тканей из корковых поражений на фоне дефекта активации каспазы-8 установлены характерные для него медиаторы RIPK1, RIPK3, MLKL. Механизмы некроптоза, индуцированные ФНО-а, приводят к дегенерации олигодендроцитов, а ингибирование рецептора протеинкиназы-1 (RIPK1) предотвращает их гибель [92].

Некроз и некроптоз клеток характерны и для инфекции, вызванной ВПГ [93]. Во время нее различные молекулы, включая геном вирусной ДНК, виды РНК, полученные при транскрипции, некодирующие клеточные РНК, активируют трансмембранные (toll-подобные) и цитозольные рецепторы распознавания образов, связанные с патогенами, для передачи сигналов через отдельные адаптерные белки для инициации врожденного противовирусного иммунитета. Это приводит к выработке цитокинов, некроптозу клеток через механизмы, аналогичные для РС, связанные с протеинкиназой-3 ее рецептором (RIPK3), активацией пути NF-κB [94].

Запрограммированная некротическая гибель клеток ограничивает репликацию вируса и распространение вирионов [95]. При этом в циркуляции появляется IL33, который выступает в качестве «тревожного» сигнала, инициирует биологические эффекты, направленные на устранение угрозы для организма, включая увеличение продукции провоспалительных цитокинов [55]. Активация NF-κB через toll-подобные рецепторные сигнальные пути приводит к секреции ФНО-α и IL1-β, которые опосредуют транскрипцию IL33 [96, 97]. Сам IL33 также индуцирует экспрессию мРНК в микроглии ФНО-α и IL1-β.

Во многих случаях совместное повышение IL33 и IL31 коррелирует с выраженностью признаков воспаления [55]. Полагают, что IL33, секретируемый вследствие повреждения клеток, способствует IL4-зависимому высвобождению IL31 Th-2 клетками [98]. Эти данные, возможно, объясняют выявленную нами ассоциацию IL33 и IL31 при обострении РС, а также совместную продукцию IL33 и IL1-β, IL4, IL23 в группе пациентов с реактивацией герпетической инфекции.

Существует тонкий баланс между прямым повреждением (некрозом) клеток при инфекции ВПГ и иммунным ответом на нее [99]. При рецидивах инфекции избыточная продукция цитокинов может приводить не только к ограничению распространения вируса, но и

активировать механизмы некроптоза клеток с нарушением функции органов, что особенно важно для ЦНС, где условия для регенерации тканей снижены [12, 99, 100].

Отражением этих процессов, по-видимому, является обнаруженное нами увеличение концентрации IL33 преимущественно при реактивации ПГВИ. Возможно, что α-герпесвирусы, ВПГ-1 и ВПГ-2, а также ВЗВ в большинстве случаев следует рассматривать не в качестве этиологической причины РС, а, скорее, как фактор, способствующий чрезмерной активации иммунной системы у генетически предрасположенных лиц, что играет решающую роль в прогрессировании демиелинизирующих заболеваний. Такие процессы, как молекулярная мимикрия, регуляция эндогенных ретровирусов или нарушение ремиелинизации, могут быть опосредованы данным патогеном [101], а частые рецидивы этой инфекции создают условия для прогрессирования нейродегенерации и переходу течения РРС в ВПРС.

Наши данные согласуются с мнением других исследователей о важной роли оси IL31/IL33/ST2 в развитии РС, возможно, через ее участие в процессах демиелинизации в ЦНС, в отличие от защитной противовоспалительной функции вводимого рекомбинантного IL33. Кроме того, они расширяют наше представление об участии герпетических инфекций в иммуновоспалительных реакциях и процессах демиелинизации или нарушения ремиелинизации, характерных для РС. Дальнейшее изучение особенностей функционирования систем IL10, IL31 и IL33/ST2, являющихся важным связующим звеном между иммунными клетками, нервной системой и эпителиальными тканями, в условиях вирусной нагрузки герпесвирусами будет иметь решающее значение для развития новых подходов к терапии РС [102].

## ВЫВОДЫ

Результаты настоящей работы свидетельствуют о важном участии IL10, IL31 и IL33 в патогенезе РС, но их роль неоднозначна. Мы полагаем, что повышение IL10 при РС и при обострении в большей мере обусловлено реализацией его биологической роли в воспалении при инфекции ВЭБ. Напротив, совместное увеличение IL1β, IL23 и особенно IL33 при реактивации ПГВИ, по-видимому, обусловлено ВПГ и ВЗВ.

Наше исследование носило поисковый характер, без проведения формальной оценки размера выборки и поправки на множественное сравнение, в связи с чем полученные результаты/тенденции должны быть подтверждены в будущих работах. Тем не менее, в нем отражены данные реальной клинической практики ведения пациентов РРС, которые позволяют подойти к более полной расшифровке механизмов, участвующих в обострении РС и прогрессировании заболевания.

## Литература

1. Бойко А. Н., Хачанова Н. В., Мельников М. В., Сиверцева С. А., Евдошенко Е. П., Спиринов Н. Н. и др. Новые направления иммунокоррекции при рассеянном склерозе. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2020; 120 (2): 103–9. DOI: 10.17116/jnevro2020120021103.
2. Göbel K, Ruck T, Meuth SG. Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation. *Mult Scler J*. 2018; 24 (4): 432–9. DOI: 10.1177/1352458518763094.
3. D'Angelo C, Reale M, Costantini E, Di Nicola M, Porfilio I, de Andrés C, et al. Profiling of Canonical and Non-Traditional Cytokine Levels in Interferon-β-Treated Relapsing–Remitting–Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol*. 2018; 9: 1240. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01240.
4. Бойко А. Н., Смирнова Н. Ф., Золотова С. Н., Гусев Е. И. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза. *Consilium Medicum*. 2008; 10 (7): 5–8.
5. Pietropaolo V, Fioriti D, Mischitelli M, Anzivino E, Santini M, Millefiorini E, et al. Detection of human herpesviruses and



- polyomaviruses DNA in a group of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *New Microbiol.* 2005; 28 (3): 199–203.
6. Sotelo J, Ordonez G, Pineda B, Flores J. The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014; 119: 44–8. DOI: 10.1016/j.clineuro.2013.12.020.
  7. Engdahl E, Gustafsson R, Huang J, Biström M, Lima Bomfim I, Stridh P, et al. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019; 10: 2715. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02715.23.
  8. Полова Е. В., Бойко А. Н., Хачанова Н. В., Шаранова С. Н. Вирус Эпштейна–Барр в патогенезе рассеянного склероза (обзор). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2014; 114 (2–2): 29–34.
  9. Attfeld KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2022; 22: 734–50. DOI: 10.1038/s41577-022-00718-z.
  10. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein–Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022; 375 (6578): 296–301. DOI: 10.1126/science.abj8222.
  11. Bjornevik K, Münz C, Cohen JI, Ascherio A. Epstein–Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol.* 2023; 19 (3): 160–171. DOI: 10.1038/s41582-023-00775-5.
  12. Aghbash PS, Hemmat N, Nahand JS, Shamekh A, Memar MY, Babaei A, et al. The role of Th17 cells in viral infections. *Int Immunopharmacol.* 2021; 91: 107331. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107331.
  13. Воробьева А. А., Иванова М. В., Фоминых В. В., Захарова М. Н., Зигангирова Н. А., Гуляева Н. В. Биомаркеры рассеянного склероза (обзор и собственные данные). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2013; 113 (10–2): 23–31.
  14. D'Ambrosio A, Pontecorvo S, Colasanti T, Zamboni S, Francia A, Margutti P. Peripheral blood biomarkers in multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2015; 14: 1097–110. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.07.014 1568-9972.
  15. Melamud MM, Ermakov EA, Boiko AS, Kamaeva DA, Sizikov AE, Ivanova SA, et al. Multiplex Analysis of Serum Cytokine Profiles in Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 13829. DOI: 10.3390/ijms232213829.
  16. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2012; 142 (3): 308–19. DOI: 10.1016/j.clim.2011.11.007.
  17. Sosvorova L, Kanceva R, Vcelak J, Kancheva L, Mohapl M, Starka L, et al. The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015; 36 (6): 564–71. PMID: 26812299.
  18. Alsahebfsoul F, Rahimmanesh I, Shajarian M, Etemadifar M, Sedaghat N, Hejazi Z, et al. Interleukin-33 plasma levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *BioMol Concepts.* 2017; 8 (1): 55–60. DOI: 10.1515/bmc-2016-0026.
  19. de J Guerrero-García J, Rojas-Mayorquín AE, Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, Castañeda-Moreno VA, Mireles-Ramírez MA, et al. Decreased serum levels of sCD40L and IL-31 correlate in treated patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Immunobiology.* 2018; 223: 135–41. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.001.
  20. Franzoi AEA, Gonçalves MVM, Nascimento O, Becker J. Interleukin 31 and Mast Cells: A New Piece in the Puzzle of the Pathophysiology of Multiple Sclerosis? *Int J Brain Disord Treat.* 2018; 4: 026. DOI: 10.23937/2469-5866/1410026.
  21. Maier S, Motataianu A, Barcutean L, Balint A, Hutanu A, Zoltan B, et al. A Interferon-β 1a, an immunomodulatory in relapsing remitting multiple sclerosis patients. The effect on pro-inflammatory cytokines. *Farmacía.* 2020; 68 (1): 65–75. DOI: 10.31925/farmacía.2020.1.10.
  22. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69 (2): 292–302. DOI: 10.1002/ana.22366.
  23. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983; 33: 1444–52. DOI: 10.1212/WNL.33.11.1444.
  24. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014; 83 (3): 278–286. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000560.
  25. Бойко А. Н., Гусева М. П., Хачанова Н. В., Гусев Е. И. Вопросы современной терминологии при рассеянном склерозе. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2018; 118 (8–2): 121–7. DOI: 10.17116/jnevro2018118082121.
  26. Bărcuțean LI, Romaniuc A, Maier S, Bajko Z, Moțățianu A, Adina H, et al. Clinical and serological biomarkers of treatment's response in multiple sclerosis patients treated continuously with interferonβ-1b for more than a decade. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2018; 17 (10): 780–92. DOI: 10.2174/1871527317666180917095256.
  27. Ad'hiyah AH, Salman ED. Predictive Significance of Interleukins 17A and 33 in Risk of Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *Baghdad Science J.* 2022; 1191–200. DOI: 10.21123/bsj.2022.6431.
  28. Mado H, Adamczyk-Sowa M, Bartman W, Wierzbicki K, Tadeusiak B, Sowa P. Plasma Interleukin-33 level in relapsing-remitting multiple sclerosis. Is it negatively correlated with central nervous system lesions in patients with mild disability? *Clin Neurol Neurosurg.* 2021; 206: 106700. DOI: 10.1016/j.clineuro.2021.106700.
  29. Мельников М. В., Шаранова С. Н., Коновалова О. Е., Смирнова Н. Ф., Пашенков М. В., Бойко А. Н. Влияние глатирамера ацетата на функционирование Th1- и Th17-клеток у больных рассеянным склерозом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2018; 8 (2): 151. DOI: 10.17116/jnevro2018118082121.
  30. Оспельникова Т. П., Морозова О. В., Исаева Е. И., Лиждвой В. Ю., Колодьяжная Л. В., Андреева С. А. и др. Мониторинг цитокинов у больных рассеянным склерозом в процессе лечения препаратом IFNβ-1a. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2015; 115 (8–2): 71–71.
  31. Якушина Т. И., Лиждвой В. Ю., Василенко И. А., Андрюхина О. М., Котов С. В. Дополнительные показатели для оценки эффективности терапии рассеянного склероза (предварительные данные). *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2013; 113 (2–2): 61–65.
  32. Сурсякова Н. В., Байдина Т. В., Куikliна Е. М., Трушников Т. Н., Ожигбесова Т. В. Факторы, регулирующие активность В-лимфоцитов, как потенциальные биомаркеры рассеянного склероза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2019; 119 (2–2): 24–27. DOI: 10.17116/jnevro20191192224.
  33. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21 (1): 51–64. DOI: 10.1038/s41579-022-00770-5;
  34. Pender MP, Csurhes PA, Burrows JM, Burrows SR. Defective T-cell control of Epstein–Barr virus infection in multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology.* 2017; 6 (1): e126. DOI: 10.1038/cti.2016.87.
  35. Grut V, Biström M, Salzer J, Stridh P, Jons D, Gustafsson R, et al. Cytomegalovirus seropositivity is associated with reduced risk of multiple sclerosis—a presymptomatic case-control study. *Eur J Neurol.* 2021; 28 (9): 3072–9. DOI: 10.1111/ene.14961.
  36. Zhao J, Qin C, Liu Y, Rao Y, Feng P. Herpes simplex virus and pattern recognition receptors: an arms race. *Front Immunol.* 2021; 11: 613799. DOI: 10.3389/fimmu.2020.613799.
  37. Najafi S, Ghane M, Poortahmasebi V, Jazayeri S, Yousefzadeh-Chabok S. Prevalence of herpes simplex virus in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a case-control study in the North of Iran. *Arch Clin Infect Dis.* 2016; 11: e36576. DOI: 10.5812/archcid.36576.
  38. Duarte LF, Farnas MA, A lvarez DM, Bueno SM, Riedel CA, González PA. Herpes simplex virus type 1 infection of the central nervous system: insights into proposed interrelationships with



- neurodegenerative disorders. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13: 46. DOI: 10.3389/fncel.2019.00046.
39. Грись М. С., Баранова Н. С., Спиринов Н. Н., Касаткин Д. С., Киселев Д. В., Шипова Е. Г. Рассеянный склероз у пациентов с герпесвирусной инфекцией: особенности клинической картины и течения. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2021; 13 (Прил. 1): 21–26. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1S-21-26.
  40. Ferrante P, Mancuso R, Pagani E, Guerini FR, Calvo MG, Saresella M, et al. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol.* 2000; 6 (2): 109–14. PMID: 10871797.
  41. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology.* 2011; 76 (23): 1989–95. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31821e552a.
  42. Гончарова З. А., Беловолова Р. А., Мегерян В. А. Клинико-иммунологические особенности рассеянного склероза на фоне реактивации персистирующей герпесвирусной инфекции. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2018; 14 (1): 126–32.
  43. Kwilas AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology.* 2015; 96: 55–57. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020.
  44. Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res.* 2017; 2017: 6104054. DOI: 10.1155/2017/6104054.
  45. Zhang L, Yuan S, Cheng G, Guo B. Type I IFN promotes IL10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS One.* 2011; 6 (12): 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0028432.
  46. Schönrich G, Abdelaziz MO, Rafferty MJ. Epstein–Barr virus, interleukin-10 and multiple sclerosis: A ménage à trois. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1028972. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1028972.
  47. Jog NR, Chakravarty EF, Guthridge JM, James JA. Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Front Immunol.* 2018; 9: 2198. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02198.
  48. Kang MS, Kieff E. Epstein–Barr virus latent genes. *Exp Mol Med.* 2015; 47 (1): e131. DOI: 10.1038/emm.2014.84.
  49. Maertzdorf J, Osterhaus AD, Verjans GM. IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol.* 2002; 169 (10): 5897–903. DOI: 10.4049/jimmunol.169.10.5897.
  50. Fredj NB, Rizzo R, Bortolotti D, Nefzi F, Chebel S, Rotola A, et al., Evaluation of the implication of KIR2DL2 receptor in multiple sclerosis and herpesvirus susceptibility. *J Neuroimmunol.* 2014; 271 (1–2): 30–35. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.03.017.
  51. Rizzo R, Bortolotti D, Fainardi E, Gentili V, Bolzani S, Baldi E, et al. KIR2DL2 inhibitory pathway enhances Th17 cytokine secretion by NK cells in response to herpesvirus infection in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2016; 294: 1–5. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.03.007.
  52. Maier S, Simu M, Hutanu A, Barcutean L, Voidazan S, Bajko Z, et al. Clinical immunological correlations in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab. *Brain Sci.* 2020; 10 (11): 802. DOI: 10.3390/brainsci10110802.
  53. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 361–68. DOI: 10.1016/S1359-6101(03)00043-1.
  54. Broberg EK, Setälä N, Eralinna JP, Salmi AA, Roytta M, Hukkanen V. Herpes simplex virus type 1 infection induces upregulation of interleukin-23 (p19) mRNA expression in trigeminal ganglia of BALB/c mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2004; 22: 641–51. DOI: 10.1089/10799900260100123.
  55. Di Salvo E, Ventura-Spagnolo E, Casciaro M, Navarra M, Gangemi S. IL-33/IL-31 axis: a potential inflammatory pathway. *Mediator. Inflamm.* 2018; 3858032. DOI: 10.1155/2018/3858032.
  56. Maier E, Werner D, Duschl A, Bohle B, Horejs-Hoeck J. Human Th2 but not Th9 cells release IL-31 in a STAT6/ NF- $\kappa$ B-dependent way. *J Immunol.* 2014; 193 (2): 645–54. DOI: 10.4049/jimmunol.1301836.
  57. Dong H, Zhang X, Qian Y. Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci Monit Basic Res.* 2014; 20: 200–6. DOI: 10.12659/MSMBR.893093.
  58. Nemmer JM, Kuchner M, Datsi A, Oláh P, Julia V, Raap U, et al. Interleukin-31 signaling bridges the gap between immune cells, the nervous system and epithelial tissues. *Front Med.* 2021; 8: 639097. DOI: 10.3389/fmed.2021.639097.
  59. Singh B, Jegga AG, Shanmukhappa KS, Edukulla R, Khurana Hershey GH, Medvedovic M, et al. IL-31-driven skin remodeling involves epidermal cell proliferation and thickening that lead to impaired skin-barrier function. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0161877. DOI: 10.1371/journal.pone.0161877.
  60. Yagi Y, Andoh A, Nishida A, Shioya M, Nishimura T, et al. Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med.* 2007; 19: 941–6. DOI: 10.3892/ijmm.19.6.941.
  61. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased concentrations of Interleukin-33 in the serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Oman Med J.* 2016; 31 (1): 40–45. DOI: 10.5001/omj.2016.08.
  62. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 axis in immune cells during inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2017; 8: 475. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00475.
  63. Peine M, Marek RM, Löhning M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol.* 2016; 37 (5): 321–33. DOI: 10.1016/j.it.2016.03.007.
  64. Jamali M, Rostami M, Gholamreza R, Sarab A, Mahdavi R. IL-33 polymorphism rs1929992 and its association with susceptibility to different pattern of multiple sclerosis. *Tehran Univ Med J.* 2018; 76 (7): 446–51.
  65. Al-Naseri MAS, Salman ED, Ad'hiah AH. Genetic analysis of IL4 (rs2070874), IL17A (rs2275913), and IL33 (rs7044343) polymorphisms in Iraqi multiple sclerosis patients by using T-plex real-time PCR method. *Meta Gene.* 2022; 31: 100986. DOI: 10.1016/j.mgene.2021.100986.
  66. Ahmadi M, Fathi F, Fouladi S, Alsahebhosul F, Manian M, Eskandari N. Serum IL-33 level and IL-33, IL1RL1 gene polymorphisms in asthma and multiple sclerosis patients. *Curr Mol Med.* 2019; 19 (5): 357–63. DOI: 10.2174/1566524019666190405120137.
  67. Allan D, Fairlie-Clarke KJ, Elliott CD, Schuh C, Barnett SC, Lassmann H, et al. Role of IL-33 and ST2 signalling pathway in multiple sclerosis: expression by oligodendrocytes and inhibition of myelination in central nervous system. *Acta Neuropathol. Commun.* 2016; 4 (1): 75. DOI: 10.1186/s40478-016-0344-1.
  68. Pei C, Barbour M, Fairlie-Clarke KJ, Allan D, Mu R, Jiang HR. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology.* 2014; 141: 9–1. DOI: 10.1111/imm.12174.
  69. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukocyte Biol.* 2008; 84: 631–43. DOI: 10.1189/jlb.1207830.
  70. Zhang F, Tossberg JT, Spurlock CF, Yao SY, Aune TM, Sriram S. Expression of IL-33 and its epigenetic regulation in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014; 1: 307–18. DOI: 10.1002/acn3.47.
  71. Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron.* 2015; 85: 703–9. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.01.013.
  72. Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, et al. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res.* 2011; 1385: 8–17. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.02.045.
  73. Kempuraj D, Khan MM, Thangavel R, Xiong Z, Yang E, Zaheer A. Glia maturation factor induces interleukin-33 release from astrocytes: implications for neurodegenerative diseases. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 8: 643–50. DOI: 10.1007/s11481-013-9439-7.
  74. Мельников М. В., Свиридова А. А., Роговский В. С., Бойко А. Н., Пащенко М. В. Роль макрофагов в развитии нейровоспаления при рассеянном склерозе. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2022; 122 (5):

- 51–56. DOI: 10.17116/jnevro202212205151.
75. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2015; 131: 65–86. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.003.
  76. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol.* 2012; 42: 1804–14. DOI: 10.1002/eji.20114194718.
  77. Russi AE, Ebel ME, Yang Y, Brown MA. Male-specific IL-33 expression regulates sex-dimorphic EAE susceptibility. *PNAS.* 2018; 115 (7): E1520–E1529. DOI: 10.1073/pnas.1710401115.
  78. Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol.* 2016; 17 (7): 765–774. DOI: 10.1038/ni.3489.
  79. Braun H, Afonina IS, Mueller C, Beyaert R. Dichotomous function of IL-33 in health and disease: From biology to clinical implications. *Biochemical Pharmacology.* 2018; 148: 238–52. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.0100006-2952.
  80. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol.* 2011; 186 (4): 2584–91. DOI: 10.4049/jimmunol.1002103.
  81. Sattler S, Ling GS, Xu D, Hussaarts L, Romaine A, Zhao H, et al. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun.* 2014; 50: 107–22. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.01.032.
  82. Cayrol C, Girard J-Ph. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018; 281: 154–168. DOI: 10.1111/imr.12619.
  83. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol.* 2021; 18: 1106–21. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.
  84. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* 2009; 31: 84–98. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.05.007.
  85. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacombe DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (1): 282–7. DOI: 10.1073/pnas.0606854104.
  86. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2014; 31: 31–7. DOI: 10.1016/j.coi.2014.09.004.
  87. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, et al. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol.* 2011; 187 (4): 1609–16. DOI: 10.4049/jimmunol.1003080.
  88. Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (5): 1673–8. DOI: 10.1073/pnas.1115884109.
  89. Waern I, Lundequist A, Pejler G, Wernersson S. Mast cell chymase modulates IL-33 levels and controls allergic sensitization in dust-mite induced airway inflammation. *Mucosal Immunol.* 2013; 6 (5): 911–20. DOI: 10.1038/mi.2012.129.
  90. Lefrancais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111 (43): 15502–7. DOI: 10.1073/pnas.1410700111.
  91. Hirose S, Jahani PS, Wang S, Jaggi U, Tormanen K, Yu J, et al. Type 2 innate lymphoid cells induce CNS demyelination in an HSV-IL-2 mouse model of multiple sclerosis. *iScience.* 2020; 23 (10): 101549. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101549.
  92. Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, et al. Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Rep.* 2015; 10: 1836–49. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.051.
  93. Verzosa AL, McGeever LA, Bhark SJ, Delgado T, Salazar N, Sanchez EL. Herpes simplex virus 1 infection of neuronal and nonneuronal cells elicits specific innate immune responses and immune evasion mechanisms. *Front Immunol.* 2021; 12: 644664. DOI: 10.3389/fimmu.2021.644664.
  94. Zhao J, Qin C, Liu Y, Rao Y, Feng P. Herpes simplex virus and pattern recognition receptors: an arms race. *Front Immunol.* 2021; 11: 613799. DOI: 10.3389/fimmu.2020.613799.
  95. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA dependent activator of IFN regulatory factors. *J Immunol.* 2008; 181: 6427–34. DOI: 10.4049/jimmunol.181.9.6427.104.
  96. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010; 130 (2): 172–80. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x.
  97. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43: 1383–91. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.06.003.
  98. Furue M, Yamamura K, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy.* 2018; 73 (1): 29–36. DOI: 10.1111/all.13239.
  99. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology J.* 2005; 2: 59. DOI: 10.1186/1743-422X-2-59.
  100. Roychoudhury P, Swan DA, Duke E, Corey L, Zhu J, Davé V, et al. Tissue-resident T cell-derived cytokines eliminate herpes simplex virus-2-infected cells. *J Clin Invest.* 2020; 130 (6): 2903–19. DOI: 10.1172/JCI132583.
  101. Bello-Morales R, Andreu S, López-Guerrero JA. The role of herpes simplex virus type 1 infection in demyelination of the central nervous system. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (14): 5026. DOI: 10.3390/ijms21145026.
  102. Sun Y, Wen Y, Wang L, Wen L, You W, Wei S, et al. Therapeutic opportunities of interleukin-33 in the central nervous system. *Front Immunol.* 2021; 12: 654626. DOI: 10.3389/fimmu.2021.654626.

## References

1. Boyko AN, Khachanova NV, Melnikov MV, Sivertseva SA, Evdoshenko EP, Spirin NN, i dr. Noveye napravleniya immunokorrekcii pri rasseyannom skleroze. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova.* 2020; 120 (2): 103–9. DOI: 10.17116/jnevro2020120021103. Russian.
2. Göbel K, Ruck T, Meuth SG. Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation. *Mult Scler J.* 2018; 24 (4): 432–9. DOI: 10.1177/1352458518763094.
3. D'Angelo C, Reale M, Costantini E, Di Nicola M, Porfilio I, de Andrés C, et al. Profiling of Canonical and Non-Traditional Cytokine Levels in Interferon- $\beta$ -Treated Relapsing-Remitting-Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2018; 9: 1240. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01240.
4. Boyko AN, Smirnova NF, Zolotova SN, Gusev EI. Ehpideemiologiya i ehtiologiya rasseyannogo skleroza. *Consilium Medicum.* 2008; 10 (7): 5–8. Russian.
5. Pietropaolo V, Fioriti D, Mischitelli M, Anzivino E, Santini M, Millefiorini E, et al. Detection of human herpesviruses and polyomaviruses DNA in a group of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *New Microbiol.* 2005; 28 (3): 199–203.
6. Sotelo J, Ordonez G, Pineda B, Flores J. The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014; 119: 44–8. DOI: 10.1016/j.clineuro.2013.12.020.
7. Engdahl E, Gustafsson R, Huang J, Biström M, Lima Bomfim I, Stridh P, et al. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019; 10: 2715. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02715.23.

8. Popova EV, Boyko AN, Khachanova NV, Sharanova SN. Virus Ehpshtejna-Barr v patogeneze rasseyannogo skleroza (obzor). Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S.S. Korsakova. Specvypuski. 2014; 114 (2–2): 29–34. Russian.
9. Attfeld KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2022; 22: 734–50. DOI: 10.1038/s41577-022-00718-z.
10. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022; 375 (6578): 296–301. DOI: 10.1126/science.abj8222.
11. Bjornevik K, Münz C, Cohen JL, Ascherio A. Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol.* 2023; 19 (3): 160–171. DOI: 10.1038/s41582-023-00775-5.
12. Aghbash PS, Hemmat N, Nahand JS, Shamekh A, Memar MY, Babaei A, et al. The role of Th17 cells in viral infections. *Int Immunopharmacol.* 2021; 91: 107331. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107331.
13. Vorobeva AA, Ivanova MV, Fominyx VV, Zaharova MN, Zingangirova NA, Gulyaeva NV. Biomarkery rasseyannogo skleroza (obzor i sobstvennye dannye). Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S.S. Korsakova. Specvypuski. 2013; 113 (10–2): 23–31. Russian.
14. D'Ambrosio A, Pontecorvo S, Colasanti T, Zamboni S, Francia A, Margutti P. Peripheral blood biomarkers in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2015; 14: 1097–110. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.07.014 1568-9972.
15. Melamud MM, Ermakov EA, Boiko AS, Kamaeva DA, Sizikov AE, Ivanova SA, et al. Multiplex Analysis of Serum Cytokine Profiles in Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 13829. DOI: 10.3390/ijms232213829.
16. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2012; 142 (3): 308–19. DOI: 10.1016/j.clim.2011.11.007.
17. Sosvorova L, Kanceva R, Vcelak J, Kancheva L, Mohapl M, Starke L, et al. The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015; 36 (6): 564–71. PMID: 26812299.
18. Alsahebhosoul F, Rahimmanesh I, Shajarian M, Etemadifar M, Sedaghat N, Hejazi Z, et al. Interleukin-33 plasma levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *BioMol Concepts.* 2017; 8 (1): 55–60. DOI: 10.1515/bmc-2016-0026.
19. de J Guerrero-García J, Rojas-Mayorquín AE, Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, Castañeda-Moreno VA, Mireles-Ramírez MA, et al. Decreased serum levels of sCD40L and IL-31 correlate in treated patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Immunobiology.* 2018; 223: 135–41. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.001.
20. Franzoi AEA, Gonçalves MVM, Nascimento O, Becker J. Interleukin 31 and Mast Cells: A New Piece in the Puzzle of the Pathophysiology of Multiple Sclerosis? *Int J Brain Disord Treat.* 2018; 4: 026. DOI: 10.23937/2469-5866/1410026.
21. Maier S, Motataianu A, Barcutean L, Balint A, Hutanu A, Zoltan B, et al. A Interferon-β 1a, an immunomodulatory in relapsing remitting multiple sclerosis patients. The effect on pro-inflammatory cytokines. *Farmacía.* 2020; 68 (1): 65–75. DOI: 10.31925/farmacía.2020.1.10.
22. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69 (2): 292–302. DOI: 10.1002/ana.22366.
23. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983; 33: 1444–52. DOI: 10.1212/WNL.33.11.1444.
24. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014; 83 (3): 278–286. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000560.
25. Boyko AN, Guseva MR, Khachanova NV, Gusev EI. Voprosy sovremennoj terminologii pri rasseyannom skleroze. Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S. S. Korsakova. Specvypuski. 2018; 118 (8–2): 121–7. DOI: 10.17116/jnevro2018118082121. Russian.
26. Bărcuțean LI, Romaniuc A, Maier S, Bajko Z, Moțățaiu A, Adina H, et al. Clinical and serological biomarkers of treatment's response in multiple sclerosis patients treated continuously with interferon-β-1b for more than a decade. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2018; 17 (10): 780–92. DOI: 10.2174/1871527317666180917095256.
27. Ad'hiah AH, Salman ED. Predictive Significance of Interleukins 17A and 33 in Risk of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Baghdad Science J.* 2022; 1191–200. DOI: 10.21123/bsj.2022.6431.
28. Mado H, Adamczyk-Sowa M, Bartman W, Wierzbicki K, Tadeusiak B, Sowa P. Plasma Interleukin-33 level in relapsing-remitting multiple sclerosis. Is it negatively correlated with central nervous system lesions in patients with mild disability? *Clin Neurol Neurosurg.* 2021; 206: 106700. DOI: 10.1016/j.clineuro.2021.106700.
29. Melnikov MV, Sharanova SN, Konovalova OE, Smirnova NF, Pashhenkov MV, Bojko AN. Vliyanie glatiramera acetata na funkcionirovanie Th1- i Th17-kletok u bol'nyh rasseyannym sklerozom. Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S. S. Korsakova. 2018; 8 (2): 151. DOI: 10.17116/jnevro2018118082121. Russian.
30. Ospelnikova TP, Morozova OV, Isaeva EI, Lizhdvoj VYu, Kolodyazhnaya LV, Andreeva SA, i dr. Monitoring citokinov u bol'nyh rasseyannym sklerozom v processe lecheniya preparatom IFNβ-1a. Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S. S. Korsakova. Specvypuski. 2015; 115 (8–2): 71–71. Russian.
31. Yakushina TI, Lizhdvoj VYu, Vasilenko IA, Andryuhina OM, Kotov SV. Dopolnitel'nye pokazateli dlya ocenki ehffektivnosti terapii rasseyannogo skleroza (predvaritel'nye dannye). Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S. S. Korsakova. Specvypuski. 2013; 113 (2–2): 61–65. Russian.
32. Sursyakova NV, Bajdina TV, Kuklina EM, Trushnikova TN, Ozhgibesova TV. Faktory, reguliruyushhie aktivnost' V-limfocitov, kak potencial'nye biomarkery rasseyannogo skleroza. Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S. S. Korsakova. Specvypuski. 2019; 119 (2–2): 24–27. DOI: 10.17116/jnevro20191192224. Russian.
33. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21 (1): 51–64. DOI: 10.1038/s41579-022-00770-5;
34. Pender MP, Csurhes PA, Burrows JM, Burrows SR. Defective T-cell control of Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology.* 2017; 6 (1): e126. DOI: 10.1038/cti.2016.87.
35. Grut V, Biström M, Salzer J, Stridh P, Jons D, Gustafsson R, et al. Cytomegalovirus seropositivity is associated with reduced risk of multiple sclerosis—a presymptomatic case-control study. *Eur J Neurol.* 2021; 28 (9): 3072–9. DOI: 10.1111/ene.14961.
36. Zhao J, Qin C, Liu Y, Rao Y, Feng P. Herpes simplex virus and pattern recognition receptors: an arms race. *Front Immunol.* 2021; 11: 613799. DOI: 10.3389/fimmu.2020.613799.
37. Najafi S, Ghane M, Poortahmasebi V, Jazayeri S, Yousefzadeh-Chabok, S. Prevalence of herpes simplex virus in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a case-control study in the North of Iran. *Arch Clin Infect Dis.* 2016; 11: e36576. DOI: 10.5812/archcid.36576.
38. Duarte LF, Farias MA, A 'lvarez DM, Bueno SM, Riedel CA, González PA. Herpes simplex virus type 1 infection of the central nervous system: insights into proposed interrelationships with neurodegenerative disorders. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13: 46. DOI: 10.3389/fncel.2019.00046.
39. Gris MS, Baranova NS, Spirin NN, Kasatkin DS, Kiselev DV, Shipova EG. Rasseyannyj skleroz u pacientov s herpesvirusnoj infekciej: osobennosti klinicheskoy kartiny i techeniya. *Nevrologiya, nejropsihiatriya, psihosomatika.* 2021; 13 (Pril. 1): 21–26. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1S-21-26. Russian.
40. Ferrante P, Mancuso R, Pagani E, Guerini FR, Calvo MG, Saresella M, et al. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol.* 2000; 6 (2): 109–14. PMID: 10871797.
41. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Common viruses associated with lower pediatric multiple



- sclerosis risk. *Neurology*. 2011; 76 (23): 1989–95. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31821e552a.
42. Goncharova ZA, Belovolova RA, Megeryan VA. Kliniko-immunologicheskie osobennosti rasseyannogo skleroza na fone reaktivacii persistiruyushhej gerpesvirusnoj infekcii. *Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal* 2018; 14 (1): 126–32. Russian.
  43. Kwilas AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*. 2015; 96: 55–57. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020.
  44. Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res*. 2017; 2017: 6104054. DOI: 10.1155/2017/6104054.
  45. Zhang L, Yuan S, Cheng G, Guo B. Type I IFN promotes IL10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. *PLoS One*. 2011; 6 (12): 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0028432.
  46. Schönrich G, Abdelaziz MO, Raftery MJ. Epstein–Barr virus, interleukin-10 and multiple sclerosis: A ménage à trois. *Front. Immunol*. 2022; 13: 1028972. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1028972.
  47. Jog NR, Chakravarty EF, Guthridge JM, James JA. Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Front Immunol*. 2018; 9: 2198. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02198.
  48. Kang MS, Kieff E. Epstein–Barr virus latent genes. *Exp Mol Med*. 2015; 47 (1): e131. DOI: 10.1038/emmm.2014.84.
  49. Maertzdorf J, Osterhaus AD, Verjans GM. IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol*. 2002; 169 (10): 5897–903. DOI: 10.4049/jimmunol.169.10.5897.
  50. Fredj NB, Rizzo R, Bortolotti D, Nefzi F, Chebel S, Rotola A, et al., Evaluation of the implication of KIR2DL2 receptor in multiple sclerosis and herpesvirus susceptibility. *J Neuroimmunol*. 2014; 271 (1–2): 30–35. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.03.017.
  51. Rizzo R, Bortolotti D, Fainardi E, Gentili V, Bolzani S, Baldi E, et al. KIR2DL2 inhibitory pathway enhances Th17 cytokine secretion by NK cells in response to herpesvirus infection in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2016; 294: 1–5. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.03.007.
  52. Maier S, Simu M, Hutanu A, Barcutean L, Voidazan S, Bajko Z, et al. Clinical immunological correlations in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab. *Brain Sci*. 2020; 10 (11): 802. DOI: 10.3390/brainsci10110802.
  53. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14: 361–68. DOI: 10.1016/S1359-6101(03)00043-1.
  54. Broberg EK, Setälä N, Eralinna JP, Salmi AA, Roytta M, Hukkanen V. Herpes simplex virus type 1 infection induces upregulation of interleukin-23 (p19) mRNA expression in trigeminal ganglia of BALB/c mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2004; 22: 641–51. DOI: 10.1089/10799900260100123.
  55. Di Salvo E, Ventura-Spagnolo E, Casciaro M, Navarra M, Gangemi S. IL-33/IL-31 axis: a potential inflammatory pathway. *Mediator. Inflamm*. 2018; 3858032. DOI: 10.1155/2018/3858032.
  56. Maier E, Werner D, Duschl A, Bohle B, Horejs-Hoeck J. Human Th2 but not Th9 cells release IL-31 in a STAT6/ NF- $\kappa$ B-dependent way. *J Immunol*. 2014; 193 (2): 645–54. DOI: 10.4049/jimmunol.1301836.
  57. Dong H, Zhang X, Qian Y. Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci Monit Basic Res*. 2014; 20: 200–6. DOI: 10.12659/MSMBR.893093.
  58. Nemmer JM, Kuchner M, Datsi A, Oláh P, Julia V, Raap U, et al. Interleukin-31 signaling bridges the gap between immune cells, the nervous system and epithelial tissues. *Front Med*. 2021; 8: 639097. DOI: 10.3389/fmed.2021.639097.
  59. Singh B, Jegga AG, Shanmukhappa KS, Edukulla R, Khurana Hershey GH, Medvedovic M, et al. IL-31-driven skin remodeling involves epidermal cell proliferation and thickening that lead to impaired skin-barrier function. *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0161877. DOI: 10.1371/journal.pone.0161877.
  60. Yagi Y, Andoh A, Nishida A, Shioya M, Nishimura T, et al. Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med*. 2007; 19: 941–6. DOI: 10.3892/ijmm.19.6.941.
  61. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased concentrations of Interleukin-33 in the serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Oman Med J*. 2016; 31 (1): 40–45. DOI: 10.5001/omj.2016.08.
  62. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 axis in immune cells during inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2017; 8: 475. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00475.
  63. Peine M, Marek RM, Löhning M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol*. 2016; 37 (5): 321–33. DOI: 10.1016/j.it.2016.03.007.
  64. Jamali M, Rostami M, Gholamreza R, Sarab A, Mahdavi R. IL-33 polymorphism rs1929992 and its association with susceptibility to different pattern of multiple sclerosis. *Tehran Univ Med J*. 2018; 76 (7): 446–51.
  65. Al-Naseri MAS, Salman ED, Ad'hiah AH. Genetic analysis of IL4 (rs2070874), IL17A (rs2275913), and IL33 (rs7044343) polymorphisms in Iraqi multiple sclerosis patients by using T-plex real-time PCR method. *Meta Gene*. 2022; 31: 100986. DOI: 10.1016/j.mgene.2021.100986.
  66. Ahmadi M, Fathi F, Fouladi S, Alsahebfoosul F, Manian M, Eskandari N. Serum IL-33 level and IL-33, IL1RL1 gene polymorphisms in asthma and multiple sclerosis patients. *Curr Mol Med*. 2019; 19 (5): 357–63. DOI: 10.2174/1566524019666190405120137.
  67. Allan D, Fairlie-Clarke KJ, Elliott CD, Schuh C, Barnett SC, Lassmann H, et al. Role of IL-33 and ST2 signalling pathway in multiple sclerosis: expression by oligodendrocytes and inhibition of myelination in central nervous system. *Acta Neuropathol. Commun*. 2016; 4 (1): 75. DOI: 10.1186/s40478-016-0344-1.
  68. Pei C, Barbour M, Fairlie-Clarke KJ, Allan D, Mu R, Jiang HR. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology*. 2014; 141: 9–1. DOI: 10.1111/imm.12174.
  69. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukocyte Biol*. 2008; 84: 631–43. DOI: 10.1189/jlb.1207830.
  70. Zhang F, Tossberg JT, Spurlock CF, Yao SY, Aune TM, Sriram S. Expression of IL-33 and its epigenetic regulation in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014; 1: 307–18. DOI: 10.1002/acn3.47.
  71. Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The gliaderived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron*. 2015; 85: 703–9. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.01.013.
  72. Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, et al. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res*. 2011; 1385: 8–17. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.02.045.
  73. Kempuraj D, Khan MM, Thangavel R, Xiong Z, Yang E, Zaheer A. Glia maturation factor induces interleukin-33 release from astrocytes: implications for neurodegenerative diseases. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8: 643–50. DOI: 10.1007/s11481-013-9439-7.
  74. Melnikov MV, Sviridova AA, Rogovskij VS, Boyko AN, Pashchenkov MV. Rol' makrofagov v razvitií nejrovospaleniya pri rasseyannom skleroze. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S. S. Korsakova*. 2022; 122 (5): 51–56. DOI: 10.17116/jnevro202212205151. Russian.
  75. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015; 131: 65–86. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.003.
  76. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 1804–14. DOI: 10.1002/eji.20114194718.
  77. Russi AE, Ebel ME, Yang Y, Brown MA. Male-specific IL-33 expression regulates sex-dimorphic EAE susceptibility. *PNAS*. 2018; 115 (7): E1520–E1529. DOI: 10.1073/pnas.1710401115.
  78. Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol*. 2016; 17 (7): 765–774. DOI: 10.1038/ni.3489.
  79. Braun H, Afonina IS, Mueller C, Beyaert R. Dichotomous function



- of IL-33 in health and disease: From biology to clinical implications. *Biochemical Pharmacology*. 2018; 148: 238–52. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.0100006-2952.
80. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol*. 2011; 186 (4): 2584–91. DOI: 10.4049/jimmunol.1002103.
  81. Sattler S, Ling GS, Xu D, Hussaarts L, Romaine A, Zhao H, et al. IL-10- producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun*. 2014; 50: 107–22. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.01.032.
  82. Cayrol C, Girard J-Ph. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev*. 2018; 281: 154–168. DOI: 10.1111/imr.12619.
  83. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021; 18: 1106–21. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.
  84. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009; 31: 84–98. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.05.007.
  85. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (1): 282–7. DOI: 10.1073/pnas.0606854104.
  86. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2014; 31: 31–7. DOI: 10.1016/j.coi.2014.09.004.
  87. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, et al. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol*. 2011; 187 (4): 1609–16. DOI: 10.4049/jimmunol.1003080.
  88. Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Paredo A, Monsarrat B, Girard JP, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109 (5): 1673–8. DOI: 10.1073/pnas.1115884109.
  89. Waern I, Lundequist A, Pejler G, Wernersson S. Mast cell chymase modulates IL-33 levels and controls allergic sensitization in dust-mite induced airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2013; 6 (5): 911–20. DOI: 10.1038/mi.2012.129.
  90. Lefrancais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111 (43): 15502–7. DOI: 10.1073/pnas.1410700111.
  91. Hirose S, Jahani PS, Wang S, Jaggi U, Tormanen K, Yu J, et al. Type 2 innate lymphoid cells induce CNS demyelination in an HSV-IL-2 mouse model of multiple sclerosis. *iScience*. 2020; 23 (10): 101549. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101549.
  92. Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, et al. Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell Rep*. 2015; 10: 1836–49. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.051.
  93. Verzosa AL, McGeever LA, Bhark SJ, Delgado T, Salazar N, Sanchez EL. Herpes simplex virus 1 infection of neuronal and nonneuronal cells elicits specific innate immune responses and immune evasion mechanisms. *Front Immunol*. 2021; 12: 644664. DOI: 10.3389/fimmu.2021.644664.
  94. Zhao J, Qin C, Liu Y, Rao Y, Feng P. Herpes simplex virus and pattern recognition receptors: an arms race. *Front Immunol*. 2021; 11: 613799. DOI: 10.3389/fimmu.2020.613799.
  95. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA dependent activator of IFN regulatory factors. *J Immunol*. 2008; 181: 6427–34. DOI: 10.4049/jimmunol.181.9.6427.104.
  96. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology*. 2010; 130 (2): 172–80. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x.
  97. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43: 1383–91. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.06.003.
  98. Furue M, Yamamura K, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Fukui Y. Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy*. 2018; 73 (1): 29–36. DOI: 10.1111/all.13239.
  99. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology J*. 2005; 2: 59. DOI: 10.1186/1743-422X-2-59.
  100. Roychoudhury P, Swan DA, Duke E, Corey L, Zhu J, Davé V, et al. Tissue-resident T cell-derived cytokines eliminate herpes simplex virus-2-infected cells. *J Clin Invest*. 2020; 130 (6): 2903–19. DOI: 10.1172/JCI132583.
  101. Bello-Morales R, Andreu S, López-Guerrero JA. The role of herpes simplex virus type 1 infection in demyelination of the central nervous system. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (14): 5026. DOI: 10.3390/ijms21145026.
  102. Sun Y, Wen Y, Wang L, Wen L, You W, Wei S, et al. Therapeutic opportunities of interleukin-33 in the central nervous system. *Front Immunol*. 2021; 12: 654626. DOI: 10.3389/fimmu.2021.654626.

## УЛУЧШЕНИЕ РЕЧИ У ДЕТЕЙ С ДЦП НА ФОНЕ РЕАБИЛИТАЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕЙРОИНТЕРФЕЙСА "МОЗГ–КОМПЬЮТЕР–ЭКЗОСКЕЛЕТ КИСТИ"

В. Б. Павленко <sup>✉</sup>, С. В. Власенко, Л. С. Орехова, Е. А. Бирюкова

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

Как было показано ранее, сеансы нейрореабилитации с применением неинвазивного интерфейса «мозг–компьютер–экзоскелет кисти» снижают у детей с детским церебральным параличом (ДЦП) спастичность мышц кисти и улучшают двигательные навыки. Однако изменение речевых функций пациентов и их связь с подвижностью верхних конечностей не анализировали. Целью исследования было проанализировать связь между двигательными и речевыми функциями детей с ДЦП, а также выявить изменения моторной реализации высказывания у пациентов в результате комплексного лечения, включающего сеансы нейрореабилитации. В исследовании приняли участие дети с ДЦП в возрасте 6–15 лет. Основная группа ( $n = 40$ , 16 девочек, 24 мальчика) проходила комплексное санаторно-курортное лечение с курсом нейрореабилитации, а группа сравнения ( $n = 20$ , 10 девочек, 10 мальчиков) — стандартное санаторно-курортное лечение. Выявлена статистически значимая ( $p < 0,001$ ) взаимосвязь между величиной суммарного показателя шкалы «Возможности кисти — дети» («ABILHANDKids») и показателями моторной реализации высказывания. Комплексная терапия с курсом нейрореабилитации привела у пациентов основной группы к статистически значимым изменениям ( $p < 0,001$ ): снижению спастичности кистей рук, росту суммарного показателя «ABILHANDKids» и показателей речи. У детей группы сравнения статистически значимых изменений данных показателей не выявлено. Основой позитивных эффектов нейрореабилитации может быть усиление пластичности нейронных цепей, контролирующих выполнение сложных движений рук, а также речевые процессы. Полученные данные могут быть использованы при разработке новых методов коррекции двигательной и когнитивной сферы детей с ДЦП.

**Ключевые слова:** дети, церебральный паралич, речь, интерфейс мозг–компьютер

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

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

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 1 от 25 января 2022 г.). Получено информированное согласие от родителей на участие детей в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Борисович Павленко  
пр. Вернадского, д. 4, г. Симферополь, 295007; [vpav55@gmail.com](mailto:vpav55@gmail.com)

**Статья получена:** 17.06.2023 **Статья принята к печати:** 14.07.2023 **Опубликована онлайн:** 28.07.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.026

## SPEECH IMPROVEMENT IN CHILDREN WITH CEREBRAL PALSY BY "BRAIN–COMPUTER–HAND EXOSKELETON" NEUROINTERFACE REHABILITATION

Pavlenko VB <sup>✉</sup>, Vlasenko SV, Orekhova LS, Biryukova EA

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

As explained earlier, neurorehabilitation sessions involving the use of the non-invasive “brain – computer – hand exoskeleton” interface reduce hand muscle spasticity and improve motor skills in children with cerebral palsy (CP). However, the changes in the patients’ speech functions and their relationship with the upper limb mobility have not been analyzed. The study was aimed to assess the correlation between the motor and speech functions of children with CP, as well as to detect the changes in motor realization of speech production following complex treatment of patients including sessions of neurorehabilitation. The study involved children with CP aged 6–15. The index group ( $n = 40$ , 16 girls, 24 boys) received complex resort treatment with the course of neurorehabilitation, while the comparison group ( $n = 20$ , 10 girls, 10 boys) received standard resort treatment. A significant ( $p < 0.001$ ) correlation between the total ABILHAND-Kids score and the indicators of speech production motor realization was revealed. In patients of the index group, complex treatment with the course of neurorehabilitation resulted in the significant ( $p < 0.001$ ) decrease in hand spasticity and the increase in the total ABILHAND-Kids score and speech scores. No significant changes of these indicators were revealed in children of the comparison group. Beneficial effects of neurorehabilitation may be based on the enhanced plasticity of the neural circuits responsible for planning and execution of complex hand movements, as well as speech processes. The findings can be used to develop new methods for correction of motor and cognitive spheres in children with CP.

**Keywords:** children, cerebral palsy, speech, brain–computer interface

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

**Author contribution:** Pavlenko VB, Vlasenko SV — study planning, data analysis and interpretation, manuscript writing; Orekhova LS, Biryukova EA — data acquisition and analysis, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University (protocol № 1 of 25 January 2022). The informed consent to the children’s enrollment was obtained from their parents.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir B. Pavlenko  
Vernadsky pr., 4, Simferopol, 295007, Russia; [vpav55@gmail.com](mailto:vpav55@gmail.com)

**Received:** 17.06.2023 **Accepted:** 14.07.2023 **Published online:** 28.07.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.026

В настоящее время признается, что детский церебральный паралич (ДЦП) представляет собой гораздо больше, чем «нарушение осанки и движений», и часто связан с широким спектром дисфункций, включая когнитивные, языковые и сенсорно-перцептивные нарушения [1]. Как указано в недавней обзорной работе, расстройствами речи при ДЦП страдают 30–87% больных [2]. Степень речевых расстройств выражена сильнее при более тяжелых нарушениях двигательной сферы [1, 3–5]. Корреляционный анализ позволил выявить взаимосвязь между степенью нарушений моторики и выраженностью расстройств речи у больных с ДЦП в возрасте 10–12 лет [6].

Общность двигательных и речевых нарушений при ДЦП объясняют анатомической близостью в расположении корковых речевых и двигательных зон, а также их проводящих путей. Отмечается также функциональная общность речевой и двигательной системы, поскольку для организации любого речевого и двигательного акта необходима сохранность четкого кинестетического восприятия, которое сопровождает любое движение как артикуляционных, так и других мышц [2]. Исходя из этого, для развития речевых функций детей рекомендуют упражнения, направленные на преодоление моторной недостаточности (особенно моторики рук).

Особую актуальность в настоящее время приобретают методы реабилитации двигательных функций конечностей у пациентов с ДЦП, основанные на применении неинвазивных интерфейсов «мозг–компьютер» (НИМК) и принципов биологической обратной связи. Такие методы позволяют активизировать природные физиологические ресурсы головного мозга ребенка [7]. Первоначально в ряде исследований была показана потенциальная возможность использования НИМК у детей с ДЦП для выявления на основе анализа динамики электроэнцефалограммы (ЭЭГ) представления пациентом движения конечности или намерения его совершить [8–10]. С помощью НИМК дети управляли движением курсора или различными игровыми объектами на экране компьютера. Основываясь на результатах этих и других работ, исследователи из Южной Кореи использовали НИМК, интегрированный с электростимулятором мышц разгибателей запястья [11]. Электростимуляция запускалась на основе онлайн-анализа параметров ЭЭГ при представлении пациентом движения разгибания кисти. После серии сеансов у детей с ДЦП улучшались параметры выполнения движений рук, а также показатели концентрации внимания.

В дальнейшем для реабилитации детей с ДЦП были использованы НИМК «мозг – компьютер – экзоскелет кисти», которые выявляли характерные паттерны ЭЭГ, сопровождающие кинестетическое воображение движений, и запускали движения «рукавиц» экзоскелета [12, 13]. Было установлено, что сеансы нейрореабилитации с применением таких НИМК повышают эффективность реабилитационных мероприятий на санаторно-курортном этапе лечения. В результате снижается спастичность мышц кисти, увеличиваются сила мышц и объем движений кисти, улучшается выполнение ряда двигательных тестов, растет объем бытовых навыков, что способствует социализации пациентов с ДЦП. Однако в указанных работах не анализировали изменение речевых функций пациентов. В связи с этим цели настоящего исследования — анализ связи между двигательными и речевыми функциями детей с ДЦП, а также выявление изменений моторной реализации высказывания у пациентов в результате комплексного санаторно-курортного лечения, включающего сеансы нейрореабилитации.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Характеристика выборки

Исследования проводили на базе центра «Технологии здоровья и реабилитации» Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского, а также Государственного бюджетного учреждения Республики Крым «Санаторий для детей и детей с родителями «Чайка» им. Гелиловичей» для детей с неврологическими нарушениями. В исследовании приняли участие 60 детей в возрасте 6–15 лет, проходящие курс санаторно-курортной реабилитации. Критерии включения пациентов: наличие установленного диагноза «ДЦП» в соответствии с критериями МКБ-10; наличие у пациента в структуре неврологических нарушений гемипареза с уровнем двигательной активности не выше III по критериям классификации больших моторных функций (Gross Motor Function Classification System for Cerebral Palsy, GMFCS). Критерии исключения: отказ от участия в исследовании пациентов, родителей или их законных представителей; уровень двигательной активности по критериям GMFCS больше III; афатические нарушения; медикаментозно некорректируемая эпилепсия; нарушения зрения, не позволяющие различать инструкцию на экране; умственная отсталость умеренной, тяжелой и глубокой степеней (F71–73 по МКБ-10).

В основную группу вошли 40 человек (16 девочек, 24 мальчика) в возрасте 6–15 лет, которые прошли комплексное санаторно-курортное лечение с курсом нейрореабилитации с применением интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти» «Экзокисть-2». В группу сравнения (контрольную) были включены 20 детей (10 девочек, 10 мальчиков) в возрасте от 7 до 13 лет, которые проходили комплексное санаторно-курортное лечение по стандартным методикам. Нужно отметить, что на курс нейрореабилитации родители чаще записывали детей, которые имели более выраженные нарушения моторных функций. Таким образом, ограничением данного исследования служит отсутствие рандомизации при формировании групп пациентов. Комплексное санаторно-курортное лечение, которое получали обе группы больных, включало: лечебную физкультуру, массаж паретичных мышц, пелоидотерапию, гидрокинезиотерапию в термально-минеральной воде, электростимуляцию мышц, являющихся антагонистами паретичным.

### Оценка показателей двигательных и речевых функций

Для оценки объема движений верхних конечностей были использованы следующие шкалы.

1. Модифицированная шкала спастичности Эшворта (Modified Ashworth Scale, MAS) для оценки врачом-неврологом уровня спастичности при определении степени сопротивления пассивным движениям по 5-балльной шкале (от 0 до 4).

2. Шкала «Возможности кисти – дети» (ABILHANDKids) — тест оценки родителями двигательной функции верхней конечности ребенка в быту (3 степени возможности выполнения навыка: «невозможно», «трудно», «легко»). Данная шкала продемонстрировала быстроту реагирования и высокую чувствительность при обнаружении изменений после интенсивных тренировок у детей с ДЦП и рекомендована для мониторинга функционального состояния пациентов в клинических

исследованиях [14]. Для оценки функций в целом, кроме стандартных показателей выполнения действий (выполнить невозможно – X0, трудно – X1 и легко – X2), использовался суммарный показатель X, рассчитываемый по формуле  $X = X1 + 2X2$ , диапазон которого составляет от 0 до 42 [12].

Нейропсихологическая диагностика речевой патологии у детей проводилась в соответствии с руководством [15]. Оценивался уровень моторной реализации высказывания по трем методикам.

1. Исследование орального праксиса и артикуляционной моторики (оценка движений губ, языка, надувания щек по инструкции или по образцу). Максимальная оценка — 30 баллов.

2. Исследование звукопроизнесения (повторение слов). Максимальная оценка — 30 баллов.

3. Составление предложений по картинкам (ребенку демонстрируется ряд картинок, например, «мальчик моет руки», которые ему необходимо описать одним предложением). При этом учитывается правильность порядка слов, аграмматизмы и параграмматизмы. Максимальная оценка – 45 баллов.

### Проведение реабилитационных процедур

Каждый ребенок основной группы проходил по 10 сеансов реабилитационных процедур с помощью комплекса, включающего НИМК и экзоскелет кисти «Экзокость-2» (производства ООО «Экзопласт», г. Москва, по РУ № РЗН 2018/7681). Работа НИМК основана на анализе паттернов ЭЭГ, возникающих при воображении разгибания кисти. Программа обеспечивает выявление кинестетического воображения движения на основе анализа паттерна ЭЭГ, генерацию визуального сигнала обратной связи и формирование команд управления экзоскелетом кисти руки.

В процессе нейрореабилитационного тренинга пациенты сидели в кресле перед компьютерным монитором, на котором им предъявляли визуальные инструкции. Кисти рук размещались внутри «рукавиц» экзоскелета. В центре экрана находилась округлая метка белого цвета, служившая для фиксации взгляда, и расположенные вокруг нее три стрелки, менявшие цвет для обозначения инструкций. Пациент выполнял следующие команды: расслабиться, кинестетически воображать движение разгибания кисти левой или правой руки. Для создания конкретного кинестетического образа при воображении движения детям давали инструкцию: «Представь, что у тебя в руке маленький мячик, ты раскрываешь кисть и роняешь его. Почувствуй это движение». При точном выполнении пациентом задания фиксирующая взор метка окрашивалась в зеленый цвет (интенсивность цвета зависела от параметров ЭЭГ), экзоскелет выполнял соответствующее движение, и кисть руки пассивно разгибалась. Таким образом, генерировался комбинированный зрительный и кинестетический сигнал обратной связи.

Первичную оценку объема движений верхних конечностей и показателей речевых функций у детей основной и контрольной групп проводили на второй день после поступления в санаторий. Начиная с третьего дня санаторно-курортного лечения пациенты основной группы проходили курс нейрореабилитации из 10 сеансов (ежедневно, за исключением выходного дня в воскресенье) по одинаковой схеме: три сессии в сеанс по 8 мин с перерывом на отдых не менее 5 мин. В течение сеанса задание на воображение движений каждой руки повторяли

24 раза. Доля правильных ответов классификатора (при которых срабатывал экзоскелет и пассивно разгибалась кисть) в первом–втором сеансе составляла около 60%, достигая, по мере тренировки пациента, к концу курса уровня 75–80%. На следующий день после окончания курса (14–15-й день пребывания в санатории) данные о двигательной и речевой активности у пациентов основной группы собирали вторично. На 14–15-й день санаторно-курортного лечения оценивали и показатели пациентов контрольной группы.

Остальные подробности методики описаны ранее [12, 16].

### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы Statistica 12 (StatSoft Inc.; США). Распределение исследуемых показателей оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего, а для оценки межгрупповых различий использовали *t*-критерий Стьюдента. В случае, если распределение отличалось от нормального, статистические данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха  $Me [Q_1; Q_3]$ , а для оценки межгрупповых различий использовали *U*-критерий Манна–Уитни, внутригрупповых — *T*-критерий Уилкоксона. Коэффициенты корреляции рассчитывали с применением критерия Спирмена. Различия и коэффициенты корреляции считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Показатели двигательных и речевых функций до реабилитационных процедур

Средний возраст детей основной и контрольной групп составил  $10,2 \pm 0,4$  и  $10,1 \pm 0,3$  года соответственно, и значительно не различался ( $p = 0,92$ ). У больных основной группы левосторонний гемипарез выявлен у 11, правосторонний — у 29 участников исследования. В группе сравнения (контрольной) у семи детей выявлен левосторонний, у 13 — правосторонний гемипарез. У пациентов с левосторонним гемипарезом показатели по суммарному показателю «Возможности кисти — дети» составили 27 [19; 34] баллов, а у детей с правосторонним гемипарезом они были несколько ниже — 23 [12; 32] баллов. Однако различия по данному показателю между пациентами с лево- и правосторонним гемипарезом не достигали уровня статистической значимости ( $p = 0,27$ ). Также у пациентов с правосторонним гемипарезом были ниже показатели звукопроизнесения, орального праксиса и составления предложений, чем у детей с левосторонним нарушением моторики, но и в этих случаях различия не являлись статистически значимыми ( $p = 0,18–0,93$ ).

Показатели уровня спастичности кистей рук у пациентов основной группы и группы сравнения представлены в табл. 1, выполнение бытовых навыков по шкале «Возможности кисти — дети» (баллы) — в табл. 2, а характеристики уровня моторной реализации высказывания — в табл. 3. До лечения статистически значимых различий между показателями групп не было.

Расчет коэффициентов корреляции по Спирмену показал, что показатель спастичности левой кисти, установленный до лечения у всех обследованных детей



**Таблица 1.** Показатели уровня спастичности кистей рук по шкале Эшворт у пациентов основной группы и группы сравнения до и после лечения (Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>])

Спастичность (баллы)	До лечения	После лечения	<i>p</i>
Основная группа, <i>n</i> = 40			
Левая кисть	2,0 [1,5; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	<i>p</i> < 0,001
Правая кисть	2,0 [2,0; 3,0]	2,0 [1,0; 2,0]	<i>p</i> < 0,001
Группа сравнения, <i>n</i> = 20			
Левая кисть	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [1,0; 2,0]	<i>p</i> = 0,028
Правая кисть	2,5 [1,0; 3,0]	2,0 [1,0; 2,5]	<i>p</i> = 0,018

(*n* = 60), отрицательно связан со значениями показателей орального праксиса и артикуляционной моторики, звукопроизнесения, составления предложений по картинкам ( $r = -0,37, -0,36, -0,30$  при  $p = 0,004, 0,005$  и  $0,019$  соответственно). Показатель спастичности правой кисти был статистически значимо связан с показателями звукопроизнесения ( $r = -0,49$  при  $p < 0,001$ ), т. е. чем выше уровень спастичности кистей рук, тем ниже уровень моторной реализации высказывания. Величина суммарного показателя «Возможности кисти — дети», с одной стороны, и значения показателей орального праксиса, звукопроизнесения и составления предложений по картинкам, с другой, статистически значимо (во всех случаях  $p < 0,001$ ) позитивно связаны —  $r = 0,69, 0,62, 0,62$  соответственно, т. е. чем сохраннее функции верхних конечностей, тем выше уровень моторной реализации высказывания. Пример такой взаимосвязи между показателем функций рук и способностью к адекватному звукопроизнесению представлен на рисунке.

#### Показатели двигательных и речевых функций после реабилитационных процедур

Как после стандартного санаторно-курортного лечения, так и после комплексной терапии с курсом нейрореабилитации в обеих группах детей обнаружено статистически значимое снижение спастичности кисти левой и правой рук (табл. 1). Однако анализ выполнения бытовых навыков по оценкам родителей (суммарный показатель «Возможности кисти — дети») позволил выявить статистически значимое улучшение лишь в основной группе (табл. 2). Статистически значимое улучшение уровня моторной реализации высказывания тоже выявлено только у детей основной группы (табл. 3). Оральный праксис, звукопроизнесение и составление предложений по картинкам являются компонентами речевых способностей и могут быть рассмотрены как

повторяющиеся измерения, что требует применения поправки Бонферрони для четырех сравнений. Однако статистическая значимость изменений (как видно из значений *p*) сохраняется и с учетом данной поправки.

Нужно отметить, что статистически значимых различий между группами по анализируемым показателям после лечения не обнаружено. Возможной причиной является то, что, исходя из желания родителей, в основную группу, где использовалось более сложное лечение с курсом нейрореабилитации, вошли дети с несколько более низкими показателями бытовых навыков и моторной реализации высказывания. Даже после лечения их показатели не превысили статистически значимо уровень показателей группы сравнения.

В то же время об эффективности комплексного санаторно-курортного лечения, включающего реабилитационные процедуры с применением курса нейрореабилитации, дополнительно свидетельствуют следующие факты. В основной группе из 40 детей улучшение орального праксиса и артикуляции наблюдалось у 33 (83%), звукопроизнесения — у 24 (60%), составления предложений — у 31 (78%) пациента. Из 20 детей группы сравнения, прошедших лишь стандартное санаторно-курортное лечение, улучшение показателей орального праксиса и артикуляции или звукопроизнесения установлено лишь у трех (15%), а составления предложений — у четырех (20%) пациентов.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами получены данные, свидетельствующие о связи показателей функционирования верхних конечностей и уровня моторной реализации высказывания. Результаты исследования подтверждают теорию о том, что действия, включающие последовательность элементов мелкой моторики, и действия, обеспечивающие производство речи, задействуют общую когнитивно-

**Таблица 2.** Выполнение бытовых навыков по шкале «Возможности кисти — дети» у пациентов основной группы и группы сравнения до и после лечения (Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>])

Выполнение бытовых навыков (баллы)	До лечения	После лечения	<i>p</i>
Основная группа, <i>n</i> = 40			
Невозможно	1,5 [0,0; 7,0]	0,0 [0,0; 6,0]	<i>p</i> = 0,001
Трудно	8,0 [3,5; 14,0]	7,0 [3,0; 13,0]	<i>p</i> = 0,055
Легко	6,0 [0,0; 12,0]	7,0 [0,0; 16,0]	<i>p</i> < 0,001
Суммарный показатель	23,0 [14,0; 33,0]	27,0 [16,0; 37,0]	<i>p</i> < 0,001
Группа сравнения, <i>n</i> = 20			
Невозможно	2,0 [0,5; 4,5]	2,0 [0,0; 3,0]	<i>p</i> = 0,068
Трудно	9,0 [6,0; 13,0]	8,0 [6,0; 13,5]	<i>p</i> = 0,593
Легко	7,0 [4,0; 12,0]	7,0 [4,0; 12,0]	<i>p</i> = 0,593
Суммарный показатель	27,5 [13,5; 33,0]	27,5 [15,5; 32,5]	<i>p</i> = 0,593

Таблица 3. Уровень моторной реализации высказывания у пациентов основной группы и группы сравнения до и после лечения (Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>])

Речевой показатель (баллы)	До лечения	После лечения	<i>p</i>
Основная группа, <i>n</i> = 40			
Оральный праксис и артикуляция	20,0 [13,0; 25,0]	24,0 [16,0; 27,0]	<i>p</i> < 0,001
Звукопроизнесение	18,0 [12,0; 26,0]	20,0 [12,0; 28,0]	<i>p</i> < 0,001
Составление предложений	22,0 [5,0; 35,0]	25,0 [6,0; 40,0]	<i>p</i> < 0,001
Группа сравнения, <i>n</i> = 20			
Оральный праксис и артикуляция	23,0 [14,0; 27,0]	23,0 [15,5; 26,0]	<i>p</i> = 0,800
Звукопроизнесение	21,5 [12,0; 25,0]	21,5 [13,0; 25,0]	<i>p</i> = 0,109
Составление предложений	24,0 [18,5; 36,0]	25,5 [19,0; 37,0]	<i>p</i> = 0,237

моторную нейронную сеть [3]. Показано, что улучшение функций рук детей с ДЦП после серии сеансов нейрореабилитации сопровождается ростом показателей орального праксиса и артикуляции, звукопроизнесения и составления предложений по картинкам. Основой таких сочетанных изменений может быть усиление процессов пластичности не только нейронных цепей моторных и сенсомоторных зон неокортекса, контролирующих планирование и выполнение сложных движений рук у пациентов, но и находящихся в непосредственной близости классических зон речеобразования (например, зоны Брока), которые демонстрируют повышенную активацию во время выполнения последовательных движений верхних конечностей [17]. Интересно отметить, что совершенствование мелкой моторики у здоровых испытуемых в недавних экспериментах по обучению изготовлению каменных орудий также приводило к развитию нервных центров и путей, участвующих в генерации речи [18, 19].

Одной из причин усиления пластичности нервной ткани может быть перестройка синтеза и связывания нейротрофических факторов, секретируемых преимущественно нейронами и глией. Показано, что успешная реабилитация детей с ДЦП с применением

интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти» тесно ассоциирована с уменьшением концентрации нейротрофического фактора мозга (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) в периферической крови после завершения восстановительного лечения [16]. В указанной работе уменьшение концентрации BDNF можно расценивать как следствие сеансов нейрореабилитации. Считают, что такое уменьшение свидетельствует об активном связывании и интернализации данного фактора непосредственно в нервной ткани, что ведет к множественным эффектам: росту аксонов, созреванию дендритов и повышению синаптической пластичности.

#### ВЫВОДЫ

Проведенное исследование подтвердило наличие у детей с ДЦП статистически значимой (*p* < 0,001) взаимосвязи между величиной суммарного показателя «Возможности кисти — дети» и значениями показателей моторной реализации высказывания (орального праксиса, звукопроизнесения и составления предложений по картинкам). Комплексная терапия с применением интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти» привела у пациентов с ДЦП к статистически значимым (*p* < 0,001)

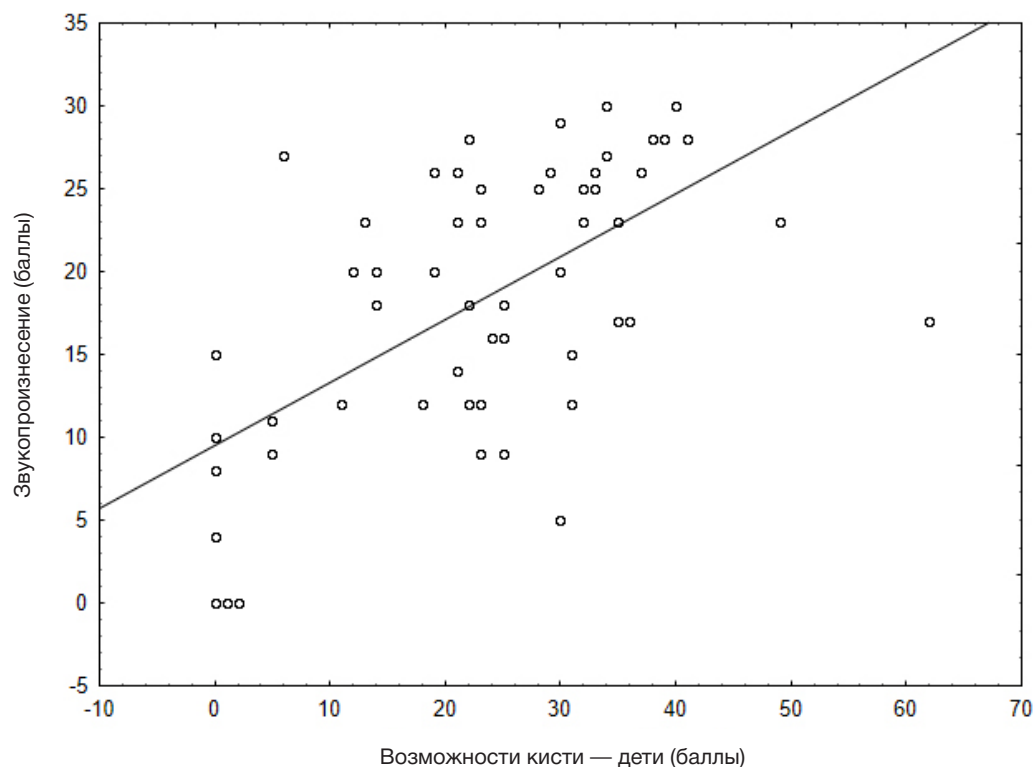


Рис. Взаимосвязь между показателями шкалы «Возможности кисти — дети» (ABILHANDKids) и звукопроизнесением у 60 детей с ДЦП

снижению спастичности кисти рук, росту суммарного показателя «Возможности кисти — дети» и показателей моторной реализации высказывания. Основой таких сочетанных изменений может быть усиление процессов пластичности нейронных цепей неокортекса,

контролирующих планирование и выполнение сложных движений рук, а также речевые процессы. Полученные данные могут быть использованы при разработке новых методов коррекции двигательной и когнитивной сферы детей с ДЦП.

## Литература

- Fluss J, Lidzba K. Cognitive and academic profiles in children with cerebral palsy: A narrative review. *Ann Phys Rehabil Med.* 2020; 63 (5): 447–56. DOI: 10.1016/j.rehab.2020.01.005.
- Немкова С. А. Речевые нарушения при детском церебральном параличе: диагностика и коррекция. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2019; 119 (5): 112–9. DOI: 10.17116/jnevro2019119051112.
- Pirila S, van der Meere J, Pentikainen T, Ruusu-Niemi P, Korpela R, Kilpinen J, et al. Language and motor speech skills in children with cerebral palsy. *J Commun Disord.* 2007; 40 (2): 116–28. DOI: 10.1016/j.jcomdis.2006.06.002.
- Koopmans C, Sakash A, Soriano J, Long HL, Hustad KC. Functional communication abilities in youth with cerebral palsy: association with impairment profiles and school-based therapy goals. *Lang Speech Hear Serv Sch.* 2022; 53 (1): 88–103. DOI: 10.1044/2021\_LSHSS-21-00064.
- Vaillant E, Geytenbeek JJM, Oostrom KJ, Beckerman H, Vermeulen RJ, Buizer AI. Determinants of spoken language comprehension in children with cerebral palsy. *Disabil Rehabil.* 2023; 45 (10): 1667–79. DOI: 10.1080/09638288.2022.2072960.
- Soriano JU, Hustad KC. Speech-language profile groups in school aged children with cerebral palsy: nonverbal cognition, receptive language, speech intelligibility, and motor function. *Dev Neurorehabil.* 2021; 24 (2): 118–29. DOI: 10.1080/17518423.2020.1858360.
- Федотова И. Р., Бобров П. Д. Предпосылки и особенности использования воображения движения и интерфейса мозг-компьютер в реабилитации при детском церебральном параличе. *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова.* 2022; 72 (1): 87–99. DOI: 10.31857/S004446772201004X.
- Daly I, Billinger M, Laparra-Hernández J, Aloise F, Lloria García M, Faller J, Scherer R, Müller-Putz G. On the control of brain-computer interfaces by users with cerebral palsy. *Clin Neurophysiol.* 2013; 124 (9): 1787–97. DOI: 10.1016/j.clinph.2013.02.118.
- Jochumsen M, Shafique M, Hassan A, Niazi IK. Movement intention detection in adolescents with cerebral palsy from single-trial EEG. *J Neural Eng.* 2018; 15(6): 066030. DOI: 10.1088/1741-2552/aae4b8.
- Jadavji Z, Zhang J, Pafraath B, Zewdie E, Kirton A. Can Children With Perinatal Stroke Use a Simple Brain Computer Interface? *Stroke.* 2021; 52 (7): 2363–70. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.030596.
- Kim T-W, Lee B-H. Clinical usefulness of brain-computer interface-controlled functional electrical stimulation for improving brain activity in children with spastic cerebral palsy: a pilot randomized controlled trial. *J Phys Ther Sci.* 2016; 28: 2491–94. DOI: 10.1589/jpts.28.2491.
- Ларина Н. В., Корсунская Л. Л., Власенко С. В. Комплекс «Экзокисть-2» в реабилитации верхней конечности при детском церебральном параличе с использованием неинвазивного интерфейса «мозг-компьютер». *Невро-мышечные болезни.* 2019; 11 (4): 12–20. DOI: 10.17650/2222-8721-2019-9-4-44-50.
- Бобров П. Д., Бирюкова Е. В., Поляев Б. А., Лайшева О. А., Усачёва Е. Л., Соколова А. В. и др. Реабилитация больных с детским церебральным параличом с помощью экзоскелета кисти, управляемого интерфейсом «мозг-компьютер». *Вестник РГМУ.* 2020; (4): 34–41. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.047.
- Bleyenheuft Y, Gordon AM, Rameckers E, Thonnard JL, Arnould C. Measuring changes of manual ability with ABILHAND-Kids following intensive training for children with unilateral cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2017; 59 (5): 505–11. DOI: 10.1111/dmcn.13338.
- Фотекова Т. А., Ахутина Т. В. Нейропсихологическая диагностика речевой патологии у детей. *Школьный психолог.* 2001; 37: 3–14.
- Ларина Н. В., Гордиенко А. И., Власенко С. В., Химич Н. В., Корсунская Л. Л., Павленко В. Б. Динамика концентрации нейротрофического фактора мозга в крови как предиктор долгосрочной эффективности применения программно-аппаратного комплекса в реабилитации детей с детским церебральным параличом. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2020; 15 (4): 496–9. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15116.
- Hodgson JC, Hirst RJ, Hudson JM. Hemispheric speech lateralisation in the developing brain is related to motor praxis ability. *Dev Cogn Neurosci.* 2016; 22: 9–17. DOI: 10.1016/j.dcn.2016.09.005.
- Станкова Е. П., Кручинина О. В., Шеповальников А. Н., Гальперина Е. И. Эволюция центральных механизмов устной речи. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2020; 56 (3): 171–84. DOI: 10.31857/S0044452920030079.
- Hecht EE, Pargeter J, Khreisheh N, Stout D. Neuroplasticity enables bio-cultural feedback in Paleolithic stone-tool making. *Sci Rep.* 2023; 13 (1): 2877. DOI: 10.1038/s41598-023-29994-y.

## References

- Fluss J, Lidzba K. Cognitive and academic profiles in children with cerebral palsy: A narrative review. *Ann Phys Rehabil Med.* 2020; 63 (5): 447–56. DOI: 10.1016/j.rehab.2020.01.005.
- Nemkova SA. Rechevye narusheniya pri detskom cerebral'nom paraliche: diagnostika i korrekciya. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2019; 119 (5): 112–9. DOI: 10.17116/jnevro2019119051112. Russian.
- Pirila S, van der Meere J, Pentikainen T, Ruusu-Niemi P, Korpela R, Kilpinen J, et al. Language and motor speech skills in children with cerebral palsy. *J Commun Disord.* 2007; 40 (2): 116–28. DOI: 10.1016/j.jcomdis.2006.06.002.
- Koopmans C, Sakash A, Soriano J, Long HL, Hustad KC. Functional communication abilities in youth with cerebral palsy: association with impairment profiles and school-based therapy goals. *Lang Speech Hear Serv Sch.* 2022; 53 (1): 88–103. DOI: 10.1044/2021\_LSHSS-21-00064.
- Vaillant E, Geytenbeek JJM, Oostrom KJ, Beckerman H, Vermeulen RJ, Buizer AI. Determinants of spoken language comprehension in children with cerebral palsy. *Disabil Rehabil.* 2023; 45 (10): 1667–79. DOI: 10.1080/09638288.2022.2072960.
- Soriano JU, Hustad KC. Speech-language profile groups in school aged children with cerebral palsy: nonverbal cognition, receptive language, speech intelligibility, and motor function. *Dev Neurorehabil.* 2021; 24 (2): 118–29. DOI: 10.1080/17518423.2020.1858360.
- Fedotova IR, Bobrov PD. Predposylki i osobennosti ispol'zovaniya voobrazheniya dvizheniya i interfejsa mozg-komp'yuter v reabilitacii pri detskom cerebral'nom paraliche. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatelnosti im. I. P. Pavlova.* 2022; 72 (1): 87–99. DOI: 10.31857/S004446772201004X. Russian.

8. Daly I, Billinger M, Laparra-Hernández J, Aloise F, Lloria García M, Faller J, Scherer R, Müller-Putz G. On the control of brain-computer interfaces by users with cerebral palsy. *Clin Neurophysiol.* 2013; 124 (9): 1787–97. DOI: 10.1016/j.clinph.2013.02.118.
9. Jochumsen M, Shafique M, Hassan A, Niazi IK. Movement intention detection in adolescents with cerebral palsy from single-trial EEG. *J Neural Eng.* 2018; 15(6): 066030. DOI: 10.1088/1741-2552/aae4b8.
10. Jadavji Z, Zhang J, Paffrath B, Zewdie E, Kirton A. Can Children With Perinatal Stroke Use a Simple Brain Computer Interface? *Stroke.* 2021; 52 (7): 2363–70. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.030596.
11. Kim T-W, Lee B-H. Clinical usefulness of brain-computer interface-controlled functional electrical stimulation for improving brain activity in children with spastic cerebral palsy: a pilot randomized controlled trial. *J Phys Ther Sci.* 2016; 28: 2491–94. DOI: 10.1589/jpts.28.2491.
12. Larina NV, Korsunskaya LL, Vlasenko SV. Комплекс «Экзокист'-2» в реабилитации верхней конечности при детском церебральном параличе с испол'зованием неинвазивного интерфейса «mozg-komp'yuter». *Nervno-myshechnye bolezni.* 2019; 11 (4): 12–20. DOI: DOI: 10.17650/2222-8721-2019-9-4-44-50. Russian.
13. Bobrov PD, Biryukova EV, Polyayev BA, Lajsheva OA, Usachjova EL, Sokolova AV, et al. Rehabilitation of patients with cerebral palsy using hand exoskeleton controlled by brain-computer interface. *Bulletin of RSMU.* 2020; (4): 33–40. DOI: 10.24075/brsmu.2020.047.
14. Bleyenheuft Y, Gordon AM, Rameckers E, Thonnard JL, Arnould C. Measuring changes of manual ability with ABILHAND-Kids following intensive training for children with unilateral cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2017; 59 (5): 505–11. DOI: 10.1111/dmcn.13338.
15. Fotekova TA, Ahutina TV. Nejropsihologicheskaya diagnostika rechevoj patologii u detej. *Shkol'nyj psiholog.* 2001; (37): 3–14. Russian.
16. Larina NV, Gordienko AI, Vlasenko SV, Himich NV, Korsunskaya LL, Pavlenko VB. Dinamika koncentracii nejrotroficheskogo faktora mozga v krvi kak prediktor dolgosrochnoj effektivnosti primeneniya programmno-apparatnogo kompleksa v rehabilitacii detej s detskim cerebral'nym paralichom. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza.* 2020; 15 (4): 496–9. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15116. Russian.
17. Hodgson JC, Hirst RJ, Hudson JM. Hemispheric speech lateralisation in the developing brain is related to motor praxis ability. *Dev Cogn Neurosci.* 2016; 22: 9–17. DOI: 10.1016/j.dcn.2016.09.005.
18. Stankova EP, Kruchinina OV, Shepovnikov AN, Galperina EI. Evolyuciya central'nyh mekhanizmov ustnoj rechi. *Zhurnal evolyucionnoj biohimii i fiziologii.* 2020; 56 (3): 171–184. DOI: 10.31857/S0044452920030079. Russian.
19. Hecht EE, Pargeter J, Khreisheh N, Stout D. Neuroplasticity enables bio-cultural feedback in Paleolithic stone-tool making. *Sci Rep.* 2023; 13 (1): 2877. DOI: 10.1038/s41598-023-29994-y.



## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

О. А. Гусякова, С. В. Смирнов <sup>✉</sup>, О. Ю. Кузнецова, А. Р. Апергенова, А. Р. Альбикова

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое нейродегенеративное заболевание с характерными неврологическими расстройствами у пациентов, поражающее преимущественно дофаминергические нейроны черной субстанции с накоплением в телах нейронов нейротоксичных доз агрегатов белка  $\alpha$ -синуклеина. В статье представлен взгляд авторов на отдельные патохимические и биохимические аспекты развития болезни Паркинсона во взаимосвязи путей обмена катехоламинов и пигментов, в частности возможного пути синтеза нейромеланина в телах нейронов и его значение в жизни клетки. Дана оценка определенным, имеющим прямое патогномичное значение, биомаркерам нейродегенеративной патологии в лабораторной диагностике этого заболевания. Предложено использовать полученные результаты в сфере глубокого понимания биохимических процессов, лежащих в основе нейрональной смерти, для ранней диагностики БП в разных возрастных группах и дальнейшего изучения патогенеза на основе фундаментальной биохимии и патобиохимии процессов, протекающих в клетке.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, дофамин, дофаминовые рецепторы, ключевые аспекты патохимии и патогенеза, биомаркеры

**Благодарности:** выражаем благодарность за помощь сотрудникам кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, в частности профессору, д.м.н. Ф. Н. Гильмияровой, доценту, к.ф.н. А. В. Ждановой в подготовке материалов и дизайну рукописи.

**Вклад авторов:** О. А. Гусякова — анализ литературы; С. В. Смирнов — сбор данных в сфере фундаментальной биохимии; О. Ю. Кузнецова — анализ и интерпретация научных данных; А. Р. Апергенова, А. Р. Альбикова — подготовка рукописи.

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

**Статья получена:** 24.07.2023 **Статья принята к печати:** 14.08.2023 **Опубликована онлайн:** 29.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.030

## PROMISING BIOCEMICAL MARKERS OF PARKINSON'S DISEASE

Gusyakova OA, Smirnov SV <sup>✉</sup>, Kuznetsova OYu, Apergenova AR, Albikova AR

Samara State Medical University, Samara, Russia

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disease associated with specific neurological deficits in patients, it mainly affects dopaminergic neurons in the substantia nigra causing accumulation of the neurotoxic amounts of aggregated  $\alpha$ -synuclein protein in the neuronal cell bodies. The paper reports the authors' view of certain pathochemical and biochemical aspects of the Parkinson's disease development in terms of interplay between the metabolic pathways of catecholamines and pigments, particularly the possible pathway of neuromelanin synthesis in the neuronal cell bodies and its importance in the life of cells. Assessment of the use of certain neurodegenerative disorder biomarkers, which are of direct pathognomonic value, in the laboratory diagnosis of the disease is provided. It is suggested to use the results in the field of deeper understanding of biochemical patterns underlying neuronal death for early diagnosis of PD in individuals of different age groups, as well as for further study of pathogenesis based on fundamental biochemistry and pathobiochemistry of intracellular processes.

**Keywords:** Parkinson's disease, dopamine, dopamine receptors, key aspects of pathochemistry and pathogenesis, biomarkers

**Acknowledgments:** we would like to thank staff members of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnosis at the Samara State Medical University, specifically Professor F.N. Gilmiyarova, D. Sc. (Medicine), and Associate Professor A.V. Zhdanova, Cand. Sc. (Pharmacy), for their help in manuscript drafting and design.

**Author contribution:** Gusyakova OA — literature analysis; Smirnov SV — data acquisition in the field of fundamental biochemistry; Kuznetsova OYu — research data analysis and interpretation; Apergenova AR, Albikova AR — manuscript writing.

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

**Received:** 24.07.2023 **Accepted:** 14.08.2023 **Published online:** 29.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.030

Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое нейродегенеративное и нейровоспалительное заболевание, при котором развиваются моторные и немоторные нарушения. Оно поражает преимущественно дофаминергические нейроны черной субстанции с накоплением в клетках белка  $\alpha$ -синуклеина и телец Леви. Вероятность развития БП возрастает у лиц старше 65 лет, распространенность составляет около 140 случаев на 100 тыс. населения. Заболеваемость БП в 1,5 выше у мужчин, что может быть связано с подверженностью токсическим веществам, черепно-мозговым травмам, генетическим дефектам, связанным с X-хромосомой, но наибольшее внимание исследователи уделяют нейропротективной роли эстрогенов. Учитывая медленный темп изучения механизмов развития данной болезни, отсутствие описания ключевых аспектов патобиохимии с углубленным химизмом

тех или иных процессов, понимания химической сути поведения конкретных веществ, имеющих диагностическую ценность, это заболевание можно считать актуальной медико-социальной проблемой преимущественно для лиц старших возрастных групп [1–11]. Цель работы — представить читателю свой взгляд на отдельные патохимические аспекты развития болезни Паркинсона и лабораторную ценность некоторых биомаркеров.

### Взаимосвязь биосинтеза дофамина и меланина

Синтез нейромеланина осуществляется непосредственно из катехоламинов. L-ДОФА (L-диоксифенилаланин) как предшественник дофамина подвергается в нативных условиях гидроксилации и декарбоксилации. Альтернативный путь обмена медиатора и его

предшественника заключается в эндосомном накоплении медиатора, который посредством специфического транспортера (VMAT2) переходит в митохондрии, где биотрансформируется дальше моноаминоксидазой (MAO). Излишне накопленный дофамин и ДОФА окисляются железосодержащими ферментами до хинонов и семихинонов и запасаются в форме нейромеланина [12, 13]. Точная структура и функции нейромеланина до сих пор неясны. Попробуем смоделировать структуру возможного образования полимера нейромеланина в циклическом молекулярном исполнении и предложить данную структуру на обсуждение читателю. Ниже представлена структура диоксииндола (рис. 1). Данный конденсированный гетероцикл обладает довольно интересными свойствами, которые позволяют пролить свет на его биохимическое поведение в телах нейронов ЦНС и роль как возможного мономера нейромеланина.

В частности, гидроксильная боковая группа, являясь преимущественно орто-ориентантом, дает возможность соединяться за счет боковой сшивки, на наш взгляд, бензольных ядер бензпиррольной бициклической системы индола через орто-присоединение в линейную структуру нейромеланина. Однако иную картину взаимодействия следует ожидать, исходя из свойств пиррольной части молекулы индола. Именно за счет пиррольных колец возможно образование продукта межмолекулярной циклизации, аналогичной незамещенным порфинам с образованием тетрадиоксииндола. За счет +M-эффекта восьми OH-групп в циклической структуре сильнее стабилизируется делокализованная  $\pi$ -сопряженная система и усиливаются ее хелатирующие свойства к центру (как у гема), но при этом надо учитывать и усиление кислотных свойств по фенольному типу у латеральных OH-групп бензольного ядра молекулы (рис. 2).

Учитывая то обстоятельство, что ионы железа  $Fe^{3+}$  накапливаются внутриклеточно в составе ферритиновых мицелл, проходя через апоферритин, возможно богатый остатками аминокислоты триптофана, ионы железа  $Fe^{2+}$  окисляются и остаются в мицеллярном ядре в форме сложного комплексона следующего биохимического состава:  $[(FeO^+OH)_8(FeO^+OPO_3H_2)]$ . Можно видеть аналогичное стехиометрическое соотношение OH-групп (выделено жирным), способных принимать участие в удержании ионов железа в степени окисления +3. При этом помимо перичиклического «адсорбирования» циклическим вариантом нейромеланина восьми трехвалентных ионов железа центральная хелатирующая часть, по всей видимости, обладает способностью необратимо восстанавливать ионы  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ . Это представляет определенную опасность для жизни клетки и лежит в основе нейронной гибели. Дело в том, что ионы железа в такой структуре, несмотря на то что она аналогична порфириновой, не способны выполнять ту же функцию, что в геме транспортных веществ с неизменной степенью окисления +2 либо в составе цитохромов, где железо представляет собой фактически окислительно-восстановительную пару:  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ . Таким образом и создается внутриклеточное накопление ионов железа в степени окисления +2, как мощного восстановителя, что провоцирует окислительный стресс и со временем смерть клетки.

### Биохимические свойства и функции дофамина

Медиатор нейроэндокринной и паракринной регуляции периферических органов дофамин не проникает

через гематоэнцефалический барьер. Рецепторы дофамина относятся к рецепторам трансмембранного метаботропного типа, работающим с G-белками. С появлением техники генного клонирования было выявлено пять подтипов рецепторов дофамина:  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ ,  $D_5$ . Дофаминергические рецепторы относятся к «медленным» G-протеин-связанным (от англ. *guanine*) рецепторам, использующим вторичные внутриклеточные медиаторы (в данном случае циклический 3-5-аденозинмонофосфат, или цАМФ) — в отличие от «быстрых» рецепторов (например, ГАМК-рецепторов), которые напрямую связываются с лиганд-пропускающими каналами. Рецепторы подразделяются на две основные группы: 1)  $D_1$ -подобные ( $D_1$ ,  $D_5$ ) активируют аденилатциклазу, их активация вызывает релаксацию мышц и расширение сосудов; 2)  $D_2$ -подобные ( $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ ) — пресинаптические в симпатических нервах — ингибируют аденилатциклазу, их активация вызывает усиление эффектов катехоламинов. В центральной нервной системе (ЦНС) важна их роль в регуляции движения, а также реализации когнитивных функций. Рецепторы подгрупп  $D_{1A}$  и  $D_{2A}$  регулируют функции сердечно-сосудистой системы. При болезни Паркинсона можно наблюдать разрушение черной субстанции или патологию  $D_1$ -подобных рецепторов; идет снижение выработки дофамина и уменьшение влияния на рецепторы [8, 9].

### Лабораторные признаки БП

#### *В сыворотке крови и ротовой жидкости*

Пресинаптический белок  $\alpha$ -синуклеин участвует в процессах везикулярного транспорта синаптических пузырьков и последующем высвобождении нейротрансмиттеров. Существуют три изоформы  $\alpha$ -синуклеина, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга: 140 аминокислот (основная форма), 126 аминокислот и 112 аминокислот. Основная форма  $\alpha$ -синуклеина состоит из гидрофобной центральной области (неамилоидного компонента), аминотерминальной области, которая содержит повторяющиеся последовательности аминокислот, а также из отрицательно заряженной кислотной С-концевой области, содержащей несколько сайтов фосфорилирования и доменов, отвечающий за шаперонную активность  $\alpha$ -синуклеина. N-концевая область схожа с липид-связывающим доменом аполипопротеинов, что свидетельствует о способности  $\alpha$ -синуклеина взаимодействовать с липидами мембран. Есть предположение, что этот белок в клетке существует в двух формах: нативной и мембран-связывающей. В нативной форме  $\alpha$ -синуклеин — несвернутый белок, обладающий неупорядоченной спиральной структурой. В патохимии заболевания имеет значение именно увеличение нейротоксических агрегатов данного небольшого по размеру белка [3].

Белок 7 болезни Паркинсона (белок DJ-1) участвует в клеточных функциях, включая регуляцию транскрипции и ответ на окислительный стресс, оба процесса прямо связаны с нейродегенерацией. Мутации в гене, кодирующем этот белок, являются редкой причиной аутосомно-рецессивной формы БП, при этом нарушается способность DJ-1 к димеризации, его стабильность и фолдинг. Функции белка DJ-1 включают действие в качестве антиоксиданта, коактиватора транскрипции и молекулярного шаперона. В различных компартментах клетки данный белок обладает разными каталитическими и

некаталитическими функциями: в ядре клетки белок DJ-1 действует как коактиватор различных сигнальных путей, предотвращая гибель клеток; в митохондриях он входит в состав синтасом, где он взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей АТФ-синтазы. Уменьшение уровня нормального белка приводит к снижению его нейропротективной функции при окислительном стрессе [6, 14].

Мочевая кислота: риск развития БП обратно пропорционален уровню мочевой кислоты в плазме крови. Благодаря своим двойным связям как ненасыщенная и электронно-дефицитная гетероциклическая структура мочевая кислота способна к антиоксидантной активности [7, 8, 10–12]. Такое ее свойство может лежать в основе общей антиокислительной емкости плазмы крови и ликвора, защищая наш организм от реактивных форм кислорода и азота (синглетного кислорода, гидроксильных радикалов, перекиси водорода и пероксонитрита).

#### В плазме крови

Появление аутоантител в плазме крови при БП обусловлено хроническим повреждением и дегенерацией нейронов. Продуктами деградации нейронов являются нейропептиды, нуклеофактор-200, S100 и др. Это инициирует запуск аутоиммунного компонента патогенеза заболевания, результатом которого является синтез специфических АТ (молекула межклеточной адгезии 4, миотилин, фибронектин, фактор элонгации-1 альфа-1).

#### В ликворе

При высоком уровне интерлейкина-6 (IL6) риск БП увеличивается в 3,5 раза, что служит биомаркером нейровоспалительного процесса. Интерлейкин-6 относится к семейству IL6-цитокинов, другими представителями которого являются IL11, IL27, IL31 и пр. Биологическая активность IL6 связана с его способностью активировать гены-мишени, участвующие в процессах дифференцировки, выживаемости, апоптоза и пролиферации клеток. IL6 участвует в передаче внутриклеточного сигнала, что приводит к активации тирозинкиназы, вызывающей фосфорилирование факторов транскрипции, которые

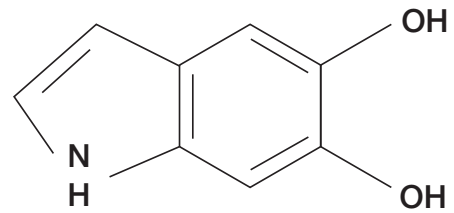


Рис. 1. Химическая структура диоксииндола — возможного мономера нейромеланина из «эумеланинового» пути обмена тирозина

регулируют синтез IL6. Провоспалительным эффектом IL6 является стимуляция острофазного воспалительного ответа, связанного с увеличением экспрессии гена IL6 в печени и проявляющегося в повышении концентрации белков острой фазы воспаления (в первую очередь С-реактивного белка и гаптоглобина). На одном из его патохимических механизмов, на наш взгляд, может быть основан его провоспалительный эффект при высоком содержании в спинномозговой жидкости на клетки глии, а также снижение биосинтеза нейротрофических пептидов (относящихся к группе NTFs-биомолекул пептидной природы, реализующих как и IL6 сигнальные пути через gp130 в мембранном аппарате нейронов), которые в норме способствуют выживанию нейронов головного мозга при окислительном стрессе. При воспалении эта группа цитокинов выполняет, по-видимому, роль противовоспалительных внутриклеточных факторов по аналогии с противовоспалительными миокинами мышечной ткани, относящимися биохимически к той же группе родственных биомолекул [15].

#### Мочевая кислота

Интересен, на наш взгляд, биохимический потенциал мочевой кислоты при нейродегенеративных расстройствах. Как известно, данная органическая кислота имеет две таутомерные формы — лактимную и лактамную и в организме вне всякого сомнения может существовать в обеих формах, выполняя при этом определенную роль в патохимии некоторых заболеваний, включая БП (рис. 3). Так, известным фактом в патогенезе БП является утрата в организме пациента катехоламиновых нейронов, что

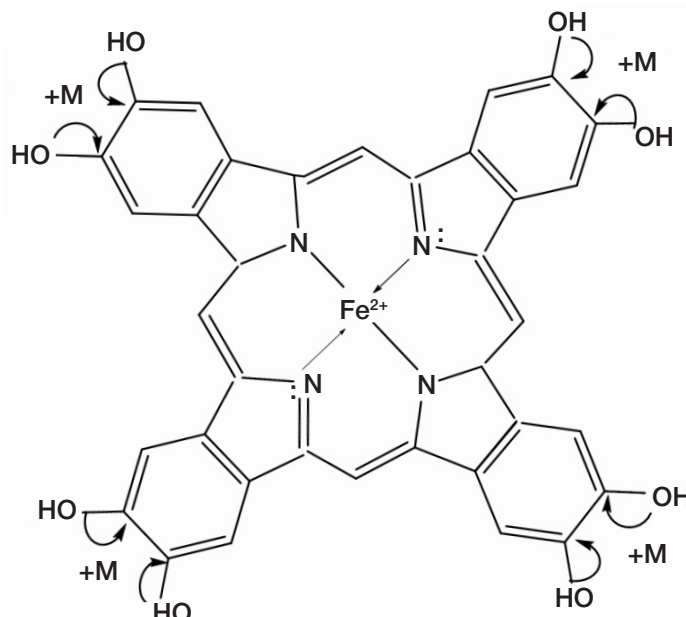


Рис. 2. Возможный продукт межмолекулярной циклизации — тетрамер диоксииндола как основа циклической структуры нейромеланина

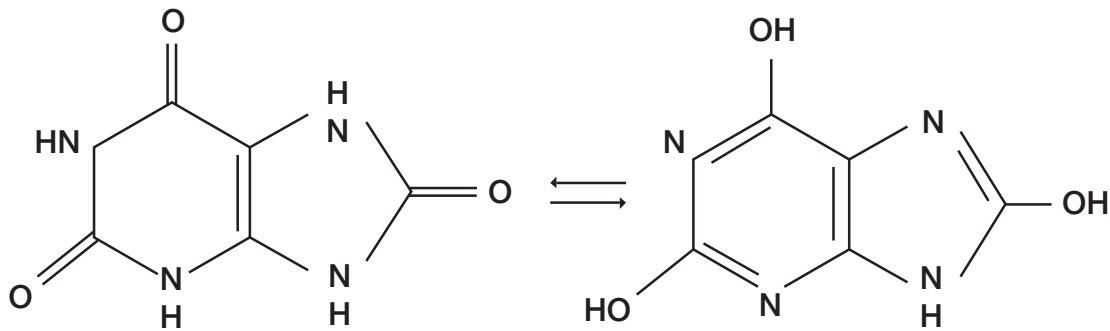


Рис. 3. Химическая структура мочевой кислоты в виде двух ее возможных нативных таутомеров

приводит со временем к прогрессированию клинических симптомов. Значит определенную положительную роль на развитие заболевания и улучшения состояния больных должно оказывать влияние веществ, усиливающих эффекты биогенных аминов. Установлено, что улучшение состояния больных коррелирует с увеличением уровня данного метаболита в ликворе пациентов. Возникает логический вопрос: каков возможный механизм действия самой кислоты? По всей видимости, их, как минимум, два. Из фармакологической биохимии известно, что три- и диметилксантины являются ингибиторами некоторых фосфодиэстераз. Сами ферменты этого класса подразделяются на два типа по локализации в клетке: мембранносвязанные и цитозольные. Не исключено, что лактимная форма данной кислоты, имея определенный дипольный момент и поляризованную ОН-группу (к тому же не одну), обладает выраженными кислотными свойствами и не способна проникнуть через мембрану клетки. Однако, по аналогии с «подвижной» ОН-группой и ароматическим характером хроманового ядра токоферолов, способна задерживаться в мембранном аппарате некоторых клеток, включая нейроны. При этом, с одной стороны, выполняет функцию местного антиоксиданта, а с другой — ингибитора фосфодиэстеразы как производное ксантина, тем самым пролонгируя эффекты катехоламинов (а биогенные амины имеют именно мембранопосредованный механизм действия). При этом ингибируется именно мембранносвязанная форма преимущественно фосфодиэстеразы I типа — ее мишень цАМФ, активируемая в норме катионами  $Ca^{2+}$ , комплексом  $4Ca^{2+}$ -кальмодулин + цГМФ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, систематизированы и охарактеризованы биохимически следующие лабораторные признаки болезни Паркинсона: 1) накопление  $\alpha$ -синуклеина; 2) мутации в гене, кодирующем белок DJ-1; 3) изменение ряда антител в плазме крови; 4) наличие потенциальных биомаркеров: IL6, мочевой кислоты. В патохимии болезни Паркинсона имеет значение ряд процессов: снижение содержания дофамина и количества нейронов в черной субстанции; накопление нейромеланина в нейронах определенной химической структуры; снижение активности тирозингидроксилазы; конечным патохимическим звеном БП является деградация белка  $\alpha$ -синуклеина в нейронах ЦНС и периферической ВНС; определенное значение, по всей видимости, может иметь снижение лактимной формы мочевой кислоты в мембранном аппарате тел нейронов. Описанные нами детали патохимии образования нейромеланина и биохимия поведения мочевой кислоты в нативных условиях, возможно, могут быть биомаркерами или биосенсорами окислительного стресса, которому подвергаются тела нейронов при данном заболевании, и могут иметь определенную диагностическую ценность уже на доклиническом (до манифестации) этапе развития болезни. Мы считаем, что необходимо продолжать подобные исследования в сфере более глубокого понимания биохимизма различных процессов в клетках и поведения субстанций, имеющих патогенетическую и диагностическую значимость с целью ранней диагностики и своевременного выявления новых случаев заболеваний среди населения не только в группах риска, но и в других возрастных группах.

## Литература

1. Кучеряну В. Г., Бочаров Е. В., Воронина Н. А., Бочарова О. А.. Использование нейропротекторов при паркинсонизме. Acta Naturae (русскоязычная версия). 2019; 11 (S1): 35.
2. Чухловин Б. А., Гузева В. И., Чухловина М. Л., Шабалов Н. П. Возрастные аспекты синдрома паркинсонизма. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2008; 87 (6): 118–20.
3. Якшимбетова А. И., Карягина Н. Т. Роль  $\alpha$ -синуклеина в патохимии болезни Паркинсона. Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2022; S5: 110–5.
4. Палюлин В. А. Дизайн новых веществ для коррекции нарушений функций центральной нервной системы. НИР: грант № 20-15-18009. Российский научный фонд. 2020.
5. Бучаченко А. Л. Разработка новых идей и методов в химии биоантиоксидантов как средства против окислительного стресса. НИР: грант № 20-13-00148. Российский научный фонд. 2020.
6. Бунеева О. А., Медведев А. Е. Белок DJ-1 и его роль в развитии болезни Паркинсона: исследования на экспериментальных моделях. Биохимия. 2021; 86 (6): 771–86. DOI: 10.31857/S0320972521060026.
7. Иллариошкин С. Н., Левин О. С. Руководство для врачей. В сборнике: Материалы IV национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием). М., 2017; 381 с.
8. Sokolov AV, Miliukhina IV, Belsky YP, et al. Potential role of lactoferrin in early diagnostics and treatment of Parkinson disease. Medical Academic Journal. 2020; 20 (1): 37–44. DOI: 10.17816/MAJ33848.
9. Зарипов Н. А. Бемории Паркинсон, меъёрнои ташхис ва ташхисим тафрикавӣ. Авджи Зухал. 2021; 1: 136–41.
10. Daminova XM. Modern view to optimization of the diagnosis of the course of Parkinson's disease. New Day in Medicine. 2022; 1 (39): 115–8.
11. Vishniakou UA, Yiwei X. IT Diagnostics of Parkinson's Disease



Based on the Analysis of Voice Markers and Machine Learning. В сборнике: Доклады Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники. 2023; 21 (3): 102–10. DOI: 10.35596/1729-7648-2023-21-3-102-110.

12. Катунина Е. А., Ильина Е. П., Садекова Г. И., Гайсенюк Е. И. Подходы к ранней диагностике болезни Паркинсона. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2019; 119 (6):

119–27. DOI: 10.17116/jnevro2019119061119.

13. Доступно по ссылке (активна на 08.08.2023): <https://wiki2.org/ru/нейромеланин>.  
14. Доступно по ссылке (активна на 11.08.2023): <http://elib.fesmu.ru/eLib/Article.aspx?id=414239>.  
15. Доступно по ссылке (активна на 11.08.2023) [https://en.wikipedia.org/wiki/Ciliary\\_neurotrophic\\_factor](https://en.wikipedia.org/wiki/Ciliary_neurotrophic_factor).

## References

1. Kucheryanu VG, Bocharov EV, Voronina NA, Bocharova OA. Ispol'zovanie nejroprotektorov pri parkinsonizme. Acta Naturae (russkojazychnaya versiya). 2019; 11 (S1): 35. Russian.
2. Chuxiovin BA, Guzeva VI, Chuxlovina ML, Shabalov NP. Vozrastnye aspekty sindroma parkinsonizma. Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo. 2008; 87 (6): 118–20. Russian.
3. Yakshimbetova AI, Karyagina NT. Rol' a-sinukleina v patoximii bolezni Parkinsona. Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. 2022; S5: 110–5. Russian.
4. Palyulin VA. Dizajn novyx veshhestv dlya korrekcii narushenij funkcij central'noj nervnoj sistemy. NIR: grant # 20-15-18009. Rossijskij nauchnyj fond. 2020. Russian.
5. Buchachenko AL. Razrabotka novyx idej i metodov v khimii bioantioksidantov kak sredstva protiv oksiditel'nogo stressa. NIR: grant # 20-13-00148. Rossijskij nauchnyj fond. 2020. Russian.
6. Buneeva OA, Medvedev AE. Belok DJ-1 i ego rol' v razvitii bolezni Parkinsona: issledovaniya na ehksperimental'nyx modelyax. Bioximiya. 2021; 86 (6): 771–86. DOI: 10.31857/S0320972521060026. Russian.
7. Illarioskin SN, Levin OS. Rukovodstvo dlya vrachej. V sbornike: Materialy IV nacional'nogo kongressa po bolezni Parkinsona i rasstrojstvam dvizhenij (s mezhdunarodnym uchastiem). M., 2017; 381 s. Russian.
8. Sokolov AV, Miliukhina IV, Belsky YP, et al. Potential role of lactoferrin in early diagnostics and treatment of Parkinson disease. Medical Academic Journal. 2020; 20 (1): 37–44. DOI: 10.17816/MAJ33848.
9. Zaripov NA. Bemorii Parkinson, me"yorhoi tashxis va tashxisim tafrikavi. Avdzh Zuxal. 2021; 1: 136–41. Russian.
10. Daminova XM. Modern view to optimization of the diagnosis of the course of Parkinson's disease. New Day in Medicine. 2022; 1 (39): 115–8.
11. Vishniakou UA, Yiwei X. IT Diagnostics of Parkinson's Disease Based on the Analysis of Voice Markers and Machine Learning. V sbornike: Doklady Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta informatiki i radioehlektroniki. 2023; 21 (3): 102–10. DOI: 10.35596/1729-7648-2023-21-3-102-110.
12. Katunina EA, Ilina EP, Sadekova GI, Gajsenyuk EI. Podxody k rannej diagnostike bolezni Parkinsona. Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S.S. Korsakova. 2019; 119 (6): 119–27. DOI: 10.17116/jnevro2019119061119. Russian.
13. Available from (aktivna na 08.08.2023): <https://wiki2.org/ru/nejromelанин>.
14. Available from (aktivna na 11.08.2023): <http://elib.fesmu.ru/eLib/Article.aspx?id=414239>.
15. Available from (aktivna na 11.08.2023) [https://en.wikipedia.org/wiki/Ciliary\\_neurotrophic\\_factor](https://en.wikipedia.org/wiki/Ciliary_neurotrophic_factor).

## БИОХИМИЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОЙ ГИПОТЕЗЫ ПРОРЕЗЫВАНИЯ НИЖНИХ ТРЕТЬИХ МОЛЯРОВ

А. С. Коршунов<sup>1,4</sup>✉, В. Д. Вагнер<sup>2</sup>, Л. В. Бельская<sup>3</sup>, К. Н. Курятников<sup>1,4</sup>, Д. О. Серов<sup>4</sup>, В. А. Краснов<sup>4</sup>, Г. О. Тигранян<sup>1</sup>, И. А. Бондарь<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия

<sup>2</sup> Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва, Россия

<sup>3</sup> Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия

<sup>4</sup> Городская клиническая стоматологическая поликлиника № 1, Омск, Россия

Изучение механизма прорезывания зубов является важным и перспективным направлением ввиду увеличения частоты случаев возникновения болезней, связанных с нарушением или затрудненным прорезыванием, которые могут приводить к гнойно-септическим осложнениям. Целью исследования было изучить вариабельность и структурные особенности минерального компонента и органического матрикса в твердых тканях нижних третьих моляров, находящихся на разных стадиях прорезывания. У участников исследования ( $n = 67$ ; женщины, возраст от 14 до 36 лет) проводили микроскопическое и биохимическое исследование эмали, дентина и эмалево-дентинного соединения нижних третьих моляров методами растровой электронной микроскопии и ИК-Фурье-спектроскопии. Продемонстрирована связь стадии прорезывания со структурными особенностями твердых тканей: уровнем минерализации и размерами дентинных канальцев, ориентацией и размерами эмалевых призм. Содержание воды в твердых тканях нижних третьих моляров значимо различается, что характеризует обменные процессы и скорость созревания ( $p < 0,05$ ). По данным ИК-спектроскопии интенсивность полос поглощения коллагена с возрастом в эмали увеличивается, а в дентине уменьшается (1202, 1249 и 1342  $\text{cm}^{-1}$ ), при этом сочетание снижения интенсивности полосы 1202  $\text{cm}^{-1}$  с увеличением полосы 1342  $\text{cm}^{-1}$  у эмалево-дентинного соединения подтверждает его важную роль связующего звена между эмалью и дентином за счет обменной, амортизирующей, защитной, питательной функций. Полученные данные указывают на значительные изменения упаковки и ориентации коллагеновых фибрилл и волокон в твердых тканях, что влияет на первичную пространственную ориентацию и топографическое расположение зубов в нижней челюсти.

**Ключевые слова:** ИК-спектроскопия, дисплазия соединительной ткани, биохимия, прорезывание, эмаль, дентин, эмалево-дентинное соединение

**Вклад авторов:** А. С. Коршунов — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, набор клинического материала, подготовка рукописи; В. Д. Вагнер — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных; Л. В. Бельская — планирование исследования, проведение биохимических исследований, подготовка рукописи; К. Н. Курятников — набор клинического материала, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка рукописи; Д. О. Серов — набор клинического материала, интерпретация данных, анализ литературы; В. А. Краснов — набор клинического материала, подготовка образцов для исследования; Г. О. Тигранян, И. А. Бондарь — подготовка образцов для исследования, анализ данных.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ОмГМУ Министерства здравоохранения РФ (выписка из протокола № 113 от 26 ноября 2019 г.); все участники исследования или их представители подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Сергеевич Коршунов  
ул. Косарева, д. 34, г. Омск, 644043, Россия; andrey\_k\_180588@mail.ru

**Статья получена:** 31.07.2023 **Статья принята к печати:** 23.08.2023 **Опубликована онлайн:** 31.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.035

## BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF THE CONNECTIVE TISSUE HYPOTHESIS OF MANDIBULAR THIRD MOLAR ERUPTION

Korshunov AS<sup>1,4</sup>✉, Vagner VD<sup>2</sup>, Belskaya LV<sup>3</sup>, Kuryatnikov KN<sup>1,4</sup>, Serov DO<sup>4</sup>, Krasnov VA<sup>4</sup>, Tigranyan GO<sup>1</sup>, Bondar IA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Omsk State Medical University, Omsk, Russia

<sup>2</sup> Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

<sup>4</sup> City Clinical Dental Polyclinic № 1, Omsk, Russia

Studying the mechanism underlying tooth eruption is an important and promising area due to the increased incidence of the diseases associated with tooth eruption abnormalities or difficulties that can result in purulent and septic complications. The study was aimed to explore variability and structural features of the hard tissue mineral component and organic matrix in mandibular third molars being at different stages of tooth eruption. Microscopic examination and biochemical testing of the enamel, dentin, and dentin–enamel junction of the study participants' ( $n = 67$ ; females aged 14–36) mandibular third molars were performed by scanning electron microscopy and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. The association of the tooth eruption stage with the hard tissue structural features, such as the degree of mineralization and the size of dentinal tubules, orientation and size of the enamel prisms, was revealed. There were significant differences in the mandibular third molar hard tissue water content, which was demonstrated by metabolic processes and maturation rate ( $p < 0.05$ ). According to the IR spectroscopy data, intensity of the collagen absorption bands in the enamel increases with age, while in dentin it decreases (1202, 1249, and 1342  $\text{cm}^{-1}$ ). Furthermore the combination of the reduced intensity of the 1202  $\text{cm}^{-1}$  band with the increase in the 1342  $\text{cm}^{-1}$  dentin–enamel junction band confirms the important role it plays as a link between the enamel and dentin due to its metabolic, shock-absorbing, protective, and nutritional functions. The findings demonstrate significant changes in the wrapping and orientation of the collagen fibrils and fibers in the hard tissue, which affect primary spatial orientation and mandibular dental topography.

**Keywords:** IR spectroscopy, connective tissue dysplasia, biochemistry, eruption, enamel, dentin, dentin–enamel junction

**Author contribution:** Korshunov AS — study planning, literature analysis, data interpretation, clinical data acquisition, manuscript writing; Vagner VD — study planning, literature analysis, data interpretation; Belskaya LV — study planning, biochemical investigations, manuscript writing; Kuryatnikov KN — clinical data acquisition, literature analysis, data interpretation, manuscript writing; Serov DO — clinical data acquisition, data interpretation, literature analysis; Krasnov VA — clinical data acquisition, sample preparation for assessment; Tigranyan GO, Bondar IA — sample preparation for assessment, data analysis.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Omsk State Medical University (extract from the protocol № 113 of 26 November 2019); the informed consent was submitted by all study participants or their legal representatives.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey S. Korshunov  
Kosareva, 34, Omsk, 644043, Russia; andrey\_k\_180588@mail.ru

**Received:** 31.07.2023 **Accepted:** 23.08.2023 **Published online:** 31.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.035

Прорезывание зубов — это уникальный естественный процесс с многофакторным механизмом воспроизводимости, с помощью которого можно утверждать о развитии органов и тканей не только рта, но и всего организма [1]. Прорезывание представляет собой сложное биологическое событие, включающее динамические изменения на тканевом и клеточном уровнях [2]. Оно осуществляется анатомическими структурами, биологическими и молекулярными факторами, которые приводят к перемещению зуба в его окончательному функциональному положению во рту [3].

На этапе прорезывания зубы перемещаются в трех измерениях и постепенно увеличиваются в размерах в пределах альвеолярной части нижней челюсти до активного прорезывания. Во время формирования коронковой части зуб совершает незначительные круговые движения [4, 5].

Некоторые теории прорезывания зубов описаны уже несколько веков назад, многие из них подвергаются пересмотру, дополняют или опровергают [6]. Наиболее известны и хорошо обоснованы следующие: корневая (Hunter, 1870), альвеолярная (L. J. Vaume, 1890), пульпарная (Г. В. Ясвоин, 1929), перестройки костной ткани (J. Tandler, 1928; А. Я. Катц, 1940; В. Orban, 1953; J. Reichborn-Kjennerud, 1959; М. Я. Берри, 1968). Ряд авторов придерживаются теории, в которой соединительная ткань, охватывающая прорезывающийся нижний третий моляр со всех сторон, скорее всего является источником прорезывания [7]. По другим данным, корональные и базальные клетки эмали зуба и зубного фолликула могут посылать сигнал, который индуцирует дифференцировку относительно близких мезенхимальных клеток или клеток-предшественников, превращают их в клетки со специфическими функциями, то есть остеобласты и остеокласты [8].

Согласно еще одной гипотезе, сосудистое и тканевое давление может влиять на скорость прорезывания. В эксперименте на зубных альвеолах у крыс установлено, что после удаления интерстициальной жидкости происходит повышение давления, в конечном счете все заканчивается снижением скорости прорезывания [9].

Большую роль исследователи отводят дифференцировке тканей зачатка зуба, когда под действием силы во время прорезывания увеличивается объем и внутри него создается определенное давление (напряжение) [10].

Развивающиеся нижние третьи моляры должны проходить каскад минерализованных и неминерализованных соединительных тканей, при этом эмаль образует изолирующий барьер, который при благоприятных условиях защищает зуб от физических, химических, тепловых воздействий, в некоторых случаях неполноценность ее структуры может утяжелять течение стоматологических заболеваний. Есть мнение, что эмаль не содержит коллагена, хотя в литературе имеются единичные публикации, доказывающие его наличие в этой уникальной биологической ткани [11, 12].

На самом раннем этапе формирования зуба происходят сложные эпителиально-мезенхимальные молекулярные и перекрестные взаимоотношения внутри твердых тканей [13]. Недавние наблюдения позволяют оспорить общепринятые научные факты и предположить, что рост кристаллов эмали инициируют минерализованные коллагеновые волокна из дентина. Затем эти кристаллы проходят через эмалево-дентинную границу к мембране амелобластов и распространяются по всей поверхности эмали. Подобное строение позволяет создать соединительные комплексы, где секреторные амелобласты образуют полупроницаемый

барьер для межклеточных перемещений минералов, ионов, свободно циркулирующих в матрице эмали. По указанным соединительным комплексам возможны межклеточные перемещения жидкостей, которые нейтрализуют pH в матрице эмали [14].

Наличие коллагеновых волокон в твердых тканях зубов представляет существенное научное и практическое значение для стоматологии. Установлено, что у человека амелогенины и энамелины взаимодействуют с членами семейства коллагенов во внутрикостную стадию прорезывания [13]. Коллагены являются продуктом одонтобластов и присутствуют в дентине, в то время как амелогенины являются продуктом амелобластов и содержатся в эмали. Было показано, что коллаген IV типа экспрессируется непосредственно в эмалево-дентинной границе, коллагены I и VII типов проходят из дентина через эмалево-дентинную границу в эмаль. Значение взаимодействий амелогенин–коллаген и энамелин–коллаген, или расширение коллагенов дентина во внутреннюю матрицу эмали поможет объяснить значение и необычные структурные и биохимические свойства эмалево-дентинной границы [15].

Благодаря развитию стоматологии, биохимии, нанотехнологий описаны новые виды белков, дентина, костей, которые обладают уникальными способностями воздействовать на структуру минералов твердых тканей. Результаты микроскопического исследования указывают на сложные взаимоотношения кристаллов апатита; особенно остро встают вопросы межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий белковых матриц с неорганической фазой минерализованных тканей челюстно-лицевой области [16].

Известно, что неорганическая фаза эмали и дентина представлена кристаллами гидроксиапатита, колебания которых в средней инфракрасной области более стабильны [12].

В литературе описаны исследования белков зубного зачатка плода человека, зрелой эмали постоянных зубов. Подобные исследования затрагивают только некоторые частоты или ИК-спектры белков, а их интерпретацию можно найти в единичных работах. Более современные исследования показывают, что эмаль зубного зачатка плода не похожа на эмаль прорезавшегося зуба, при этом ее физические свойства и химический состав различны. В эмали зачатка зуба в тысячи раз меньше белка, чем в эмали постоянных зубов, а по плотности и содержанию белка она мало отличается от мягких тканей организма [17].

Установлено, что компоненты органического матрикса берут начало от эмалево-дентинной границы, где на всем протяжении частично переплетается с коллагеновыми фибриллами дентина. Выше эмалево-дентинной границы органический матрикс представлен слоем переплетающихся тонких волокон, образующих подобие неоднородной широкопетливой сетки, вдоль всего эмалево-дентинного соединения, который отделяет эмаль от дентина. Наличие такого сложного строения позволяет многим исследователям утверждать о переплетении коллагеновых фибрилл дентина с органическим матриксом эмали [18]. Это в свою очередь приводит к появлению коллагена среди специфических белков эмали амелогенинов и энамелинов, а дифракционную картину органического матрикса определяют диффузно размытые кольца.

Другие исследования демонстрируют уменьшение с возрастом количества органического фосфата, входящего в состав белка эмали плода и зрелой эмали, что

отражается уменьшением полос поглощения ИК-спектров. ИК-спектры белка эмали плода значительно отличаются от спектров коллагена и кератина, что позволило отнести основную массу белков эмали к белкам коллагенового либо кератинового типа [19].

При формировании эмали в ИК-спектрах уменьшается интенсивность белковых полос, лежащих в области поглощения карбоксильных групп, в результате связывания минеральных компонентов. Содержание ортофосфатных групп в процессе формирования структуры апатита возрастает в эмали зубных зачатков плода, тогда как в зрелой эмали их количество с возрастом почти не меняется. Интенсивность колебаний пирофосфатных групп возрастает в апатите эмали в процессе пре- и постнатального онтогенеза [20].

На основании изученной литературы мы считаем актуальным и востребованным описать новые представления о механизме прорезывания нижних третьих моляров, опираясь на биохимические и морфологические перестройки в них.

Цель исследования — изучить изменчивость и вариабельность органического матрикса и минерального компонента в твердых тканях нижних третьих моляров,

находящихся на разных стадиях прорезывания, с применением микроскопических и биохимических методов.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Клиническое исследование

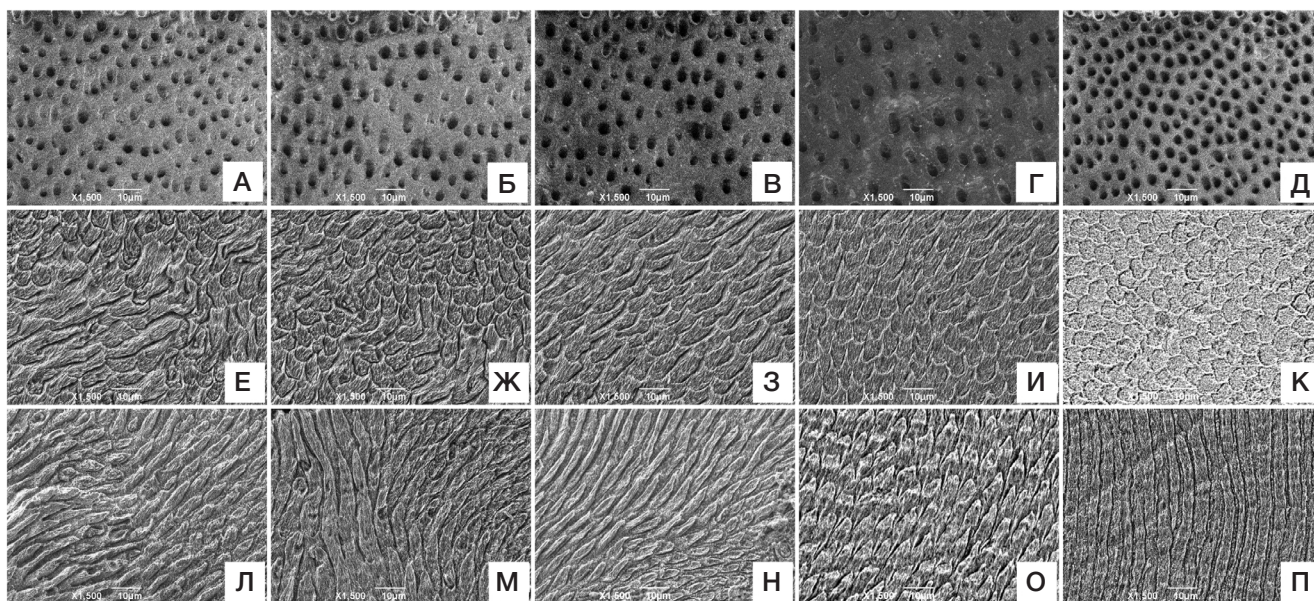
В исследовании приняли участие 67 женщин в возрастных группах 14–17, 18–21, 22–26, 27–31, 32–36 лет, которые находились на диспансерном наблюдении и лечении у врача-ортодонта и врача-стоматолога-хирурга в отделение стоматологии общей практики БУЗ Омской области «Городская клиническая стоматологическая поликлиника № 1», «Центр диагностики и лечебной дисплатии соединительной ткани» ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (Омск, Российская Федерация). Всем участникам в 2021–2022 гг. проводили удаление зубов 38, 48 (по ортодонтическим показаниям или при затрудненном прорезывании). ИК-спектроскопию проводили на базе научно-исследовательской лаборатории биохимии ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет».

**Таблица 1.** Размеры дентинного слоя и дентинных трубочек нижних третьих моляров на разных стадиях прорезывания у обследованных

Возрастная группа / Показатель		14–17 лет	18–21 лет	22–26 лет	27–31 лет	32–36 лет	
Толщина дентинного слоя, мм	1	–	–	–	–	–	
	2	2,9	2,8	3,3	3,5	3,4	
		[2,7; 3,0]	[2,6; 3,0]	[3,1; 3,5]	[3,3; 3,8]	[3,3; 3,6]	
	3	3,2*	3,3*	3,7*	3,9*	3,4	
		[3,0; 3,5]	[3,1; 3,5]	[3,6; 3,9]**	[3,8; 4,0]	[3,2; 3,6]	
		( $p = 0,002$ )	( $p = 0,01$ )	( $p = 0,002$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 1,90$ )	
	4	3,7	3,8	4,1*	4,3*	3,2	
		[3,6; 3,8]	[3,6; 3,9]	[4,0; 4,3]**	[4,2; 4,5]	[3,1; 3,5]**	
		( $p = 0,002$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 1,99$ )	
	Ширина дентинных канальцев в области пульпы, нм	1	–	–	–	–	–
		2	2,33	2,35	2,41	2,41	2,41
			[2,31; 2,34]	[2,33; 2,36]	[2,39; 2,43]**	[2,40; 2,43]	[2,40; 2,43]
3		2,39*	2,39*	2,46*	2,45*	2,34*	
		[2,37; 2,43]	[2,37; 2,42]	[2,45; 2,48]**	[2,44; 2,47]	[2,32; 2,35]**	
		( $p = 0,001$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,0001$ )	
4		2,45*	2,43	2,49*	2,48	2,31	
		[2,44; 2,47]	[2,42; 2,44]	[2,48; 2,51]**	[2,47; 2,49]	[2,29; 2,32]	
		( $p = 0,02$ )	( $p = 0,91$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,22$ )	( $p = 0,34$ )	
Ширина дентинных канальцев в области эмалево-дентинного слоя, нм		1	1,21	1,23	1,25	1,24	1,21
			[1,19; 1,26]	[1,19; 1,28]	[1,22; 1,28]	[1,22; 1,27]	[1,18; 1,25]
		2	3,24*	3,26*	3,41*	3,39*	3,13
	[3,21; 3,28]		[3,23; 3,29]	[3,39; 2,44]**	[3,35; 3,45]	[3,09; 3,17]**	
	( $p = 0,0001$ )		( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,001$ )	
	3	3,31*	3,33*	3,45	3,45	3,12	
		[3,29; 3,31]	[3,32; 3,35]**	[3,43; 3,48]**	[3,44; 3,46]	[3,07; 3,17]**	
		( $p = 0,02$ )	( $p = 0,01$ )	( $p = 0,56$ )	( $p = 0,19$ )	( $p = 0,88$ )	
	4	3,35*	3,36	3,51	3,52*	3,15	
		[3,32; 3,39]	[3,33; 3,39]	[3,46; 3,55]**	[3,48; 3,55]	[3,11; 3,19]**	
		( $p = 0,02$ )	( $p = 0,17$ )	( $p = 1,05$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 1,98$ )	

**Примечание:** \* — различия между стадиями прорезывания; \*\* — различия между возрастными подгруппами статистически значимы (Манн–Уитни  $U$ -тест, Уилкоксон-тест, с учетом поправки Бонферони при  $p < 0,02$ ). Внутри возрастных подгрупп между группами статистически значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ). 1 — стадия зачатка; 2 — до уровня десны; 3 — до середины коронки второго моляра; 4 — полное прорезывание.





**Рис. 1.** Строение дентинных трубочек, упаковка эмалевых призм в поверхностном и глубоком отделах (растровая электронная микроскопия; ув.  $\times 1500$ ). Строение дентинных трубочек: в 14–17 лет (А); в 18–21 год (Б); в 22–26 лет (В); в 27–31 год (Г); в 32–36 лет (Д). Упаковка эмалевых призм в поверхностном отделе: в 14–17 лет (Е); в 18–21 год (Ж); в 22–26 лет (З); в 27–31 год (И); в 32–36 лет (К). Упаковка эмалевых призм в глубоком отделе: в 14–17 лет (Л); в 18–21 год (М); в 22–26 лет (Н); в 27–31 год (О); в 32–36 лет (П)

Критерии включения в группу исследования: женщины, у которых удаляли интактные зубы (38, 48) с подтвержденным диагнозом по МКБ 10: K05.22 (острый перикоронит), K05.32 (хронический перикоронит), K00.6 (нарушение прорезывания зубов), K01.0 (ретинированные зубы); возраст 14–36 лет; славянская внешность (европеоидная раса); наличие дисплазии соединительной ткани; в совокупности достигшие диагностического порога «+17» баллов (тяжелая степень). В группу сравнения вошли женщины с нормостеническим типом телосложения.

Критерии исключения: пациенты мужского пола и женщины в возрасте моложе 14 лет и старше 36 лет; наличие нижних третьих моляров с хроническими очагами инфекции в периапикальных тканях, пораженных кариесом; наличие хронических болезней в стадии субкомпенсации или декомпенсации; лица с алкогольной или наркотической зависимостью, ранее применявшие ulcerogenic лекарственные препараты (нестероидные противовоспалительные средства, глюкокортикостероиды и др.); гиперстеническое телосложение; азиатская или негроидная внешность; дисплазия соединительной ткани; в совокупности достигшие диагностического порога менее «17» баллов (легкая и средняя степень); диагнозы МКБ 10, не описанные в группе включения.

Стадию прорезывания нижних третьих моляров оценивали по компьютерным томограммам и систематизировали на четыре группы: зачаток, до уровня десны, до середины коронки второго моляра, полное прорезывание.

Диагностику дисплазии соединительной ткани и забор твердых тканей зубов для биохимических исследований проводили по методикам, описанным ранее [21, 22].

#### **Метод забора эмали, эмалево-дентинного соединения, дентина для микроскопического исследования**

На первом этапе зуб после экстракции фиксировали в столярной струбине, с помощью алмазного диска

производили сепарацию зуба в мезио-дистальном направлении, получали продольный срез. Подготовленный фрагмент зуба помещали в патрон из ПВХ-трубки срезом вниз, заливали двухкомпонентной эпоксидной смолой на 24 ч.

На втором этапе полученный препарат обрабатывали на шлифовально-полировальном станке «MP-1B GrinderPolisher» (MRC; Великобритания) шлифовальными кругами «dexter» (Leroy Merlin; Франция) зернистостью 800, 1500, 2000, 2500 grit. Окончательную полировку проводили с использованием полировального круга из войлока с пастой ГОИ для пластмасс. Протравливали поверхность препарата 37%-й ортофосфорной кислотой  $H_3PO_4$  в течение 20 с в зоне эмали, в течение 15 с в зоне дентина. Высушивали препарат с использованием салфетки из целлюлозы. Препарат укладывали на предметный стол растрового электронного микроскопа Jeol JCM – 5700 (JEOL Ltd.; Япония) для исследования. Применение описанного способа позволяет исследовать морфологию эмали, дентина, эмалево-дентинного соединения на продольном срезе в растровом электронном микроскопе.

#### **Метод получения и предварительной обработки ИК-спектров**

Образцы эмали, дентина и эмалево-дентинного соединения высушивали до постоянной массы при температуре  $105\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 6 ч и определяли массовую долю влаги. Порошки исследовали в таблетках, спрессованных в смеси с бромистым калием (соотношение 1 : 100; диаметр — 3,5 мм). В качестве опорного спектра использовали спектр чистого бромистого калия, предварительного высушенного при температуре  $\sim 600\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 6 ч. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» («СИМЕКС»; Россия) в диапазоне  $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$  (число сканов — 32, разрешение —  $4\text{ см}^{-1}$ ). Коррекцию базовой линии и нормализацию спектров проводили с использованием программного обеспечения Zair 3.5 («СИМЭКС»; Россия). На всех спектрах определяли положение и интенсивность полос поглощения (ПП).

Таблица 2. Размер ширины эмалевых призм в разных отделах эмали нижних третьих моляров на разных стадиях прорезывания у обследованных

Возрастная группа / Показатель		14–17 лет	18–21 лет	22–26 лет	27–31 лет	32–36 лет
Ширина эмалевых призм поверхностного слоя, нм	1	4,13	4,16	4,25	4,44	4,45
		[4,11; 4,15]	[4,13; 4,19]**	[4,22; 4,29]**	[4,42; 4,46]	[4,42; 4,49]
	2	4,21*	4,29*	4,36*	4,51*	4,53*
		[4,19; 4,23]	[4,26; 4,31]**	[4,34; 4,37]**	[4,49; 4,53]	[4,51; 4,55]
		( $p = 0,0002$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,0002$ )	( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,001$ )
	3	4,46*	4,49*	4,52*	4,59*	4,61*
		[4,43; 4,48]	[4,45; 4,53]	[4,50; 4,55]**	[4,56; 4,61]	[4,57; 4,64]
		( $p = 0,0002$ )	( $p = 0,0002$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,0002$ )
	4	4,35*	4,55	4,59*	4,68*	4,71*
		[4,33; 4,38]**	[4,52; 4,59]	[4,56; 4,62]	[4,65; 4,72]	[4,69; 4,73]
		( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,58$ )	( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,0002$ )	( $p = 0,002$ )
	Ширина эмалевых призм глубокого слоя, нм	1	4,52	4,51	4,55	4,66
[4,50; 4,55]			[4,48; 4,54]	[4,53; 4,56]**	[4,63; 4,69]	[4,63; 4,68]
2		4,61*	4,62*	4,63*	4,78*	4,76*
		[4,60; 4,63]	[4,60; 4,65]	[4,60; 4,67]**	[4,74; 4,82]	[4,73; 4,79]
		( $p = 0,002$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,001$ )
3		4,71*	4,73*	4,75*	4,92*	4,91*
		[4,68; 4,75]	[4,71; 4,76]	[4,73; 4,77]**	[4,90; 4,95]	[4,87; 4,95]
		( $p = 0,002$ )	( $p = 0,002$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,001$ )
4		4,89*	4,87*	4,82*	5,02*	4,99*
		[4,85; 4,91]	[4,85; 4,91]	[4,80; 4,85]**	[5,00; 5,05]	[4,97; 5,02]
		( $p = 0,0002$ )	( $p = 0,001$ )	( $p = 0,002$ )	( $p = 0,0001$ )	( $p = 0,02$ )

**Примечание:** \* — различия между стадиями прорезывания; \*\* — различия между возрастными подгруппами статистически значимы (Манн–Уитни  $U$ -тест, Уилкоксона тест, с учетом поправки Бонферони при  $p < 0,02$ ). Внутри возрастных подгрупп между группами статистически значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ). 1 — стадия зачатка; 2 — до уровня десны; 3 — до середины коронки второго моляра; 4 — полное прорезывание.

### Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных выполняли при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft; США) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Уилкоксона, в независимых группах —  $U$ -критерия Манна–Уитни. Описание выборки проводили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентилей (LQ; UQ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты наших исследований показали, что дентинные каналцы берут начало на внутренней поверхности дентина, пересекают его в направлении наружу, перпендикулярно тангенциальным волокнам основного вещества. Коллагеновые волокна, идущие в радиальном и тангенциальном направлениях, определяют топографическую анатомию и правильную ориентацию дентинных каналцев. Отмечено, что в молодом возрасте (14–17 лет, 18–21 лет) дентинные каналцы имеют небольшие размеры, в отличие от возрастных групп 22–26 лет, 27–31 лет, 32–36 лет. В возрастной группе 32–36 лет дентинные каналцы уменьшаются, что связано со снижением трофической функции и минерализации твердых тканей зубов, с облитерацией и появлением большого количества дентиклей, что негативно отражается на обменных процессах и может приводить к болезням твердых тканей. По мере движения нижнего третьего моляра к

окклюзионной плоскости и полному их прорезыванию дентинные каналцы увеличиваются в размерах статистически значимо во всех возрастных группах (14–17 лет, 18–21 лет, 22–26 лет, 27–31 лет) ( $p < 0,05$ ) (табл. 1; рис. 1А–Д).

Наши исследования продемонстрировали усиление минерализации внутреннего слоя дентинных каналцев на этапе прорезывания нижнего третьего моляра до середины коронки второго моляра в возрастных группах 21–26 лет, 27–31 лет, что не противоречит литературным данным о различной ширине дентинных каналцев [23]. Описанное кольцо минерализации дентинных каналцев в области пульпы уже и шире в области эмалево-дентинной границы (табл. 1; рис. 1А–Д). Отмечается утолщение дентинного слоя во всех сравниваемых возрастах, за исключением возрастной группы 32–36 лет, где его толщина остается неизменной по мере развития и перемещения нижнего третьего моляра до середины коронки второго моляра. Процесс образования нового дентина на всех этапах прорезывания идет равномерно, энергично, что отражается в статистическом анализе сравниваемых групп ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

Показатель ширины эмалевых призм в различных отделах эмали изменяется с возрастом и по мере прорезывания нижних третьих моляров. Нами установлен значительный рост эмалевых призм в возрасте 27–31 лет, после 32 лет он не наблюдается ( $p > 0,05$ ). Быстрый рост эмалевых призм в глубоком отделе эмали выявлен на следующих стадиях прорезывания: зачаток, до уровня десны во всех сравниваемых группах. Рост в ширину в поверхностном отделе эмали на ранних стадиях

Таблица 3. Содержание воды в твердых тканях нижних третьих моляров на разных стадиях прорезывания в группе обследованных

Возрастная группа / Показатель		14–17 лет	18–21 лет	22–26 лет	27–31 лет	32–36 лет
Эмаль, %	1	3,97	4,02	4,28	4,18	4,22
		[3,68; 4,09]	[3,94; 4,15]**	[4,19; 4,36]	[4,05; 4,29]	[4,11; 4,34]
	2	4,14	4,43*	4,49*	4,21	4,25
		[4,01; 4,25]**	[4,28; 4,56]	[4,37; 4,65]**	[4,06; 4,29]	[4,13; 4,39]
		( $p = 0,54$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,94$ )	( $p = 0,94$ )
	3	4,29	4,58	4,59	4,38	4,41
		[4,18; 4,42]**	[4,46; 4,65]	[4,49; 4,71]	[4,28; 4,50]	[4,29; 4,56]
		( $p = 0,78$ )	( $p = 0,88$ )	( $p = 0,84$ )	( $p = 0,92$ )	( $p = 0,95$ )
Дентин, %	1	–	–	–	–	–
	2	10,23	10,38	10,77	10,19	10,31
		[9,89; 10,43]	[10,03; 10,49]**	[10,56; 10,92]**	[9,91; 10,39]	[10,17; 10,45]
	3	10,56	10,89*	11,32*	10,41	10,43
		[10,12; 10,73]	[10,61; 10,98]**	[11,05; 11,52]**	[10,28; 10,54]	[10,27; 10,59]
		( $p = 0,47$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 1,13$ )	( $p = 0,81$ )
	4	10,65	10,98	11,71*	10,58	10,55
		[10,11; 10,79]	[10,79; 11,14]**	[11,54; 11,96]**	[10,39; 10,76]	[10,36; 10,72]
	( $p = 0,87$ )	( $p = 0,45$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,74$ )	( $p = 1,91$ )	
Эмалево-дентинное соединение, %	1	–	–	–	–	–
	2	7,93	8,35	8,43	8,05	8,12
		[7,76; 8,11]**	[8,21; 8,56]	[8,29; 8,61]**	[7,89; 8,26]	[8,01; 8,29]
	3	8,15	8,82*	8,91*	8,32	8,23
		[8,02; 8,32]**	[8,65; 8,99]	[8,75; 9,22]**	[8,19; 8,52]	[8,05; 8,44]
		( $p = 0,75$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,02$ )	( $p = 0,72$ )	( $p = 0,38$ )
	4	8,43	8,95	9,01	8,44	8,34
		[8,25; 8,63]**	[8,82; 9,19]	[8,81; 9,35]**	[8,23; 8,64]	[8,11; 8,59]
	( $p = 0,21$ )	( $p = 0,49$ )	( $p = 0,82$ )	( $p = 0,98$ )	( $p = 0,91$ )	

Примечание: \* — различия между стадиями прорезывания; \*\* — различия между возрастными подгруппами статистически значимы (Манн–Уитни  $U$ -тест, Уилкоксона тест, с учетом поправки Бонферони при  $p < 0,02$ ). Внутри возрастных подгрупп между группами статистически значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ). 1 — стадия зачатка; 2 — до уровня десны; 3 — до середины коронки второго моляра; 4 — полное прорезывание.

прорезывания нижних третьих моляров значительно возрастает относительно глубокого отдела во всех возрастных группах ( $p > 0,05$ ) (табл. 2; рис. 1Д–П).

Нами установлено, что в поверхностном отделе эмали рост эмалевых призм достоверно усиливается в возрастных группах 18–21 лет ( $p = 0,001$ ), 22–26 лет ( $p = 0,002$ ) на стадиях зачатка и при достижении уровня десны, в глубоком отделе в возрастной группе 22–26 лет на всех стадиях прорезывания ( $p < 0,05$ ).

По содержанию воды в твердых тканях нижних третьих моляров в сравниваемых группах выявлены статистические различия, которые характеризуют обменные процессы и скорость их созревания по мере движения до полного прорезывания. Самое большое ее содержание в эмали в возрастах 18–21 лет, 22–26 лет на стадии нахождения нижнего третьего моляра на уровне с десной. На остальных стадиях прорезывания статистически значимых изменений в эмали по содержанию воды не выявлено ( $p > 0,05$ ) (табл. 3).

Количество воды в дентине изменяется с возрастом. Самое высокое ее содержание в дентине отмечено в возрастах 18–21 лет, 22–26 лет на всех стадиях прорезывания ( $p < 0,05$ ). В описанных возрастных группах происходит значительное увеличение количества воды при полном прорезывании нижних третьих моляров. В

остальных возрастных группах значимых различий не установлено, хотя видна тенденция к уменьшению ее количества в возрастной группе 32–36 лет (табл. 3).

В эмалево-дентинной границе по данному показателю получены аналогичные изменения, которые описаны в дентине, с положительной динамикой по увеличению в возрасте 22–26 лет на всех стадиях прорезывания (табл. 3).

На ИК-спектрах твердых тканей нижних третьих моляров выделено 19 полос поглощения:  $3239 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{S-O-H}$ );  $2963 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{asCH}_3$ );  $2922 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{asCH}_2$ );  $2855 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{SCH}_2$ );  $1769 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{C} = \text{C}$ );  $1637$  и  $1618 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{C} = \text{O}$ );  $1546 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta\text{N-H}$ ,  $\nu\text{C-N}$ );  $1454 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta\text{asCH}_3$ ,  $\delta\text{CH}_2$ );  $1418 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{C-N}$ ,  $\delta\text{N-H}$ ,  $\delta\text{C-H}$ );  $1384 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta\text{CH}_3$ );  $1342 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ );  $1249$  и  $1202 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta\text{N-H}$ ,  $\nu\text{C-N}$ );  $1106 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{SPO}$ ,  $\nu\text{CC}$ ,  $\nu\text{CO}$ );  $1050 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{PO}_4$ );  $1037 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{CC}$ ,  $\nu\text{CO}$ ,  $\nu\text{CH}_2\text{OH}$ );  $967 \text{ см}^{-1}$  ( $\nu\text{PO}_4$ );  $876 \text{ см}^{-1}$  ( $\delta\text{O-C-O}$ ) [22].

Показано, что с возрастом качественный набор полос поглощения на ИК-спектрах твердых тканей нижних третьих моляров сохраняется, тогда как интенсивность отдельных полос поглощения существенно изменяется (рис. 2). Интенсивность полос поглощения метильных и метиленовых групп липидов и белков с возрастом уменьшается ( $2855$ ,  $2922$  и  $2963 \text{ см}^{-1}$ ), фосфатных групп увеличивается ( $1050 \text{ см}^{-1}$ ). Это указывает на большую степень минерализации



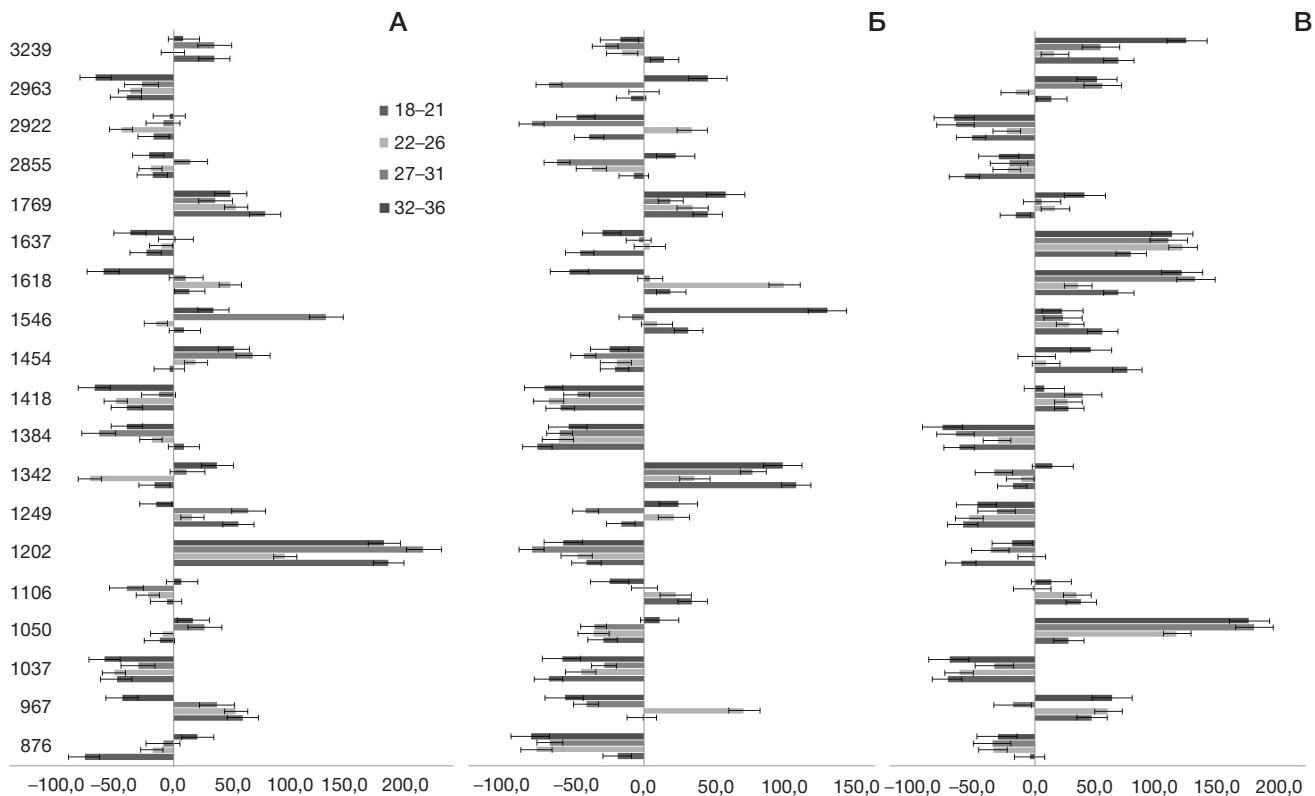


Рис. 2. Относительное изменение интенсивностей полос поглощения на ИК-спектрах: эмали (А); эмалево-дентинного соединения (Б); дентина в разных возрастных группах по сравнению с группой 14–17 лет (%) (В)

твердых тканей в возрастных группах 27–31 лет, 32–36 лет. Выраженные изменения доминируют между возрастными группами в структуре эмалево-дентинного соединения (ЭДС) (рис. 2Б). С возрастом интенсивность полос поглощения коллагена в дентине уменьшается (1202, 1249 и 1342  $\text{см}^{-1}$ ) (рис. 2В), в эмали увеличивается (рис. 2А), ЭДС занимает промежуточное положение и сочетает снижение интенсивности полосы 1202  $\text{см}^{-1}$  с увеличением полосы 1342  $\text{см}^{-1}$  (рис. 2Б). Подобные результаты показывают важную роль ЭДС, которое является ключевым звеном между эмалью и дентином за счет обменной, амортизирующей, защитной, питательной функций.

Анализ результатов ИК-спектроскопии образцов эмали, дентина, эмалево-дентинного соединения в разных возрастных группах методом главных компонент показал, что для эмали и дентина разделение групп не происходит. Вертикальная ось частично отделяет возрастные группы 14–17 лет и 27–31 лет от остальных, однако такое разделение статистически незначимо ( $p = 0,5298$  для эмали и  $p = 0,4157$  для дентина) (рис. 3А, Б). Противоположную картину можно наблюдать для ЭДС (рис. 3В, Г). Видно, что левее вертикальной оси расположены возрастные группы 14–17 лет и 27–31 лет, тогда как горизонтальная ось делит эти группы между собой (рис. 3В). В данном случае разделение групп статистически значимо ( $p = 0,0392$ ). В разделение возрастных групп вносят максимальный вклад полосы поглощения фосфат-ионов 1050  $\text{см}^{-1}$  ( $r = 0,7843$ ;  $p < 0,0001$ ), метильных и метиленовых групп в структуре углеродного скелета липидов и белков 2963  $\text{см}^{-1}$  ( $r = 0,7268$ ;  $p < 0,0001$ ), 2855  $\text{см}^{-1}$  ( $r = 0,6967$ ;  $p < 0,0001$ ) и полосы поглощения коллагена 1202  $\text{см}^{-1}$  ( $r = 0,6592$ ;  $p < 0,0001$ ) и 1249  $\text{см}^{-1}$  ( $r = 0,4763$ ;  $p < 0,0001$ ) (рис. 3Г), что было отмечено нами ранее. Отрицательный коэффициент корреляции выявлен для полос поглощения 1037  $\text{см}^{-1}$  ( $r = -0,8105$ ;  $p < 0,0001$ ) и 1418  $\text{см}^{-1}$  ( $r = -0,6498$ ;  $p < 0,0001$ ).

По второй оси максимальный вклад отмечен для полосы поглощения 1454  $\text{см}^{-1}$  ( $r = 0,7371$ ;  $p < 0,0001$ ), которая соответствует колебаниям метильных и метиленовых групп в структуре белков и полосы поглощения коллагена 1249  $\text{см}^{-1}$  ( $r = -0,4117$ ;  $p < 0,0001$ ) (рис. 3Г).

На разных стадиях прорезывания нижних третьих моляров показаны различия в эмали, дентине, эмалево-дентинном соединении. В эмали на стадии зачатка значимых изменений не выявлено, биохимические процессы представляют собой единый процесс. По мере движения нижнего третьего моляра установлены выраженные изменения. Горизонтальная ось «0–0» отделяет группу с прорезыванием до середины второго моляра (выше оси) от групп с полным прорезыванием (ниже оси). Вертикальная ось «0–0» разделяет группы с полным прорезыванием и прорезыванием на стадии зачатка. В дентине и эмалево-дентинном соединении можно наблюдать более четкое разделение групп.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнении ИК-спектров в сравниваемых группах мы пришли к мнению, что структурная ориентация и организация коллагеновых волокон в дентине на ранних стадиях прорезывания определяют правильную упаковку эмалевых призм. Прочное сцепление эмали с дентином осуществляется за счет правильной организации эмалево-дентинного соединения через сложную систему переплетения коллагеновых волокон в ней [24]. Биохимические изменения в дентине могут приводить к серьезным нарушениям в созревании эмалевых призм, особенно на ранних стадиях.

Отмечено, что коллагены экспрессируются в эмалево-дентинном соединении и дентине во всех возрастах. Значение таких взаимодействий, как амелогенин–коллаген и энамелин–коллаген, и расширение коллагенов



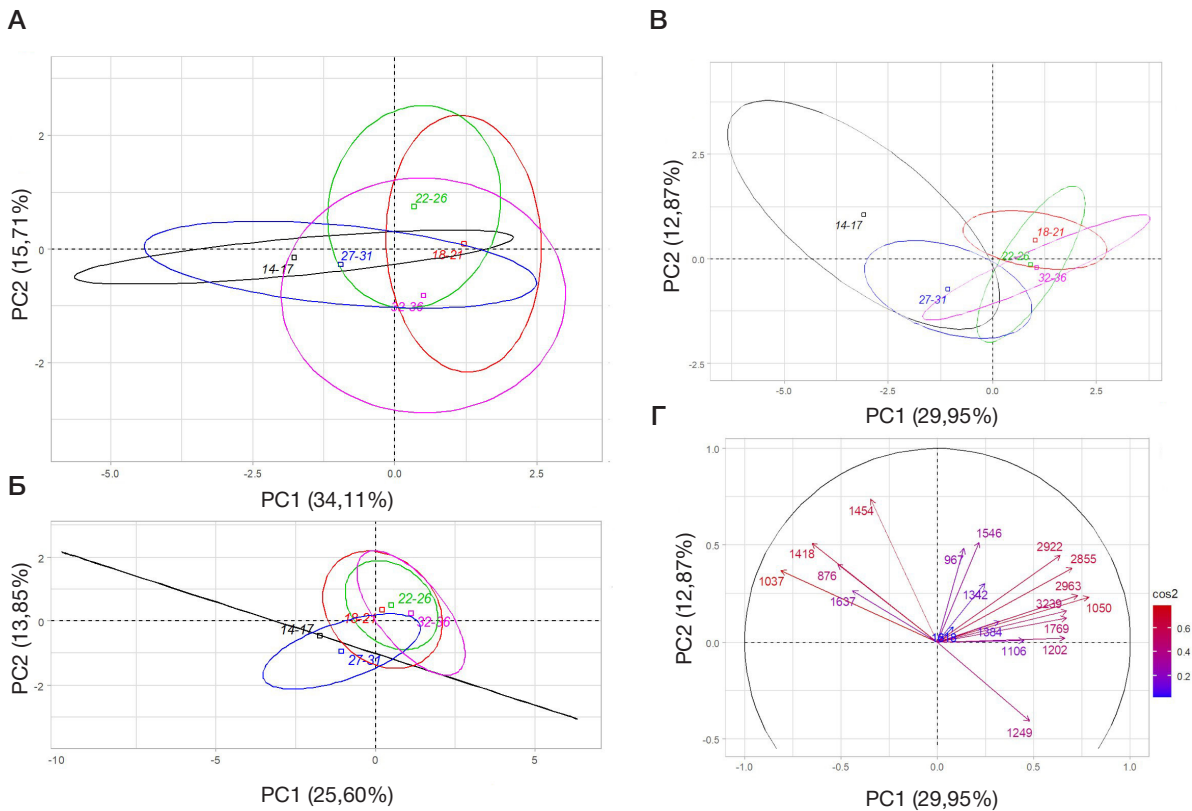


Рис. 3. Анализ ИК-спектров разных возрастных групп методом главных компонент: эмаль (А), дентин (Б); для эмалево-дентинного соединения: индивидуальная факторная диаграмма (В), факторная карта переменных (Г)

дентина во внутреннюю матрицу глубокого слоя эмали позволяет объяснить структурные биохимические и морфофункциональные изменения эмали после прорезывания нижних третьих моляров [25, 26].

Нами установлено, что состоятельность соединительнотканного комплекса эмалево-дентинного соединения и дентина создает надежный полупроницаемый барьер для межклеточных перемещений минералов, ионов, которые свободно циркулируют в матрице эмали, что в итоге обеспечивает более быстрое и полноценное созревание нижних третьих моляров. Наши наблюдения дополняют данные зарубежных исследователей о росте кристаллов эмали, который индуцируется коллагеновыми волокнами из эмалево-дентинного соединения и дентина [27]. От биохимического и морфологического состояния ЭДС, дентина зависят однородность и целостность эмали. Наличие врожденных и приобретенных болезней или состояний может нарушать структуру коллагена дентина, что приводит к серьезным изменениям эмалево-дентинного слоя и эмали [28, 29].

К ограничениям исследования можно отнести тот факт, что забор клинического материала произведен у жителей одного региона (Омская область) и у лиц женского пола, в качестве объекта использовали нижние третьи моляры, другие группы зубов не изучали, а также небольшой размер выборки пациентов в исследованных группах, что

обуславливает необходимость продолжения исследований по данной проблеме.

## ВЫВОДЫ

Результаты морфологического и биохимического исследования твердых тканей нижних третьих моляров подтверждают имеющиеся данные о том, что изменение их положения начинается еще с зачатка, когда выраженные изменения упаковки и ориентации коллагеновых фибрилл и волокон в эмалево-дентинной границе и дентине, их распространение в глубокие слои эмали влияют на первичную пространственную ориентацию и топографическое расположение описываемых зубов в нижней челюсти. Проведенные данные могут дать ответ на ключевой вопрос о том, что правильная ориентация коллагеновых волокон в дентине, эмалево-дентинном соединении, появление координированной работы дренажной сети между эмалью и дентином по внутрипризматическим и межпризматическим промежуткам и дентинным канальцам, которые совместно создают и усиливают давление в коронковой части зуба, являются пусковым механизмом движения и роста зачатка нижних третьих моляров. Подобная гипотеза является рабочей, нуждается в глубоком анализе и требует продолжения исследований.

## Литература

1. Bankole OO, Lawal FB. Teething. *Int Q Community Health Educ.* 2017; 37 (2): 99–106. DOI: 10.1177/0272684X17701262.
2. Kjær I. Mechanism of human tooth eruption: review article including a new theory for future studies on the eruption process. *Scientifica (Cairo)*. 2014; 2014: 341905. DOI: 10.1155/2014/341905.
3. Yu Y, Cui C, Guan SY, Xu RS, Zheng LW, Zhou XD, et al. Function

- of orofacial stem cells in tooth eruption: an evolving perspective. *Chin J Dent Res.* 2021; 24 (3): 143–52. DOI: 10.3290/j.cjdr.b1965049.
4. Marks SC Jr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245 (2): 374–93. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<374::AID-AR18>3.0.CO;2-M.
  5. McDermott CL, Hilton K, Park AT, Tooley UA, Boroshok AL, Mupparapu M, et al. Early life stress is associated with earlier emergence of permanent molars. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021; 118 (24): e2105304118. DOI: 10.1073/pnas.2105304118.
  6. Гончарова Е. И. Рост и развитие зубов, их гормональная регуляция. *Российский стоматологический журнал.* 2013; 1: 53–56. DOI: 10.17816/dent.39190.
  7. Berkovitz BK, Migdalski A, Solomon M. The effect of the lathyritic agent aminoacetonitrile on the unimpeded eruption rate in normal and root-resected rat lower incisors. *Arch Oral Biol.* 1972; 17 (12): 1755–63. DOI: 10.1016/0003-9969(72)90239-7.
  8. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993; 75 (7): 1241–4. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90610-3.
  9. Choukroune C. Tooth eruption disorders associated with systemic and genetic diseases: clinical guide. *J Dentofacial Anom Orthod.* 2017; 20 (4): 402. DOI: 10.1051/odfen/2018129.
  10. Максимовский Ю. М. Строение и функции органов и тканей полости рта. Зубы. В книге: Максимовский Ю. М., редактор. *Терапевтическая стоматология.* М., 2002; с. 45–50.
  11. Леонтьев В. К. Эмаль зубов как биокрибернетическая система. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016; 72 с.
  12. Шумилов Б. Р., Воробьева Ю. Б., Малыхина И. Е., Чертовских А. В. Современные представления о кристаллической структуре гидроксиапатита и процессах возрастных изменений эмали зуба (исследование in vitro). *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2015; 4 (1): 77–86.
  13. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev.* 2017; 97 (3): 939–993. DOI: 10.1152/physrev.00030.2016.
  14. Jussila M, Thesleff I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4 (4): a008425. DOI: 10.1101/cshperspect.a008425.
  15. McGuire JD, Walker MP, Mousa A, Wang Y, Gorski JP. Type VII collagen is enriched in the enamel organic matrix associated with the dentin-enamel junction of mature human teeth. *Bone.* 2014; 63: 29–35. DOI: 10.1016/j.bone.2014.02.012.
  16. Kashkarov VM, Goloshchapov DL, Rumyantseva AN, Seredin PV, Domashevskaya EP, Spivakova IA, et al. X-ray diffraction and IR spectroscopy investigation of synthesized and biogenic nanocrystalline hydroxyapatite. *J Surf Investig.* 2011; 5: 1162–7. DOI: 10.1134/S1027451011120068.
  17. Horakova L, Dalecka L, Zahradnick O, Lochovska K, Lesot H, Peterkova R, et al. Eda controls the size of the enamel knot during incisor development. *Front Physiol.* 2023; 13: 1033130. DOI: 10.3389/fphys.2022.1033130
  18. Вагнер В. Д., Коршунов А. С., Курятников К. Н., Рогачев Е. А., Бельская Л. В., Сарф Е. А., и др. Характер обменных процессов в твердых тканях зубов человека в зависимости от их морфологического строения. *Стоматология.* 2022; 101 (6): 7–13. DOI: 10.17116/stomat20221010617.
  19. Silin AV, Terekhov AY, Andreevskaya MV, Maryanovich AT. Proteins of mineralized dental tissues. *Russian Biomedical Research.* 2022; 7 (2): 53–68. DOI: 10.56871/1744.2022.70.82.005.
  20. Шумилов Б. Р., Садовский В. В., Сущенко А. В., Харитонов Ю. М. Физиологические изменения морфологии основной структурной единицы эмали — кристалла гидроксиапатита — в процессе его жизнедеятельности (исследование in vitro). *Стоматология.* 2015; 94 (6): 11–18. DOI: 10.17116/stomat201594611-18.
  21. Korshunov AS, Vagner VD, Kuryatnikov KN, Serov DO, Torohov AL, Shykhaliyeva DD, et al. Infrared Spectroscopy to Analyze Sexual Dimorphism of Hard Dental Tissue Maturation at Eruption in Patients with Connective Tissue Dysplasia. *Appl Spectrosc.* 2023; 77 (5): 457–69. DOI: 10.1177/00037028231160145.
  22. Korshunov AS, Vagner VD, Kuryatnikov KN, Meloyan AD, Kasy MN, Sarf EA, et al. IR-spectroscopic analysis of hard tissues of lower “wisdom” teeth at the eruption stage of connective tissue dysplasia. *Journal of Applied Spectroscopy.* 2022; 89 (4): 689–97. DOI: 10.1007/s10812-022-01410-9
  23. Williams C, Wu Y, Bowers DF. ImageJ analysis of dentin tubule distribution in human teeth. *Tissue Cell.* 2015; 47 (4): 343–8. DOI: 10.1016/j.tice.2015.05.004.
  24. Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012; 17 (6): 1996–2023. DOI: 10.2741/4034.
  25. Du C, Falini G, Fermari S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science.* 2005; 307 (5714): 1450–4. DOI: 10.1126/science.1105675.
  26. Iijima M, Moradian-Oldak J. Interactions of amelogenins with octacalcium phosphate crystal faces are dose dependent. *Calcif Tissue Int.* 2004; 74 (6): 522–31. DOI: 10.1007/s00223-002-0011-3.
  27. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent.* 2013; 2013: 684607. DOI: 10.1155/2013/684607.
  28. Korshunov A, Vagner V, Konev V, Moskovskiy S, Kuryatnikov K, Skurikhina A, Yakovlev V, Nurakhmetova A. Research of connective tissue dysplasia influence on teething. *Saudi Dent J.* 2022; 34 (5): 385–89. DOI: 10.1016/j.sdentj.2022.05.002.
  29. Josic U, Maravic T, Bossù M, Cadenaro M, Comba A, Ierardo G, et al. Morphological Characterization of Deciduous Enamel and Dentin in Patients Affected by Osteogenesis Imperfecta. *Applied Sciences.* 2020; 10 (21): 7835. DOI: 10.3390/app10217835.

## References

1. Bankole OO, Lawal FB. Teething. *Int Q Community Health Educ.* 2017; 37 (2): 99–106. DOI: 10.1177/0272684X17701262.
2. Kjær I. Mechanism of human tooth eruption: review article including a new theory for future studies on the eruption process. *Scientifica (Cairo).* 2014; 2014: 341905. DOI: 10.1155/2014/341905.
3. Yu Y, Cui C, Guan SY, Xu RS, Zheng LW, Zhou XD, et al. Function of orofacial stem cells in tooth eruption: an evolving perspective. *Chin J Dent Res.* 2021; 24 (3): 143–52. DOI: 10.3290/j.cjdr.b1965049.
4. Marks SC Jr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245 (2): 374–93. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<374::AID-AR18>3.0.CO;2-M.
5. McDermott CL, Hilton K, Park AT, Tooley UA, Boroshok AL, Mupparapu M, et al. Early life stress is associated with earlier emergence of permanent molars. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021; 118 (24): e2105304118. DOI: 10.1073/pnas.2105304118.
6. Goncharova EI. Rost i razvitie zubov, ih gormonal'naya regulyaciya. *Rossiiskij stomatologicheskij zhurnal.* 2013; 1: 53–56. DOI: 10.17816/dent.39190. Russian.
7. Berkovitz BK, Migdalski A, Solomon M. The effect of the lathyritic agent aminoacetonitrile on the unimpeded eruption rate in normal and root-resected rat lower incisors. *Arch Oral Biol.* 1972; 17 (12): 1755–63. DOI: 10.1016/0003-9969(72)90239-7.
8. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993; 75 (7): 1241–4. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90610-3.
9. Choukroune C. Tooth eruption disorders associated with systemic and genetic diseases: clinical guide. *J Dentofacial Anom Orthod.* 2017; 20 (4): 402. DOI: 10.1051/odfen/2018129.
10. Maksimovskij YuM. Stroenie i funkcii organov i tkanej polosti rta. Zuby. V knige: Maksimovskij Yu. M., redaktor. *Terapevticheskaya stomatologiya.* M., 2002; с. 45–50. Russian.
11. Leontev VK. Ehmal' zubov kak biokiberneticheskaya sistema. M.: GEhOTAR-Media, 2016; 72 с. Russian.

12. Shumilovich BR, Vorobeva YuB, Malyhina IE, Chertovskih AV. Sovremennyye predstavleniya o kristallicheskoj strukture gidroksiapatita i processah vozrastnyh izmenenij ehmalij zuba (issledovanie in vitro). *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2015; 4 (1): 77–86.
13. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev*. 2017; 97 (3): 939–993. DOI: 10.1152/physrev.00030.2016.
14. Jussila M, Thesleff I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4 (4): a008425. DOI: 10.1101/cshperspect.a008425.
15. McGuire JD, Walker MP, Mousa A, Wang Y, Gorski JP. Type VII collagen is enriched in the enamel organic matrix associated with the dentin-enamel junction of mature human teeth. *Bone*. 2014; 63: 29–35. DOI: 10.1016/j.bone.2014.02.012.
16. Kashkarov VM, Goloshchapov DL, Rummyantseva AN, Seredin PV, Domashevskaya EP, Spivakova IA, et al. X-ray diffraction and IR spectroscopy investigation of synthesized and biogenic nanocrystalline hydroxyapatite. *J Surf Investig*. 2011; 5: 1162–7. DOI: 10.1134/S1027451011120068.
17. Horakova L, Dalecka L, Zahradnicek O, Lochovska K, Lesot H, Peterkova R, et al. Eda controls the size of the enamel knot during incisor development. *Front Physiol*. 2023; 13: 1033130. DOI: 10.3389/fphys.2022.1033130
18. Vagner VD, Korshunov AS, Kuryatnikov KN, Rogachev EA, Belskaya LV, Sarf EA, i dr. Harakter obmennyh processov v tverdyh tkanyah zubov cheloveka v zavisimosti ot ih morfologicheskogo stroeniya. *Stomatologiya*. 2022; 101 (6): 7–13. DOI: 10.17116/stomat20221010617.
19. Silin AV, Terekhov AYu, Andreevskaya MV, Maryanovich AT. Proteins of mineralized dental tissues. *Russian Biomedical Research*. 2022; 7 (2): 53–68. DOI: 10.56871/1744.2022.70.82.005.
20. Shumilovich BR, Sadovskij VV, Sushhenko AV, Haritonov YuM. Fiziologicheskie izmeneniya morfologii osnovnoj strukturnoj edinicy ehmalij — kristalla gidroksiapatita — v processe ego zhiznedeyatel'nosti (issledovanie in vitro). *Stomatologiya*. 2015; 94 (6): 11–18. DOI: 10.17116/stomat201594611-18. Russian.
21. Korshunov AS, Vagner VD, Kuryatnikov KN, Serov DO, Torohov AL, Shykhaliyeva DD, et al. Infrared Spectroscopy to Analyze Sexual Dimorphism of Hard Dental Tissue Maturation at Eruption in Patients with Connective Tissue Dysplasia. *Appl Spectrosc*. 2023; 77 (5): 457–69. DOI: 10.1177/00037028231160145.
22. Korshunov AS, Vagner VD, Kuryatnikov KN, Meloyan AD, Kasiy MN, Sarf EA, et al. IR-spectroscopic analysis of hard tissues of lower “wisdom” teeth at the eruption stage of connective tissue dysplasia. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2022; 89 (4): 689–97. DOI: 10.1007/s10812-022-01410-9
23. Williams C, Wu Y, Bowers DF. ImageJ analysis of dentin tubule distribution in human teeth. *Tissue Cell*. 2015; 47 (4): 343–8. DOI: 10.1016/j.tice.2015.05.004.
24. Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012; 17 (6): 1996–2023. DOI: 10.2741/4034.
25. Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science*. 2005; 307 (5714): 1450–4. DOI: 10.1126/science.1105675.
26. Iijima M, Moradian-Oldak J. Interactions of amelogenins with octacalcium phosphate crystal faces are dose dependent. *Calcif Tissue Int*. 2004; 74 (6): 522–31. DOI: 10.1007/s00223-002-0011-3.
27. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent*. 2013; 2013: 684607. DOI: 10.1155/2013/684607.
28. Korshunov A, Vagner V, Konev V, Moskovskiy S, Kuryatnikov K, Skurikhina A, Yakovlev V, Nurakhmetova A. Research of connective tissue dysplasia influence on teething. *Saudi Dent J*. 2022; 34 (5): 385–89. DOI: 10.1016/j.sdentj.2022.05.002.
29. Josic U, Maravic T, Bossù M, Cadenaro M, Comba A, Ierardo G, et al. Morphological Characterization of Deciduous Enamel and Dentin in Patients Affected by Osteogenesis Imperfecta. *Applied Sciences*. 2020; 10 (21): 7835. DOI: 10.3390/app10217835.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ, АНТИАДГЕЗИВНОЙ И АНТИБИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ОТНОШЕНИИ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *IN VITRO*

М. А. Носова<sup>1</sup>, И. И. Латиф<sup>2</sup>, Л. А. Краева<sup>2,3</sup>, Г. Н. Хамдулаева<sup>3</sup>, А. Н. Шаров<sup>4</sup>✉, И. С. Копецкий<sup>5</sup>, Д. А. Еремин<sup>4</sup>, Е. В. Постникова<sup>6</sup>, М. А. Постников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

<sup>2</sup> Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Стоматологический магазин «РОМАШКА», отдел научных исследований, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>6</sup> Самарский национальный исследовательский университет имени С. П. Королева, Самара, Россия

Пародонтит — актуальная проблема в России и в мире, требующая регулярной адаптации схем лечения и реабилитации из-за динамично меняющейся пародонтопатогенной флоры. Классическая терапия купирования острого процесса включает использование химического антисептика хлоргексидин 0,2–0,12%, эффективного только до трех недель применения ввиду адаптации патогенной флоры. Растительные комплексы с антисептическим действием в последние годы зарекомендовали себя как способные заместить классическую терапию. Очевидно, что разные формы выпуска имеют разную эффективность. *Staphylococcus aureus* в полости рта служит маркером пародонтита. *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* обладают маркерами вирулентности в качестве копатогенов при пародонтите. Целью исследования было выявить растительные препараты для борьбы с перечисленными микробами, а также с *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*. Проводили сравнительную оценку антибактериальной, антиадгезивной и антибиопленкообразующей активности отечественных средств «Фитодент» из растительного сырья: водных, водно-спиртовых и масляных растворов; гелевых форм. Наибольшая антибактериальная, антиадгезивная и антибиопленочная эффективность обнаружена у форм с длительной экспозицией — гелей, сопоставимая — у средств с синтетическими и с растительными антисептиками, а также у форм с максимальной концентрацией растительных антисептиков — эликсира. Водные и масляные формы за счет меньшей концентрации и сравнительно короткого времени контакта имеют меньшую эффективность. Полученные результаты подтверждают результаты клинических наблюдений за применением средств «Фитодент» в качестве ухода за полостью рта при лечении и профилактике пародонтита. Рекомендованы дальнейшие сравнительные исследования композиций, перекрестные и сравнительные исследования в зависимости от частоты применения и времени воздействия и с титрованием концентраций активных компонентов, в том числе на смешанных биопленках.

**Ключевые слова:** пародонтит, медные производные хлорофилла, гель, кора осины, дигидрокверцетин, антибиопленкообразующее действие, антимикробное действие, антиадгезивное действие, Фитодент

**Благодарности:** авторы выражают благодарность С. С. Асташовой, дизайнеру научно-практического журнала «Академия хлорофилла и коры осины» за подготовку фотографий и таблиц для публикации.

**Вклад авторов:** Л. А. Краева, Г. Н. Хамдулаева, М. А. Носова — концепция и дизайн исследования; И. И. Латиф, А. Н. Шаров — анализ литературы, сбор и обработка данных; Л. А. Краева — статистическая обработка; Л. А. Краева, А. Н. Шаров, И. И. Латиф — подготовка черновика рукописи; И. С. Копецкий, Д. А. Еремин, Е. В. Постникова, М. А. Постников — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом СамГМУ (протокол № 7 от 10 января 2022 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Николаевич Шаров  
Невский пр., д. 46, г. Санкт-Петербург, Россия; me@sharovalex.ru

**Статья получена:** 16.06.2023 **Статья принята к печати:** 08.08.2023 **Опубликована онлайн:** 24.08.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.029

## ANTIBACTERIAL, ANTI-ADHESIVE AND ANTI-BIOFILM-FORMING ACTIVITY OF PLANT COMPLEXES AGAINST PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA *IN VITRO*

Nosova MA<sup>1</sup>, Latif II<sup>2</sup>, Kraeva LA<sup>2,3</sup>, Khamdulayeva GN<sup>3</sup>, Sharov AN<sup>4</sup>✉, Kopetskiy IS<sup>5</sup>, Eremin DA<sup>4</sup>, Postnikova EV<sup>6</sup>, MA Postnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Samara State Medical University, Samara, Russia

<sup>2</sup> Military Medical Academy named after S.M.Kirov, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

<sup>4</sup> ROMASHKA dental shop, department of scientific research, St. Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Korolev Samara State University, Samara, Russia

Periodontitis is a problem urgent in Russia and throughout the world in general. Because of the dynamically changing flora causing this diseases, the treatment methods designed against it should be adapted on a regular basis. The classic approach to arresting development of the acute process relies on 0.2–0.12% chlorhexidine, a chemical antiseptic, but after 3 weeks of use, its efficacy drops drastically because pathogenic flora adjusts thereto. In the recent years, plant-based complexes with antiseptic properties have shown their capacity to challenge the classic approach. Obviously, efficacy of active ingredients depends on the form of the final product. The marker of periodontitis in the oral cavity is *Staphylococcus aureus*. *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* have virulence markers that are copathogens for periodontitis. This study aimed to find plant-based preparations capable of eliminating the said microbes and *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*. We compared antibacterial, adhesion and biofilm formation preventing properties of Phytodent plant-based products in various forms: water solution, water-alcohol solution, oil solution, gel. Long exposure form — gel — proved to be the most effective in terms of the properties tested. Products with synthetic and plant-based antiseptics, as well as those with plant-based antiseptics in maximum concentration (elixir), had comparable efficacy. Water and oil solutions are less effective because of the lower active ingredient concentration and relatively brief exposure. Our results support the results of clinical studies dedicated to the use of Phytodent products as oral care products in the context of periodontitis prevention and treatment. We recommend conducting further studies comparing compositions, cross- and comparative studies investigating the effect of frequency of application and time of exposure, such studies registering titers of active ingredient concentrations, and with subjects thereof including mixed biofilms.

**Keywords:** periodontitis, copper derivatives of chlorophyll, gel, aspen bark, dihydroquercetin, biofilm formation preventing properties, antimicrobial properties, adhesion prevention properties, Phytodent

**Acknowledgements:** authors thank SS Astashova, illustrator with the Academy of Chlorophyll and Aspen Bark journal, for preparing photos and tables for this publication.

**Author contribution:** Kraeva LA, Khamdulayeva GN, Nosova MA — concept and design of the study; Latif II, Sharov AN — literature analysis, data collection and processing; Kraeva LA — statistical processing; Kraeva LA, Sharov AN, Latif II — manuscript drafting; Kopetskiy IS, Eremin DA, Postnikova EV, Postnikov MA — editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Samara State Medical University's Ethics Committee (Minutes # ... of January 10, 2022)

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey N. Sharov  
Nevsky Prospekt, 46, Saint Petersburg, Russia; me@sharovalex.ru

**Received:** 16.06.2023 **Accepted:** 08.08.2023 **Published online:** 24.08.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.029



Пародонтит (П) — крайне актуальная стоматологическая проблема в России и в мире [1–4]. Доказавшие свою эффективность средства для купирования острого инфекционно-воспалительного процесса содержат химический антисептик (чаще всего хлоргексидин в концентрации 0,12–0,2%) практически в 100% форм выпуска [5–8]. Однако химические антисептические средства имеют ограниченный эффективный срок применения ввиду развития резистентности бактериальной флоры. Растительные комплексы, обладающие антисептическими свойствами, сопоставимые по спектру действия и эффективности, в последние годы зарекомендовали себя как способные заместить классическую стандартную антисептическую терапию [9–12]. Очевидно, что разные формы выпуска: водные растворы, водно-спиртовые растворы, масляные растворы, гелевые формы, — имеют разную эффективность за счет различия эффективной экспозиции по времени на тканях пародонта, что определяет частоту применения средства, длительность купирования острого периода и как следствие — время компенсированной стабильной ремиссии пациента [13–14]. Доказано антибактериальное действие фитонцидов хвойных растений, экстрактов коры осины, вытяжек из ламинарии японской и сахаристой. Результат применения известен давно, а различные комбинированные формы имеют космополитный характер применения в стоматологии. При этом доказательная научная база фрагментарна и имеет в основном клиническое подтверждение, а не фундаментальное [15–18]. Применение гелевых форм при лечении пародонтита предпочтительно за счет длительной экспозиции активных компонентов на тканях пародонта. Имеющиеся в настоящее время в практике стоматолога-пародонтолога гели содержат либо антисептик, либо субстраты для репарации тканей. Нет геля с мультинеправленным действием, т. е. элиминирующим токсины и биологический мусор, способствующим метаболизму в тканях пародонта, с неспецифическим иммуномодулирующим действием, нормализующим процессы дыхания и трофики пародонта, и как результат — комбинированной индукцией ауторегенерации [19].

Как известно, полость рта отличается большим видовым разнообразием микроорганизмов. Основная часть из них являются комменсалами. Однако выделен ряд бактериальных видов, которые непосредственно или опосредованно связаны с развитием П и других воспалительных процессов. Так, *Streptococcus sanguinis* способствует образованию биопленки на поверхности зубов с включением в ее состав *Fusobacterium nucleatum*, участвующего в развитии П [20], а также вероятностью развития в дальнейшем эндокардита [21]. Большое число исследователей заняты поиском препаратов из растительных компонентов или полученных синтетическим путем из веществ природного происхождения для борьбы с кариесогенными и пародонтогенными бактериями *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* [22–25]. Присутствие таких бактерий, как *Staphylococcus aureus*, и его метаболитов в полости рта может служить маркером определенной стадии П [26]. А наличие патогенетической оси «полость рта — кишечник» помогает рассматривать ряд бактерий, особенно обладающих маркерами вирулентности, в качестве копатогенов при пародонтите: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* [27–29]. Поэтому в настоящей работе были

рассмотрены именно эти патогены. Целью исследования было оценить антибактериальную, антиадгезивную и антибиопленкообразующую активность различных форм выпуска комбинированных средств с растительными и синтетическими компонентами различных направлений активности на пародонтопатогенную флору.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в отделе новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в период октябрь 2021 г. — апрель 2022 г.

Использовали уже патентованный состав геля с медными производными хлорофилла, корой осины, альгинатом натрия и дигидрокверцетином (ДКВ), обладающий необходимым спектром антибактериального действия и отвечающий требованиям к препарату для комплексной терапии П [30]. Продемонстрирован положительный клинический результат применения геля с медными производными хлорофилла, корой осины, альгинатом натрия и ДКВ при П [31], а также при при гингивите и П [32].

## Композиции активных компонентов

*Эликсир* представляет собой водно-спиртовой концентрат активных компонентов: вода, спирт этиловый 20%, хлорофиллин натрия-меди, экстракт осинового коры, экстракт ламинарии, кокамидопропилбетаин, ароматизатор пищевой «Мятный» натуральный, поливинилпирролидон.

*Ополаскиватель* представляет собой водный раствор активных компонентов: вода, хлорофиллин натрия-меди, экстракт осинового коры, экстракт ламинарии, кокамидопропилбетаин, ароматизатор пищевой «Мятный» натуральный, поливинилпирролидон, натрия бензоат.

*Масло «Фитолон»* представляет собой масляный раствор активных компонентов: масло рафинированное косточки персика или оливы, хлорофиллин натрия-меди.

*Масло «Провитам»* представляет собой масляный раствор активных компонентов: масло рафинированное косточки персика или оливы, концентрат провитаминный хвойный.

*Гель 1* с хлоргексидином представляет собой гелевую композицию активных компонентов: сорбитол, вода, гидрогенизированное касторовое масло, гидроксипропилцеллюлоза, альгинат натрия, хлоргексидина гидрохлорид, д-пантенол, аллантоин, метилпарабен, метилсалицилат, ароматизатор «Пектраль», ментол, экстракт пихты, хлорофиллин натрия-меди, эвгенол, пектин.

*Гель 2* с корой осины и ДКВ представляет собой гелевую композицию активных компонентов: сорбитол, вода, гидрогенизированное касторовое масло, гидроксипропилцеллюлоза, альгинат натрия, дигидрокверцетин, д-пантенол, аллантоин, экстракт коры осины, метилпарабен, метилсалицилат, хвойный комплекс, ментол, ароматизатор «Пектраль», лимонная кислота, хлорофиллин натрия-меди, эвгенол.

*Гель 3* с хлоргексидином представляет собой гелевую композицию активных компонентов: сорбитол, вода, гидрогенизированное касторовое масло, гидроксипропилцеллюлоза, альгинат натрия, д-пантенол, хлоргексидина гидрохлорид, аллантоин, метилпарабен, метилсалицилат, ароматизатор «Пектраль», ментол, экстракт пихты, хлорофиллин натрия-меди, эвгенол, пектин, — выдержанную до истечения срока годности 2 года.

## Штаммы бактерий

Референтные штаммы бактерий:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC № 25923
2. *Enterococcus faecalis* ATCC № 29212
3. *Klebsiella pneumoniae* ATCC № 13883
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC № 27853
5. *Acinetobacter baumannii* ATCC № 19606

Штаммы бактерий из коллекции микроорганизмов лаборатории:

1. *Streptococcus sanguinis* № 2111
2. *Streptococcus mitis* № 2118
3. *Streptococcus oralis* № 2114
4. *Streptococcus salivarius* № 2107

## Методы исследования

С помощью бактериологического метода исследования изучали влияние растительных комплексов на биологические свойства бактерий: выживаемость, адгезивные и антибиопленкообразующие свойства.

## Исследование антибактериальных свойств растительных комплексов

Готовили микробные взвеси 24-часовых культур бактерий в физиологическом растворе, содержащем  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. Далее путем десятикратных разведений доводили количество бактерий до  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл. При последнем разведении использовали мясоептонный бульон. Микробные взвеси переносили в 24 пробирки по 1 мл. В три пробирки, содержащие по 1 мл микробной взвеси конечной концентрации, вносили по 1 мл каждого растительного комплекса, в оставшиеся три пробирки вносили по 1 мл физиологического раствора. Все пробирки оставляли в термостате при температуре  $+37^\circ\text{C}$  на 30 мин. Далее из каждой пробирки производили высев по 10 мкл на чашки Петри с питательным агаром: для стрептококков — кровяной агар, для остальных видов бактерий — мясоептонный агар. Посев осуществляли по методу газона. Чашки Петри инкубировали в термостате 24 ч при температуре  $+37^\circ\text{C}$ . Далее производили подсчет колоний на каждой чашке, для каждого образца растительного компонента рассчитывали среднее арифметическое.

## Исследование антиадгезивных свойств растительных комплексов

Исследование проводили по методике А. С. Благодравовой [33] на клетках буккального эпителия. Для этого клетки трижды отмывали от индигенной микрофлоры в забуференном физиологическом растворе при pH 7,2–7,4 при скорости 35 г в течение 10 мин. Затем клетки разделяли по 0,5 мл в пробирки. В каждую пробирку добавляли по 0,5 мл бактериальной суспензии, содержащей  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл *S. sanguinis* и по 0,5 мл каждого растительного комплекса. Одна пробирка содержала только буккальный эпителий — контроль (естественная колонизация). опыты и контроли производили в трех циклах повторений. Далее пробирки со всеми компонентами интенсивно встряхивали и помещали в термостат при температуре  $+37^\circ\text{C}$  на 30 мин. После этого проводили отмывание от не прикрепившихся микроорганизмов, готовили мазки на предметных стеклах, фиксировали и окрашивали по Граму. Индекс адгезии рассчитывали по формуле:

$$IA = АКБ50/50Э, \quad (1)$$

где IA — индекс адгезии, АКБ50 — количество клеток бактерий, прикрепившихся к 50 эпителиоцитам, 50Э — 50 изученных эпителиоцитов.

## Исследование антибиопленочных свойств растительных комплексов

Исследование осуществляли с помощью регистрации формирующихся микроколоний бактерий на плотной питательной среде. Для этого суточную бактериальную культуру исследуемых штаммов стандартизировали измерением мутности 0,5 по МакФарланду. Методом серийных разведений концентрацию клеток доводили до  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл, смешивали с каждым растительным комплексом в соотношении 1 : 10 и по отдельности каждую распределяли по стерильному предметному стеклу. В качестве контроля использовали инокулом бактерий в питательном бульоне без добавления препарата. Далее образцы помещали в термостат при температуре  $+37^\circ\text{C}$  на 3 ч. После этого все стекла просматривали под микроскопом Axio Scope A1 (Zeiss; Германия) при увеличении в 400 раз. Снимки выполняли с использованием профессиональной стационарной цифровой фотокамеры AxioCam HRc Rev3 (Zeiss; Германия). Отмечали количество выросших бактериальных микроколоний в контрольных и экспериментальных пробах, просматривая несколько полей зрения. Снижение в экспериментальных образцах количества микроколоний более чем в два раза по сравнению с контролем свидетельствует о хорошем антибиопленочном свойстве растительной композиции в различных формах.

Статистический анализ данных выполняли в среде пакета MS Excel 2010 (Microsoft; США). Обработку полученных результатов производили по методу Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Исследование антибактериальной активности

Результаты антибактериальной активности представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Описание результатов:

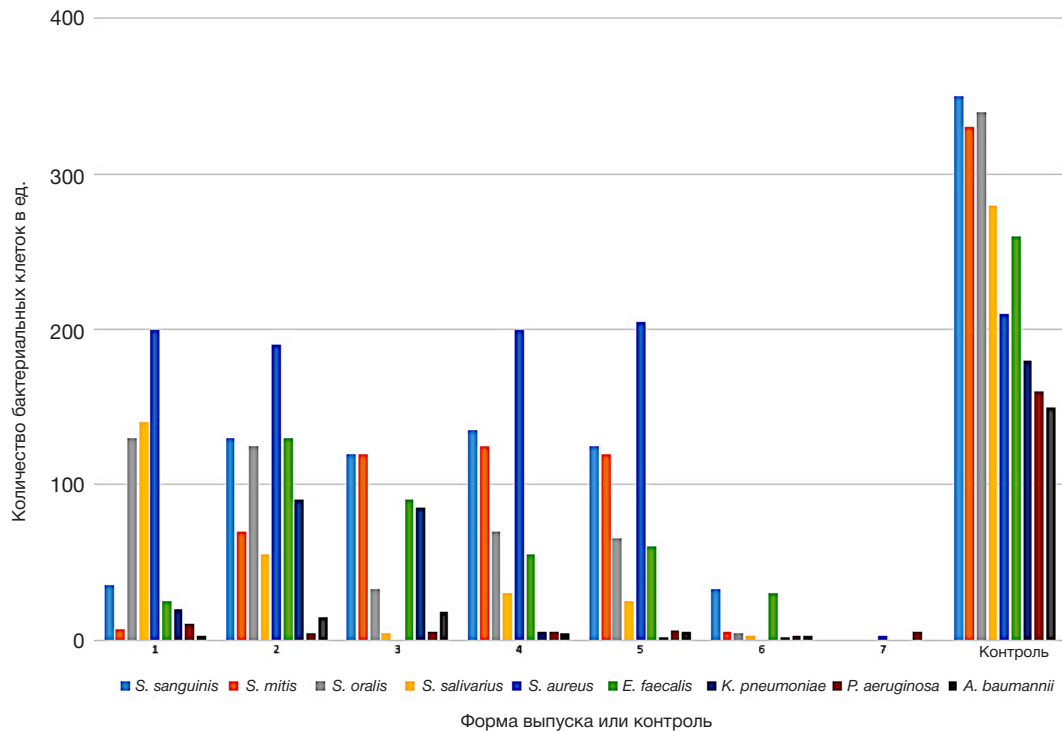
1. Эликсир, имеющий в составе 20% этилового спирта по массе и максимальную концентрацию активных компонентов: экстракт коры осины, альгинат натрия и хлорофиллин натрия-меди, показал наибольшую эффективность против бактериальной флоры.

2. Гель 1 с химическим антибактериальным агентом (хлоргексидином) в бактерицидной концентрации 0,12% и растительными активными компонентами (альгинат натрия, Д-пантенол, аллантоин, метил салицилат, ментол, экстракт пихты, хлорофиллин натрия-меди, эвгенол) показал сопоставимую высокую антибактериальную эффективность.

3. Гель 3 аналогичного состава с истекшим сроком годности 2 года показал среднюю антибактериальную активность.

4. Ополаскиватель и Гель 2 с корой осины и ДКВ не показали высокой цидной активности против пародонтопатогенной флоры.

5. Масляные растворы показали низкую цидную активность против пародонтопатогенной флоры.



**Рис. 1.** Исследование антибактериальных свойств растительных комплексов. 1 — ополаскиватель для полости рта (Ополаскиватель); 2 — гель с хлорофиллом, корой осины и ДКВ для полости рта (Гель 2); 3 — гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 1); 4 — масло с хлорофиллом (Масло Фитолон); 5 — масло с каротиноидами из хвои (Масло Провитам); 6 — гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 3); 7 — зубной эликсир с экстрактом осинового коры и хлорофиллом (Эликсир)

### Исследование антиадгезивной активности

Результаты антиадгезивной активности представлены в табл. 2.

Описание результатов:

Эликсир и гель с ДКВ (Гель 2) показали сопоставимую максимальную антиадгезивную эффективность.

2. Гель с ХГ и ополаскиватель показали средний эффект.

3. Масляные растворы показали низкую антиадгезивную активность.

### Исследование антибиопленочных свойств растительных комплексов

Результаты антибиопленкообразующего действия различных форм выпуска представлены на рис. 2–4.

Описание результатов:

**Таблица 1.** Исследование антибактериальных свойств растительных комплексов

Объект исследования (микроорганизм)	Количество выросших колоний в присутствии растительных комплексов (КОЕ/мл), (M + m)							Количество выросших колоний в контроле (КОЕ/мл)
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>S. sanguinis</i>	35 ± 5	130 ± 13	120 ± 11	135 ± 15	125 ± 14	33 ± 5	0 ± 1	350 ± 28
<i>S. mitis</i>	7 ± 2	70 ± 6	120 ± 14	125 ± 11	120 ± 9	5 ± 2	0 ± 1	330 ± 31
<i>S. oralis</i>	130 ± 13	125 ± 11	33 ± 5	70 ± 6	65 ± 6	4 ± 1	0 ± 1	340 ± 24
<i>S. salivarius</i>	140 ± 8	55 ± 5	4 ± 2	30 ± 4	25 ± 3	3 ± 1	0 ± 1	280 ± 18
<i>S. aureus</i>	200 ± 18	190 ± 15	0 ± 1	200 ± 17	205 ± 20	0 ± 1	3 ± 1	210 ± 15
<i>E. faecalis</i>	25 ± 4	130 ± 15	90 ± 8	55 ± 6	60 ± 5	30 ± 3	0 ± 1	260 ± 25
<i>K. pneumoniae</i>	20 ± 3	90 ± 6	85 ± 7	5 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	0 ± 1	180 ± 15
<i>P. aeruginosa</i>	10 ± 2	4 ± 2	5 ± 2	5 ± 1	6 ± 2	3 ± 1	5 ± 2	160 ± 14
<i>A. baumannii</i>	3 ± 1	15 ± 2	18 ± 3	4 ± 1	5 ± 2	3 ± 1	0 ± 1	150 ± 17

**Примечание:** 1 — ополаскиватель для полости рта (Ополаскиватель); 2 — гель с хлорофиллом, корой осины и ДКВ для полости рта (Гель 2); 3 — гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 1); 4 — масло с хлорофиллом (Масло Фитолон); 5 — масло с каротиноидами из хвои (Масло Провитам); 6 — гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 3); 7 — зубной эликсир с экстрактом осинового коры и хлорофиллом (Эликсир)

Все средства показали высокую антибиопленкообразующую активность. Максимальный результат получен в случае применения гелевых форм (Гель 1 и Гель 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Флора имеет тенденцию к изменению состава и качеств биопленки [1, 8, 20, 21, 23], поэтому необходимо оценивать физические показатели биопленки у конкретного пациента до начала лечения для более точной диагностики участия системных и общесоматических проблем, уровня гигиенической культуры пациента, персонализированного подбора плана лечения, учета фенотипических показателей и достижения прогнозируемого положительного клинического результата, стабильного в долгосрочной перспективе при реабилитации пациентов с пародонтитом.



Таблица 2. Исследование антиадгезивных свойств растительных комплексов

Исследуемая композиция	Индекс адгезии (M + m)	
	Контроль	<i>S. sanguinis</i>
1 — Ополаскиватель для полости рта (Полоскание)	75 + 6	33 + 5
2 — Гель с хлорофиллом, корой осины и ДКВ для полости рта (Гель 2)		24 + 4
3 — Гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 1)		30 + 5
4 — Масло с хлорофиллом (Масло Фитолон)		42 + 6
5 — Масло с каротиноидами из хвои (Масло Провитам)		37 + 4
6 — Гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 3)		48 + 5
7 — Зубной эликсир с экстрактом осиновой коры и хлорофиллом (Эликсир)		21 + 4

**Примечание:** 1 — ополаскиватель для полости рта (Ополаскиватель); 2 — гель с хлорофиллом, корой осины и ДКВ для полости рта (Гель 2); 3 — гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 1); 4 — масло с хлорофиллом (Масло Фитолон); 5 — масло с каротиноидами из хвои (Масло Провитам); 6 — гель с хлорофиллом и хлоргексидином для полости рта (Гель 3); 7 — зубной эликсир с экстрактом осиновой коры и хлорофиллом (Эликсир).

Антибактериальная активность растительных комплексов в отношении пародонтопатогенных бактерий проявляется в результате трех процессов: антиадгезивной активности, собственно антибактериального действия и антибиопленочных свойств [2, 8]. Поскольку любой инфекционный процесс бактериальной этиологии начинается с адгезии и колонизации микроорганизмов места внедрения, выявление антиадгезивных свойств у препаратов, используемых в стоматологической практике, позволяет предотвратить на ранних этапах адгезию и колонизацию бактерий. Тем самым ослабляется первая фаза инфекционного процесса и предотвращается образование бактериальной биопленки. У исследуемых растительных комплексов выявлена высокая антибиопленочная активность, что снижает вероятность развития очага хронической инфекции в области пародонта. В свою очередь наличие прямого антибактериального действия у растительных комплексов способствует снижению количества бактерий, при котором инициация инфекционного процесса становится маловероятной [6, 12].

Высокую антисептическую эффективность эликсира предположительно обеспечивает содержание этилового спирта (20% по массе) и высокая концентрация растительных антибактериальных компонентов.

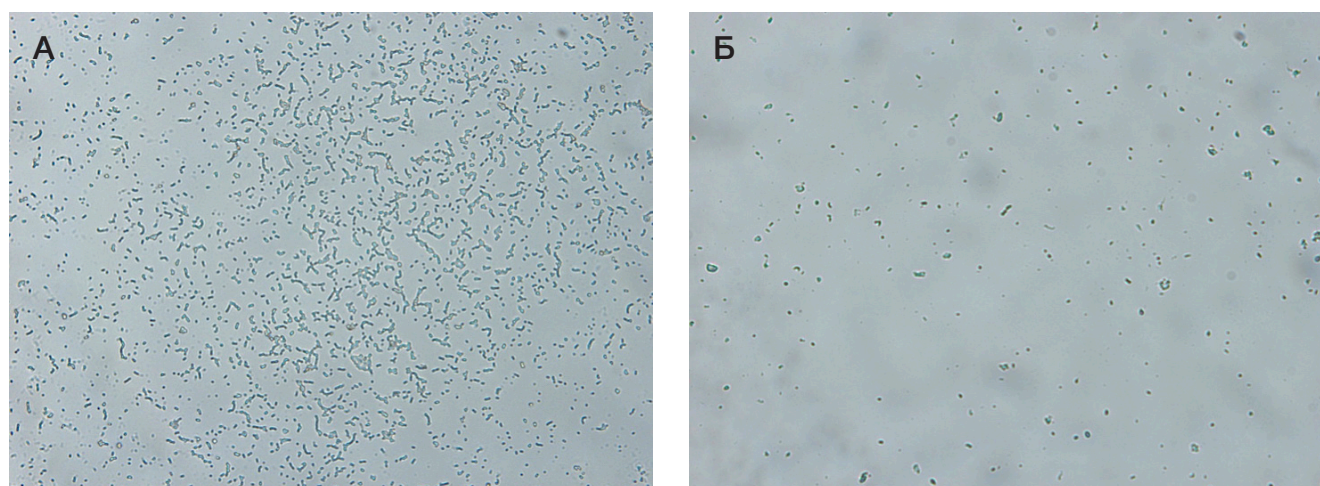
Эффективность гелевой формы (Гель 1) вероятнее всего связана с пролонгированным высвобождением активных веществ за счет уникальной биоадгезивной пленкообразующей основы.

Сохранение антисептической эффективности гелевой формы аналогичного состава с истекшим сроком годности (Гель 3) с ее сравнительным снижением наиболее вероятно вызвано старением компонентов основы и ее быстрой деградацией, снижением кумулятивной активности сложных растительных комплексов, при сохранении антисептической активности хлоргексидина. Это также дает основание предполагать комплексное мультинаправленное комбинированное действие исследуемой композиции.

Высокая антиадгезивная эффективность вероятнее всего обусловлена альгинатом натрия, экстрактом коры осины и содержанием спирта в случае эликсира; за счет альгината натрия, ДКВ и экстракта коры осины в случае гелевой формы (Гель 2).

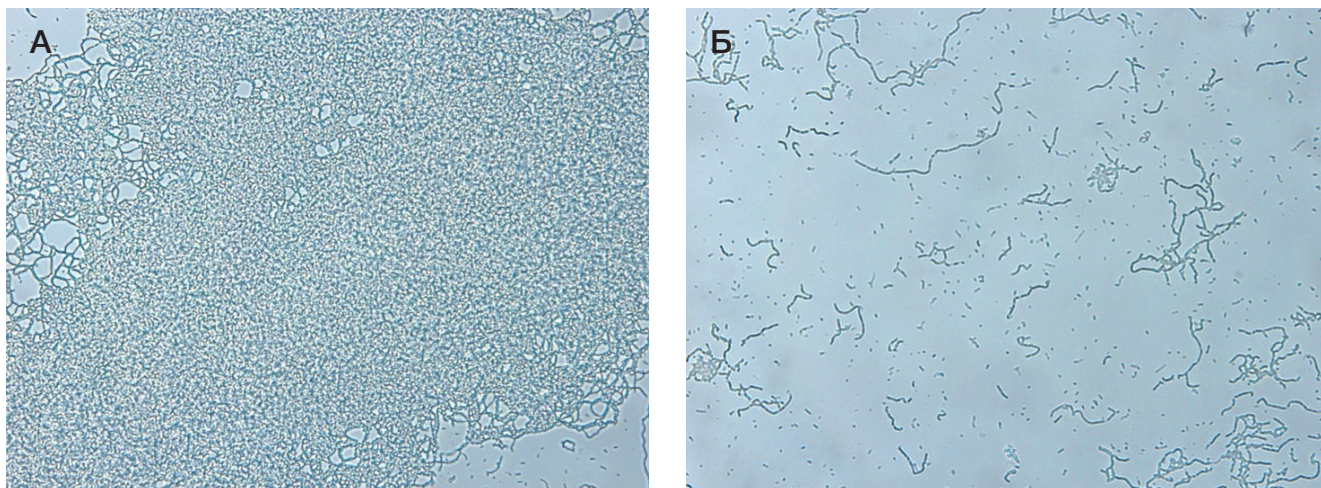
Сравнительная меньшая антисептическая активность водных и масляных форм связана с низкой концентрацией прямых антибактериальных агентов (экстракта коры осины в первую очередь) и малого времени экспозиции.

Форма выпуска существенно влияет на время экспозиции активных растительных комплексов: гели дают максимальный эффект за счет замедленного равномерного высвобождения действующих веществ, биоадгезии и образования пленки на десне и слизистой в полости рта [13–14]. Высокая концентрация активных веществ в водно-спиртовых растворах также вызывает стойкий и длительный антибактериальный эффект, но не обеспечивает длительной экспозиции на тканях пародонта. Гель с истекшим сроком годности теряет активность за



**Рис. 2.** Антибиопленочные свойства формы Гель 1 против *S. sanguinis*. А. Колонии *S. sanguinis* до нанесения геля с хлорофиллом и хлоргексидином. Б. Колонии *S. sanguinis* после нанесения геля с хлорофиллом и хлоргексидином (увеличение  $\times 400$ )



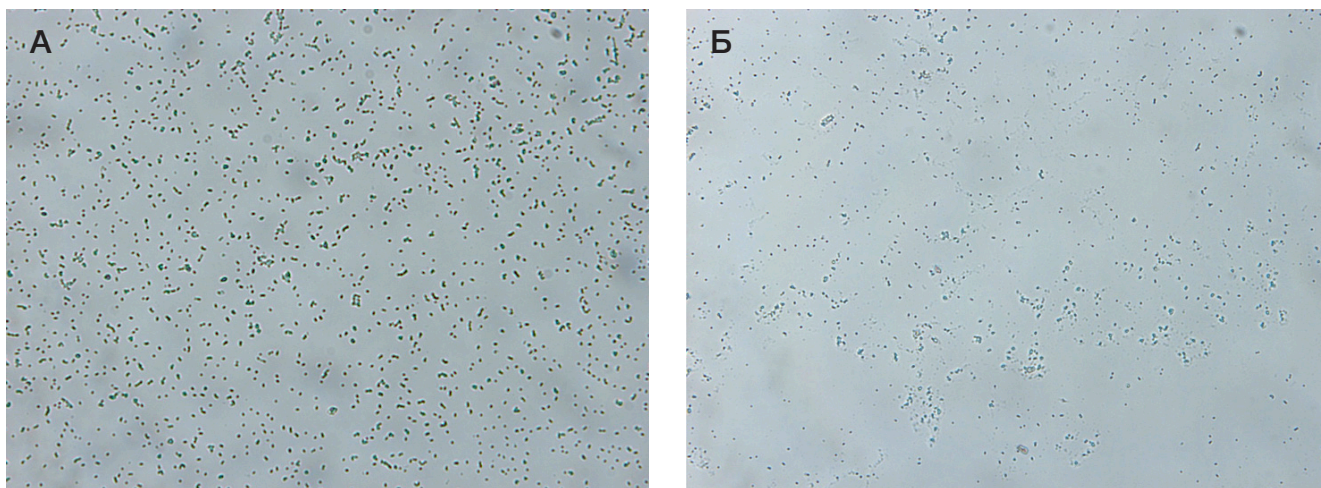


**Рис. 3.** Антибиопленочные свойства формы Ополаскиватель против *S. mitis*. **А.** Колонии *S. mitis* до нанесения полоскания. **Б.** Колонии *S. mitis* после нанесения полоскания

счет старения основы из-за потери влаги. Целесообразно изготавливать гелевые формы небольшими сериями или в отдельных случаях экстенпорально. Основа гелей действует особенным образом: адгезируясь к высушенной поверхности слизистой или десны, длительно сохраняясь в локусе экспозиции, замедленно высвобождая активные компоненты, давая при этом возможность снижать дозировки в композиции; что требует дополнительных исследований.

Таким образом, трехэтапное антибактериальное действие растительных комплексов снижает риск развития пародонтитного процесса, даже в случае присутствия в этой области пародонтопатогенных бактерий. Использование в острый период в комплексной терапии после проведения кабинетной профессиональной гигиены растительных комплексов, особенно в виде гелевых форм выпуска, способствует быстрому восстановлению структуры и состояния тканей пародонта, нормализации трофики и питания, дыхания и обменных процессов в тканях. А применение после купирования острого процесса способствует удлинению периода ремиссии и существенно снижает риск повторных обострений, их течение и повторное повреждение тканей инфекционными агентами.

В острый период до 14–21 дня целесообразно применять комбинацию: Эликсир + Гель с хлоргексидином



**Рис. 4.** Антибиопленочные свойства формы Масло Провитам против *S. oralis*. **А.** Колонии *S. oralis* до нанесения масла с каротиноидами хвои. **Б.** Колонии *S. oralis* после нанесения масла с каротиноидами хвои

0,12%, а после купирования острого процесса: Полоскание и Гель с корой осины и ДКВ [11, 13]. Полоскание и Гель с корой осины и ДКВ могут применяться для профилактики обострений у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом из-за отсутствия химических компонентов, вызывающих резистентность бактерий при сохранении неспецифического антибактериального эффекта за счет изменения проницаемости клеточной стенки бактерий.

#### ВЫВОДЫ

У исследованных растительных комплексов в гелевой форме выявлена высокая антисептическая, антиадгезивная и антибиопленочная активность. Масляные формы выпуска целесообразно использовать в комплексной терапии заболеваний СОР (слизистой оболочки рта); эликсир и Гель с хлорофиллом и хлоргексидином 0,12% — в комплексной терапии пародонтита, Гель с корой осины и ДКВ и Ополаскиватель — для профилактики пародонтита и других поражений десны СОР. Необходимы дальнейшие исследования активности растительных комплексов в различных формах с титрованием концентраций у эликсира по сравнению с ополаскивателем, сравнением результатов частоты нанесения гелевых форм между собой и определением срока наступления резистентности

в случае Геля с химическим антисептиком. Важно продолжить работу по оценке биологических свойств пародонтопатогенных микроорганизмов *in vitro*, используя экспериментальные модели смешанных (мультивидовых) биопленок. Флора полости рта сильно изменилась

за последние 20 лет, что обусловлено и спецификой регионов проживания. При проведении исследований рекомендовано сначала оценивать актуальный состав пародонтопатогенных бактерий в налете и на поверхности корня зуба, а также в пародонтальной жидкости.

## Литература

1. Бородулина И. И., Васильева Л. В., Румакин В. П., Ковалевский А. М., Фадеев Р. А., Гребнев Г. А. Морфология пародонтального кармана при хроническом генерализованном пародонтите средней степени тяжести. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2019; 14: 164–7.
2. Цепов Л. М., Голева Н. А. Роль микрофлоры в возникновении воспалительных заболеваний пародонта. Пародонтология. 2009; 1: 7–12.
3. Tonetti MS, Van Dyke TE. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFPA. AP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. J Periodontol. 2013; 84 (4): 24–29.
4. Карданова Л. В., Тхазапlicheва М. Т., Балкаров А. О. Некоторые аспекты местного лечения хронических воспалительных заболеваний пародонта. Современные проблемы науки и образования. 2014; 6: 1048–54.
5. Иорданишвили А. К., Ковалевский А. М. Факультетская стоматология: руководство для врачей-стоматологов. М.: СИМК, 2015; 504 с.
6. Тхазапlicheва, М. Т., Батырбекова Ф. Р. Сравнительная оценка эффективности изолированного и сочетанного применения хлоргексидина и низкочастотного ультразвука в комплексном лечении пародонтита средней степени тяжести. Материалы V Всемирного конгресса по иммунологии и аллергии. Аллергология и иммунология. 2007; 8 (1): 145.
7. Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse J Am Dent Assoc. 2006; 137: 16–21.
8. Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. Braz Oral Res. 2009; 23 (1): 39–48.
9. Николаев А. И., Цепов Л. М. Практическая стоматология: учеб. пособие. М.: МЕДпресс-информ, 2018; 928 с.
10. Кيون И. Д. Сравнительное исследование отбеливающих зубных паст с умеренной абразивностью. Молодой ученый. 2015; 6: 274–7.
11. Федоров Ю. А., Дрожжина В. А. Профилактика стоматологических заболеваний. В кн.: В. А. Козлов, редактор. Стоматология: учебник для медицинских вузов и последипломной подготовки специалистов. СПб.: СпецЛит, 2011; 36–67.
12. Джиоева Р. Ф. Клиническая эффективность фитотерапии при лечении хронического генерализованного пародонтита. Вестник медицинского стоматологического института. 2013; 4 (27): 27–29.
13. Улитовский С. Б. Полоскания для рта или жидкие средства гигиены рта. СПб.: Человек, 2017; 192 с.
14. Улитовский С. Б. Средства индивидуальной гигиены рта: учебник для последиплом. образования. М.: Спец. изд-во мед. кн., 2018; 200 с.
15. Дрожжина В. А., Петрищев Н. Н., Федоров Ю. А. Повышение физиологической резистентности тканей пародонта белых крыс при действии биологически активных веществ ламинарии. Физиол. журнал. 1995; 81 (2): 126–33.
16. Блинова К. Ф., Яковлев Г. П., редакторы. Ботанико-фармакогностический словарь. М.: Высшая школа, 1990; 272 с.
17. Дейнеко И. П., Фаустова Н. М. Элементарный и групповой химический состав коры и древесины сосны. Химия растительного сырья. 2015; 1: 51–62.
18. Рабанова И. Ю., Турецкова В. Ф., Зверев Я. Ф., Талалаева О. С. Изучение острой токсичности и антиоксидантной активности экстракта листьев осины сухого. Фундаментальные исследования. 2012; 9: 308–12.
19. Беляцкая А. В., Кашликова И. М., Елагина А. О., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И. Нитрофураны для наружного применения. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019; 8 (2): 38–47.
20. He X, Hu W, Kaplan CW, Guo L, Shi W, Lux R. Adherence to streptococci facilitates *Fusobacterium nucleatum* integration into an oral microbial community. Microb Ecol. 2012; 63 (3): 532–42. DOI: 10.1007/s00248-011-9989-2.
21. Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. Streptococcus sanguinis biofilm formation & interaction with oral pathogens. Future Microbiol. 2018; 13 (8): 915–32. DOI: 10.2217/fmb-2018-0043.
22. Kumarasamy B, Manipal S, Duraisamy P, Ahmed A, Mohanaganes S, Jeevika C. Role of aqueous extract of morinda citrifolia (Indian noni) ripe fruits in inhibiting dental caries-causing streptococcus mutans and streptococcus mitis. J Dent (Tehran). 2014; 11 (6): 703–10.
23. Cabal B, Cafini F, Esteban-Tejeda L, et al. Inhibitory effect on *in vitro* Streptococcus oralis biofilm of a soda-lime glass containing silver nanoparticles coating on titanium alloy. PLoS One. 2012; 7 (8): e42393. DOI: 10.1371/journal.pone.0042393.
24. Mirpour M, Gholizadeh Siahmazgi Z, Sharifi Kiasaraie M. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on Streptococcus mutans PTCC 1683 and Streptococcus salivarius PTCC 1448. J Oral Biol Craniofac Res. 2015; 5 (1): 7–10. DOI: 10.1016/j.jobcr.2015.02.002.
25. Wu S, Liu Y, Zhang H, Lei L. Nano-graphene oxide with antisense *walR* RNA inhibits the pathogenicity of *Enterococcus faecalis* in periapical periodontitis. J Dent Sci. 2020; 15 (1): 65–74. DOI: 10.1016/j.jds.2019.09.006.
26. Lee J, Lee JB, Song HY, et al. Diagnostic Models for Screening of Periodontitis with Inflammatory Mediators and Microbial Profiles in Saliva. Diagnostics (Basel). 2020; 10 (10): 820. DOI: 10.3390/diagnostics10100820/.
27. Cai Z, Zhu T, Liu F, Zhuang Z, Zhao L. Co-pathogens in Periodontitis and Inflammatory Bowel Disease. Front Med (Lausanne). 2021; 8: 723719. DOI: 10.3389/fmed.2021.723719.
28. Li Q, Wang H, Tan L, et al. Oral Pathogen *Fusobacterium nucleatum* Coaggregates With *Pseudomonas aeruginosa* to Modulate the Inflammatory Cytotoxicity of Pulmonary Epithelial Cells. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11: 643913. DOI: 10.3389/fcimb.2021.643913.
29. Richards AM, Abu Kwaik Y, Lamont RJ. Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. Mol Oral Microbiol. 2015; 30 (1): 2–15. DOI: 10.1111/omi.12072.
30. Ковалевский А. М., Латиф И. И., Ковалевский В. А., Шаров А. Н., Носова М. А., Некрасова В. Б., авторы; ООО «ФИТОЛОН-НАУКА», патентообладатель. Композиция в форме геля для ухода за тканями полости рта. Патент РФ № 2733718 от 06.10.2020.
31. Никитенко В. В., Ковалевский А. М., Латиф И. И. Эффективность применения композиции в форме геля с экстрактом коры осины и хлорофиллом для лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта. В сборнике: В. В. Никитенко, В. А. Железняк, редакторы. Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы теоретической и практической стоматологии», 7-8 октября 2021 г. СПб., 2021; 128–33.
32. Латиф И. И., Ковалевский А. М., Носова М. А., Шаров А. Н., Краева Л. А. Оценка эффективности гелевой композиции для ухода тканями полости рта. Стоматологическая весна в



Белгороде — 2022: сборник трудов Международной научно-практической конференции к 100-летию МГМСУ. Белгород: «БелГУ», 2022; 276 с.

33. Благодравова А. С., Афонин А. Н., Воробьева О. Н.,

Широкова И. Ю. Сравнительный анализ адгезивности микроорганизмов, выделенных от больных и с объектов внешней среды лечебно-профилактических учреждений. Медицинский альманах. 2011; 5 (18): 215–8.

## References

- Borodulina II, Vasileva LV, Rumakin VP, Kovalevskij AM, Fadeev RA, Grebnev GA. Morfologiya parodontal'nogo karmana pri xronicheskom generalizovannom parodontite srednej stepeni tyazhesti. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza*. 2019; 14: 164–7. Russian.
- Cepov LM, Goleva NA. Rol' mikroflory v vznikenii vospalitel'nyx zabolevanij parodonta. *Parodontologiya*. 2009; 1: 7–12. Russian.
- Tonetti, MS, Van Dyke TE. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EPPA. AP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013; 84 (4): 24–29.
- Kardanova LV, Txazaplizheva MT, Balkarov AO. Nekotorye aspekty mestnogo lecheniya xronicheskix vospalitel'nyx zabolevanij parodonta. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 6: 1048–54. Russian.
- Iordanishvili AK, Kovalevskij AM. Fakul'tetskaya stomatologiya: rukovodstvo dlya vrachej-stomatologov. M.: SIMK, 2015; 504 s. Russian.
- Txazaplizheva MT, Bатыrbekova FR. Sravnitel'naya ocenka ehffektivnosti izolirovannogo i sochetannogo primeneniya xlorgekSIDINA i nizkochastotnogo ul'trazvuka v kompleksnom lechenii parodontita srednej stepeni tyazhesti. *Materialy V Vsemirnogo kongressa po immunologii i allergii. Allergologiya i immunologiya*. 2007; 8 (1): 145. Russian.
- Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse *J Am Dent Assoc*. 2006; 137: 16–21.
- Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. *Braz Oral Res*. 2009; 23 (1): 39–48.
- Nikolaev AI, Cepov LM. *Prakticheskaya stomatologiya: ucheb. posobie*. M.: MEDpress-inform, 2018; 928 s. Russian.
- Kiyun ID. Sravnitel'noe issledovanie otbelivayushhix zubnyx past s umerennoj abrazivnost'yu. *Molodoy uchenyj*. 2015; 6: 274–7. Russian.
- Fedorov YuA, Drozhzhina VA. Profilaktika stomatologicheskix zabolevanij. V kn.: V. A. Kozlov, redaktor. *Stomatologiya: uchebnik dlya medicinskix vuzov i poslediplomnoj podgotovki specialistov*. SPb.: SpecLit, 2011; 36–67. Russian.
- Dzhioeva RF. Klinicheskaya ehffektivnost' fitoterapii pri lechenii xronicheskogo generalizovannogo parodontita. *Vestnik medicinskogo stomatologicheskogo instituta*. 2013; 4 (27): 27–29. Russian.
- Ulitskij SB. Poloskaniya dlya rta ili zhidkie sredstva gigieny rta. SPb.: Chelovek, 2017; 192 s. Russian.
- Ulitskij SB. *Sredstva individual'noj gigieny rta: uchebnik dlya poslediplom. obrazovaniya*. M.: Spec. izd-vo med. kn., 2018; 200 s. Russian.
- Drozhzhina VA, Petrishhev NN, Fedorov YuA. Povyshenie fiziologicheskoy rezistentnosti tkanej parodonta belyx kryx pri dejstvii biologicheskii aktivnyx veshhestv laminarii. *Fiziol. zhurnal*. 1995; 81 (2): 126–33. Russian.
- Blinova KF, Yakovlev GP, redaktory. *Botaniko-farmakognosticheskij slovar'*. M.: Vysshaya shkola, 1990; 272 s. Russian.
- Blinova KF, Yakovlev GP, redaktory. *Botaniko-farmakognosticheskij slovar'*. M.: Vysshaya shkola, 1990; 272 s. Russian.
- Lobanova IYu, Tureckova VF, Zverev YaF, Talalaea OS. Izuchenie ostroj toksichnosti i antioksidantnoj aktivnosti ehkstrakta list'ev osiny suxogo. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; 9: 308–12. Russian.
- Belyackaya AV, Kashlikova IM, Elagina AO, Krasnyuk (ml.) II, Krasnyuk II, Stepanova O. I. Nitrofurany dlya naruzhnogo primeneniya. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyx sredstv*. 2019; 8 (2): 38–47. Russian.
- He X, Hu W, Kaplan CW, Guo L, Shi W, Lux R. Adherence to streptococci facilitates *Fusobacterium nucleatum* integration into an oral microbial community. *Microb Ecol*. 2012; 63 (3): 532–42. DOI: 10.1007/s00248-011-9989-2.
- Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. Streptococcus sanguinis biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol*. 2018; 13 (8): 915–32. DOI: 10.2217/fmb-2018-0043.
- Kumarasamy B, Manipal S, Duraisamy P, Ahmed A, Mohanaganesh S, Jeevika C. Role of aqueous extract of morinda citrifolia (Indian noni) ripe fruits in inhibiting dental caries-causing streptococcus mutans and streptococcus mitis. *J Dent (Tehran)*. 2014; 11 (6): 703–10.
- Cabal B, Cafini F, Esteban-Tejeda L, et al. Inhibitory effect on in vitro Streptococcus oralis biofilm of a soda-lime glass containing silver nanoparticles coating on titanium alloy. *PLoS One*. 2012; 7 (8): e42393. DOI: 10.1371/journal.pone.0042393.
- Mirpour M, Gholizadeh Siahmazgi Z, Sharifi Kiasaraie M. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on Streptococcus mutans PTCC 1683 and Streptococcus salivarius PTCC 1448. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2015; 5 (1): 7–10. DOI: 10.1016/j.jobcr.2015.02.002.
- Wu S, Liu Y, Zhang H, Lei L. Nano-graphene oxide with antisense walR RNA inhibits the pathogenicity of Enterococcus faecalis in periapical periodontitis. *J Dent Sci*. 2020; 15 (1): 65–74. DOI: 10.1016/j.jds.2019.09.006.
- Lee J, Lee JB, Song HY, et al. Diagnostic Models for Screening of Periodontitis with Inflammatory Mediators and Microbial Profiles in Saliva. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10 (10): 820. DOI: 10.3390/diagnostics10100820/.
- Cai Z, Zhu T, Liu F, Zhuang Z, Zhao L. Co-pathogens in Periodontitis and Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 723719. DOI: 10.3389/fmed.2021.723719.
- Li Q, Wang H, Tan L, et al. Oral Pathogen *Fusobacterium nucleatum* Coaggregates With *Pseudomonas aeruginosa* to Modulate the Inflammatory Cytotoxicity of Pulmonary Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 643913. DOI: 10.3389/fcimb.2021.643913.
- Richards AM, Abu Kwaik Y, Lamont RJ. Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. *Mol Oral Microbiol*. 2015; 30 (1): 2–15. DOI: 10.1111/omi.12072.
- Kovalevskij AM, Latif II, Kovalevskij VA, Sharov AN, Nosova MA, Nelrasova VB, avtory; OOO «FITOLON-NAUKA», patentoobladatel'. *Kompoziciya v forme gelya dlya uxoda za tkanyami polosti rta*. Patent RF # 2733718 ot 06.10.2020. Russian.
- Nikitenko VV, Kovalevskij AM, Latif II. Ehffektivnost' primeneniya kompozicii v forme gelya s ehkstraktom kory osiny i xlorofillom dlya lecheniya i profilaktiki vospalitel'nyx zabolevanij parodonta. V sbornike: V. V. Nikitenko, V.A. Zheleznyak, redaktory. *Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii «Aktual'nye voprosy teoreticheskoy i prakticheskoy stomatologii»*, 7-8 oktyabrya 2021 g. SPb., 2021; 128–33. Russian.
- Latif II, Kovalevskij AM, Nosova MA, Sharov AN, Kraeva LA. Ocenka ehffektivnosti gelevoj kompozicii dlya uxoda tkanyami polosti rta. *Stomatologicheskaya vesna v Belgorode — 2022: sbornik trudov Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii k 100-letiyu MГMSU*. Belgorod: «BelGU», 2022; 276 s. Russian.
- Blagoravova AS, Afonin AN, Vorobeva ON, Shirokova IYu. Sravnitel'nyj analiz adgezivnosti mikroorganizmov, vydelennyx ot bol'nyx i s ob'ektov vneshnej sredy lechebno-profilakticheskix uchrezhdenij. *Medicinskij al'manax*. 2011; 5 (18): 215–8. Russian.