

МЕДИЦИНА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ ФМБА РОССИИ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Вероника Скворцова, д. м. н., профессор, член-корр. РАН

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Игорь Берзин, д. м. н., профессор; Дарья Крючко, д. м. н., доцент

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ Всеволод Белоусов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН; Антон Кескинов, к. м. н.; Валентина Гейдебрект, к. б. н.

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Евгений Лукьянов

ПЕРЕВОДЧИКИ Надежда Тихомирова, Вячеслав Витлок

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. К. Агапов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. В. Богомолов, д. т. н., профессор (Москва, Россия)

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

И. В. Борисевич, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. Ю. Бушманов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Р. Валента, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Н. А. Дайхес, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

С. В. Дударенко, д. м. н., доцент (Санкт-Петербург, Россия)

Л. А. Ильин, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Ю. В. Лобзин, д. м. н., профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)

В. В. Никифоров, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

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

Р. В. Петров, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)

А. С. Радилов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

В. Р. Рембовский, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

А. С. Самойлов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

В. И. Сергиенко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

С. В. Сидоркевич, д. м. н. (Москва, Россия)

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

И. Б. Ушаков, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)

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

С. М. Юдин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. В. Аклев, д. м. н., профессор (Челябинск, Россия)

С. А. Аракелов, к. б. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

В. П. Баклашев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

М. О. Дегтева, к. т. н. (Челябинск, Россия)

Н. В. Ефименко, д. м. н., профессор (Пятигорск, Россия)

Е. В. Казакевич, д. м. н., профессор (Архангельск, Россия)

В. П. Катунцев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Климанов, д. ф.-м. н., профессор (Москва, Россия)

Д. В. Клинов, к. ф.-м. н. (Москва, Россия)

Н. А. Кошурникова, д. м. н., профессор (Озерск, Россия)

И. П. Миннуллин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

И. Г. Мосягин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. М. Панасенко, д. б. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

В. А. Рогожников, д. м. н. (Москва, Россия)

С. А. Романов, к. б. н. (Озерск, Россия)

С. А. Сотниченко, д. м. н. (Владивосток, Россия)

Т. Г. Суранова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. М. Тахауов, д. м. н., профессор (Северск, Россия)

Н. К. Шандала, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

С. М. Шинкарев, д. т. н. (Москва, Россия)

Г. А. Шипулин, к. м. н. (Москва, Россия)

Т. В. Яковлева, д. м. н. (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ editor@fmba.press

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@fmba.press

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@fmba.press

АДРЕС РЕДАКЦИИ Волоколамское шоссе, д. 30, стр. 1, г. Москва, 123182, Россия

Журнал включен в Scopus в 2022 г.

Scopus[®]

Журнал включен в РИНЦ, IF 2018: 0,570

**НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU**

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 1292)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Здесь находится открытый архив журнала

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.47183/mes.2022-03

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № ФС77-25124 от 27 июля 2006 года

Учредитель и издатель: Федеральное медико-биологическое агентство fmba.gov.ru

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



Подписано в печать 30.09.2022

Тираж 500 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

EXTREME MEDICINE

SCIENTIFIC AND PRACTICAL REVIEWED JOURNAL OF FMBA OF RUSSIA

EDITOR-IN-CHIEF Veronika Skvortsova, DSc, professor, RAS corresponding member

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Igor Berzin, DSc, professor; Daria Kryuchko, DSc

EDITORS Vsevolod Belousov, DSc, professor, RAS corresponding member; Anton Keskinov, PhD; Valentina Geidebrekht, PhD

TECHNICAL EDITOR Evgeniy Lukyanov

TRANSLATORS Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Agapov VK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomolov AV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Boyko AN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Borisevich IV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bushmanov AY, DSc, professor (Moscow, Russia)
Valenta R, PhD, professor (Moscow, Russia)
Daikhes NA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Dudarenko SV, DSc (Saint-Petersburg, Russia)
Ilyin LA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Lobzin YV, member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Nikiforov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Olesova VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Petrov RV, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Sadilov AS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Rembovsky VR, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Samoilov AS, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Sergienko VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Sidorceovich SV, DSc (Moscow, Russia)
Troitsky AV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ushakov IB, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Khaitov MR, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Yudin SM, DSc, professor (Moscow, Russia)

ADVISORY BOARD

Akleev AV, DSc, professor (Chelyabinsk, Russia)
Arakelov SA, PhD, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Baklaushev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)
Degteva MO, PhD (Chelyabinsk, Russia)
Efimenko NV, DSc, professor (Pyatigorsk, Russia)
Kazakevich EV, DSc, professor (Arkhangelsk, Russia)
Katuntsev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)
Klimanov VA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Klinov DV, PhD (Moscow, Russia)
Koshurnikova NA, DSc, professor (Ozersk, Russia)
Minnullin IP, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Mosyagin IG, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Panasenko OM, DSc, member of RAS, professor (Moscow, Russia)
Rogozhnikov VA, DSc, (Moscow, Russia)
Romanov SA, PhD (Ozersk, Russia)
Sotnichenko SA, DSc (Vladivostok, Russia)
Suranova TG, PhD, docent (Moscow, Russia)
Takhauov RM, DSc, professor (Seversk, Russia)
Shandala NK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shinkarev SM, DSc (Moscow, Russia)
Shipulin GA, PhD (Moscow, Russia)
Yakovleva TV, DSc (Moscow, Russia)

SUBMISSION editor@fmba.press

CORRESPONDENCE editor@fmba.press

COLLABORATION manager@fmba.press

ADDRESS Volokolamskoe shosse, 30, str. 1, Moscow, 123182, Russia

Indexed in Scopus in 2022

Scopus®

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,570

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 1292)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.47183/mes.2022-03

The mass media registration certificate № 25124 issued on July 27, 2006

Founder and publisher: Federal medical-biological agency fmba.gov.ru

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



Approved for print 30.09.2022

Circulation: 500 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	5
Вакцина на основе N-белка SARS-COV-2 формирует выраженный Т-клеточный иммунитет на N-белок новых штаммов С. О. Рабдано, В. Е. Мухин, В. В. Макаров, Г. О. Рудаков, Э. А. Рузанова, С. А. Араkelов, М. Р. Хаитов, С. М. Юдин, Д. С. Крючко, И. А. Берзин, А. Э. Евтушенко, В. П. Трухин, В. И. Скворцова N protein based vaccine against SARS-COV-2 produces a strong T cell immune response to N protein of novel strains Rabdano SO, Mukhin VE, Makarov VV, Rudakov GO, Ruzanova EA, Arakelov SA, Khaitov MR, Yudin SM, Kryuchko DS, Berzin IA, Evtushenko AE, Truhin VP, Skvortsova VI	
ОБЗОР	13
Патология верхушки пирамиды височной кости Х. М. А. Диаб, Н. А. Дайхес, О. А. Пашнина, А. М. Шамхалова, О. С. Панина Pathologies of petrous apex Diab KhMA, Daikhes NA, Pashnina OA, Shamkhalova AM, Panina OS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	19
Исследование зрительного гнозиса с помощью анализа ЭЭГ-микросостояний С. А. Гуляев Studying visual gnosis through EEG microstate analysis Gulyaev SA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	27
Разработка микробиологического препарата для биоремедиации почв, загрязненных компонентами ракетных топлив Г. А. Жариков, О. А. Крайнова, М. Р. Хаитов, А. И. Марченко Development of microbial preparation for bioremediation of soils contaminated with rocket fuel components Zharikov GA, Krainova OA, Khaitov MR, Marchenko AI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	39
Актуальные проблемы экспертизы профессиональной нейросенсорной тугоухости у пилотов гражданской авиации И. В. Бухтияров, В. Б. Панкова, И. Н. Федина, Н. А. Дайхес, Н. Г. Бомштейн Current issues of the occupational sensorineural hearing loss evaluation in airline pilots Bukhtiyarov IV, Pankova VB, Fedina IN, Daikhes NA, Bomshtein NG	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	44
Транскрипционная активность генов ДНК-метилтрансфераз у жителей уральского региона, подвергшихся хроническому радиационному воздействию В. С. Никифоров, Е. А. Блинова, А. В. Аклеев Transcriptional activity of DNA-methyltransferase genes in the chronically exposed residents of the ural region Nikiforov VS, Blinova EA, Akleyev AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	50
Состояние факторов врожденного иммунитета у облученных лиц, впоследствии заболевших раком Е. А. Блинова, А. И. Котикова, А. А. Аклеев, А. В. Аклеев Status of factors of innate immunity in exposed people who subsequently developed cancer Blinova EA, Kotikova AI, Akleyev AA, Akleyev AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	57
Оценка применения гибких навыков заведующими отделениями А. В. Кочубей, С. Ю. Яроцкий, В. В. Кочубей, О. А. Евдошенко Evaluation of the use of soft skills by department heads Kochubey AV, Yarotsky SYu1, Kochubey VV, Evdoshenko OA	

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

63

Пневмолабиринт как осложнение после стapedопластики

Х. М. А. Диаб, Н. А. Дайхес, О. А. Пашчинина, А. Г. Эухба, С. В. Коханюк, Н. Е. Пирогова

Pneumolabyrinth as a postoperative complication of stapedoplasty

Diab KhMA, Daikhes NA, Pashchinina OA, Zukhba AG, Kokhanyuk SV, Pirogova NE

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

70

Случай выделения *Streptococcus massiliensis* из крови у пациента с менингоэнцефалитом

О. В. Лянг А. В. Пахилова-Попова, А. Р. Кабаева, О. В. Бойко, Н. А. Шамалов

Case of *Streptococcus massiliensis* isolation from blood of patient with meningoencephalitis

Lyang OV, Pakhilova-Popova AV, Kabaeva AR, Boyko OV, Shamalov NA

МНЕНИЕ

74

Звено патогенеза ночной внезапной смерти при сердечной недостаточности

Л. М. Макаров

The component of pathogenesis of sudden nocturnal death in patients with heart failure

Makarov LM

ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ N-БЕЛКА SARS-COV-2 ФОРМИРУЕТ ВЫРАЖЕННЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ НА N-БЕЛОК НОВЫХ ШТАММОВ

С. О. Рабдано¹✉, В. Е. Мухин², В. В. Макаров², Г. О. Рудаков¹, Э. А. Рузанова¹, С. А. Аракелов¹, М. Р. Хайтов^{3,4}, С. М. Юдин², Д. С. Крючко⁵, И. А. Берзин⁵, А. Э. Евтушенко¹, В. П. Трухин¹, В. И. Скворцова⁵

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁵ Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, Россия

Вакцины второго поколения против COVID-19 должны создавать долговременный протективный иммунный ответ по отношению к существующим, а также новым штаммам SARS-CoV-2. Дизайн вакцины Конвасэл® направлен на формирование такого иммунного ответа путем использования N-белка в качестве антигена. Белок N не подвержен быстрому накоплению мутаций и имеет высокую гомологию с нуклеокапсидными белками других β-коронавирусов. Целью работы было провести *in vitro* исследование возможности Конвасэл® создавать иммунный ответ против штаммов Ухань, Дельта и Омикрон. Мононуклеарные клетки вакцинированных или переболевших добровольцев стимулировали N-белком, а затем методом проточной цитометрии анализировали их специфическую активацию. Результаты показали, что существенный процент CD4⁺ и CD8⁺-клеток продуцирует IFNγ и IL2 в ответ на стимуляцию. Статистически значимого снижения ответа для штаммов Дельта и Омикрон по сравнению с штаммом Ухань не выявлено. Полученные результаты поддерживают направление в дизайне вакцин на основе N-белка для создания универсальной вакцины.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, вакцина, иммунитет, новые штаммы, N-белок, нуклеокапсид, Дельта, Омикрон, Ухань, коронавирус

Вклад авторов: С. О. Рабдано — дизайн исследования, анализ данных, интерпретация данных, написание рукописи; В. Е. Мухин — биоинформатический анализ, проведение эксперимента, сбор данных, статистический анализ, написание рукописи; В. В. Макаров — дизайн исследования, интерпретация данных, написание рукописи; Г. О. Рудаков — анализ данных, статистический анализ, интерпретация данных, подготовка графики, написание рукописи; Э. А. Рузанова, С. А. Аракелов, М. Р. Хайтов, С. М. Юдин, Д. С. Крючко, И. А. Берзин, А. Э. Евтушенко — дизайн исследования, редактирование рукописи; В. П. Трухин, В. И. Скворцова — идея работы, концепция исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено Министерством здравоохранения РФ (разрешение на проведение клинического исследования № 388 от 19 июля 2021 г.), этическим комитетом МЗ РФ (протокол № 282 от 19 июля 2021 г.) и Независимым этическим комитетом (НЭК) исследовательского центра (протоколы № 163 от 15 июля 2021 г. и № 164 от 20 июля 2021 г.); проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) (1964 г.) и ее последней редакции (2013 г.), трехстороннего соглашения по Надлежащей клинической практике, принятого Международным советом по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для медицинского применения у людей (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) (E6(R2) от 09 ноября 2016 г.), и регламентировано действующим законодательством ЕАЭС и РФ. Форма информированного согласия (информационный листок добровольца) подлежала заполнению в двух экземплярах, подписана и датирована субъектами и исследователем собственноручно.

✉ **Для корреспонденции:** Севастьян Олегович Рабдано
ул. Свободы, д. 52, 198320, г. Красное село, г. Санкт-Петербург; sevastyan@rabdano.ru

Статья получена: 12.09.2022 **Статья принята к печати:** 26.09.2022 **Опубликована онлайн:** 30.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.033

N PROTEIN BASED VACCINE AGAINST SARS-COV-2 PRODUCES A STRONG T CELL IMMUNE RESPONSE TO N PROTEIN OF NOVEL STRAINS

Rabdano SO¹✉, Mukhin VE², Makarov VV², Rudakov GO¹, Ruzanova EA¹, Arakelov SA¹, Khaitov MR^{3,4}, Yudin SM², Kryuchko DS⁵, Berzin IA⁵, Evtushenko AE¹, Truhin VP¹, Skvortsova VI⁵

¹ Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

² Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Institute of Immunology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁵ Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The second generation COVID-19 vaccines should produce the long-term protective immune response to the existing and novel strains of SARS-CoV-2. The Convacell® vaccine was designed to produce such immune response by using N protein as an antigen. N-protein is not susceptible to fast accumulation of mutations and is highly homologous to nucleocapsid proteins of other β-coronaviruses. The study was aimed to perform *in vitro* assessment of the Convacell® vaccine ability to produce immune response to the Wuhan, Delta, and Omicron strains. Mononuclear cells of vaccinated volunteers and survivors were subjected to N protein stimulation. After that specific activation of the cells was assessed by flow cytometry. The results showed that a substantial percentage of CD4 and CD8 cells produced IFNγ and IL2 in response to stimulation. No significant reduction of the response to strains Delta and Omicron compared to the Wuhan strain was revealed. The findings support the direction of the N protein based vaccine design towards creation of the universal vaccine.

Keywords: SARS-CoV-2, vaccine, immunity, novel strains, N protein, nucleocapsid, Delta, Omicron, Wuhan, coronavirus

Author contribution: Rabdano SO — study design, data analysis, data interpretation, manuscript writing; Mukhin VE — bioinformatic analysis, experimental procedure, data acquisition, statistical analysis, manuscript writing; Makarov VV — study design, data interpretation, manuscript writing; Rudakov GO — data analysis, statistical analysis, data interpretation, graphics preparation, manuscript writing; Ruzanova EA, Arakelov SA, Khaitov MR, Yudin SM, Kryuchko DS, Berzin IA, Evtushenko AE — study design, manuscript editing; Truhin VP, Skvortsova VI — research idea, study concept, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (clinical trial approval № 388 of 19 July 2021), Ethics Committee of MH RF (protocol № 282 of 19 July 2021) and Independent Ethics Committee (IEC) of the research center (protocols № 163 of 15 July 2021 and № 164 of 20 July 2021); the study was conducted in accordance with the principles of the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki (1964) and its latest update (2013), tripartite guideline for Good Clinical Practice approved by the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (E6 (R2) of 09 November 2016) and current legislation of the EEU and RF. Two copies of the informed consent form (volunteer information sheet) were to be signed and dated by the subjects and the researcher by their own handwriting.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sevastyan O. Rabdano
Svobody, 52, 198320, Krasnoye Selo, Saint Petersburg; sevastyan@rabdano.ru

Received: 12.09.2022 **Accepted:** 26.09.2022 **Published online:** 30.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.033

Пандемия COVID-19 является глобальной проблемой с 2020 г. Ее основные особенности — высокая заразность вируса SARS-CoV-2, высокие морбидность и смертность [1, 2], а также быстрая эволюция вируса [3]. На сентябрь 2022 г. официально зарегистрировано более 600,5 млн случаев заболевания COVID-19 и более 6,5 млн смертей [4]. Положение усугубляет то, что даже нелетальные случаи заболевания могут вызвать долговременные последствия для здоровья, особенно в сердечно-сосудистой системе [5–7]. Создание универсальной вакцины против COVID-19, способной вызывать долговременный иммунитет против распространенных штаммов вируса, становится неотложной задачей для мировой фармацевтики.

Разработку такой вакцины осложняет высокая антигенная вариативность вируса [8], в том числе его S-белка [9]. На сегодняшний день все клинически сертифицированные и широко распространенные вакцины основаны на использовании S-белка [10]. Высокая специфичность антител и T-клеточных рецепторов, обуславливающих гуморальный и клеточный иммунные ответы, вследствие быстрой эволюции вируса приводит к снижению эффективности как нейтрализации вируса, так и элиминации инфицированных клеток. В литературе представлены данные о снижении уровня нейтрализации вирусом новых штаммов сыворотками вакцинированных S-белком [11,12]. Стоит также отметить большое число публикаций, описывающих снижение эффективности распознавания T-клеточных эпитопов, а соответственно и активации T-клеток эпитопами белков из новых штаммов вируса [11,13–16]. Хотя имеются и противоречащие этому данные о сохранении T-клеточного иммунного ответа на пептиды, содержащие характерные для новых вариантов вируса мутации [17].

Вследствие эволюции вируса эффективность существующих вакцин против COVID-19 снижается со временем [18]. Гораздо лучшей, чем S-белок, целью для формирования долговременного иммунитета против вируса является его консервативный нуклеокапсидный N-белок [19–21], который не подвержен мутациям, как S-белок. Успешность подхода к созданию вакцин на основе нуклеокапсидных белков, упаковывающих генетический материал вируса, была продемонстрирована для вируса гриппа [22–26], вируса Денге [27–29] и коронавируса [20,30]. T-лимфоциты и нацеленные с помощью антител натуральные киллеры способны быстро уничтожать инфицированные клетки. Именно механизмы, опосредованные T-клетками и натуральными киллерами, обеспечивают полную элиминацию вируса из организма. Кроме того, консервативность N-белка влечет за собой его высокую схожесть для разных штаммов, что обуславливает способность вакцины на основе N-белка защищать против широкого спектра вариантов SARS-CoV-2.

В ФГУП СПбНИИВС ФМБА России была разработана вакцина Конвасэл® против SARS-CoV-2 на основе N-белка. Аминокислотная последовательность антигена в вакцине соответствует N-белку штамма Ухань. Вакцина проходит клинические исследования объединенных I и II фаз. Благодаря такому выбору цели вакцина Конвасэл® должна вызывать долговременный иммунитет против всех вариантов SARS-CoV-2. Это выгодно отличает ее от существующих вакцин на основе S-белка. Целью данной работы было продемонстрировать возможность Конвасэл® вызывать специфичный иммунный ответ против спектра существующих штаммов SARS-CoV-2.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Лабораторное исследование проводили в отделе анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ ЦСП ФМБА России. В исследование включили 12 субъектов. Переболевшие: шесть пациентов с диагнозом COVID-19, подтвержденным лабораторными исследованиями, переболевшие в январе 2022 г. в легкой форме (три мужчины, три женщины в возрасте 18–51 год). Вакцинированные: добровольцы, прошедшие полную вакцинацию Конвасэл® (две дозы с интервалом 21 день), другие данные вакцинированных субъектов заклеены до окончания клинического исследования. Критерии включения/исключения пациентов и другие детали исследования представлены в базе данных ClinicalTrials.gov (NCT05156723).

Кровь у переболевших отбирали в день выздоровления. Кровь у вакцинированных — на 42-е сутки после введения первой дозы вакцины. Отбор образцов периферической крови для анализа производили утром натощак (не менее 8 ч после последнего приема пищи) из кубитальной вены пункционным методом в стерильные вакуумные пробирки, содержащие K3-ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Мононуклеарные клетки (МПК) получали из образцов периферической крови. Объем образцов периферической крови составлял не менее 6 мл. Все процедуры выполняли не позднее чем через 8 ч после взятия биоматериала. Хранение и транспортировку образцов осуществляли при комнатной температуре (18–25 °C) с сохранением холодной цепи.

Выделение МПК периферической крови осуществляли методом центрифугирования на градиенте плотности фиколла 1,077 г/л. Для этого цельную кровь несколько раз аккуратно перемешивали путем переворачивания пробирки на 180° 5–6 раз, разводили в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS) в соотношении 1 : 1, после чего наслаивали на фиколл плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали 30 мин при нагрузке 450 g с отключенным торможением ротора при комнатной температуре. По окончании центрифугирования с помощью серологической пипетки собирали интерфазное кольцо, расположенное на границе сред фиколла и плазмы крови, и переносили его в чистую коническую пробирку объемом 15 мл. Затем клетки дважды отмывали в DPBS путем центрифугирования при 300 g в течение 10 мин (Eppendorf; Германия). После второго отмывания осуществляли подсчет клеток и оценку жизнеспособности путем окрашивания трипановым синим с помощью автоматического счетчика клеток Countess 3 (Thermo; США), далее клетки разводили в полной среде RPMI 1640 (10% фетальной телячьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина) в концентрации до 10⁶ кл./мл. Жизнеспособность клеток составляла не менее 95%.

Определение количества и фенотипа антиген-специфичных клеток осуществляли с помощью многоцветной проточной цитометрии по их способности продуцировать цитокины в ответ на стимуляцию пептидами, охватывающими области N-белков различных вариантов вируса SARS-CoV-2. Для этого в цитометрические пробирки вносили 10⁶ МНК в 100 мкл культуральной среды, добавляли 1 мкг/мл антигена (белок или пуллированные пептиды) и инкубировали в течение 12 ч при 37 °C и 5% CO₂. Спустя 2 ч после внесения антигена к клеткам добавляли 10 мкг/мл брефелдина А (Sigma-Aldrich; США). По завершении инкубации клетки отмывали в

REF	MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHG	60
B.1.617.2	60
BA.2L.....	57
BA.4L.....	57
BA.5L.....	57
REF	KEDLKFPRGQVPIINTNSSPDDQIGYRRATRIRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAG	120
B.1.617.2	..G.....	120
BA.2	117
BA.4	117
BA.5	117
REF	LPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGRSGGS	180
B.1.617.2	180
BA.2	177
BA.4S.....	177
BA.5	177
REF	QASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTSPTARMAGNGGDAALALLLDRLNQLSKMSGKQOQ	240
B.1.617.2M.....C.....	240
BA.2KR.....	237
BA.4KR.....	237
BA.5KR.....	237
REF	QQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH	300
B.1.617.2	300
BA.2	297
BA.4	297
BA.5	297
REF	WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAY	360
B.1.617.2	360
BA.2	357
BA.4	357
BA.5	357
REF	KTFPPTPEPKDKKKKADETPALPQRQKQQTVTLPAADLDDFSKQLQSSMSADSTQA	419
B.1.617.2Y.....	419
BA.2R.....	416
BA.4R.....	416
BA.5R.....	416

Рис. 1. Выравнивание последовательностей N-белков SARS-CoV-2 с мутациями, характерными для штаммов Дельта (B.1.617.2) и Омикрон (BA.2/4/5) относительно референсной последовательности NC_045512 (REF). Выравнивание выполнено в инструменте MUSCLE (<https://github.com/rcedgar/muscle>). Совпадающие аминокислоты отмечены точками, отличия указаны соответствующими однобуквенными кодами аминокислот, делеции отмечены знаком дефис

фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS), после чего осуществляли поверхностное окрашивание с помощью конъюгатов антител anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (13B8.2), anti-CD8 (B9.11), anti-CD45RA (2H4), anti-CD197 (G043H7) (все антитела производства компании Beckman Coulter; США). Для оценки жизнеспособности клеток использовали Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend; США). Затем клетки отмывали в DPBS, фиксировали и пермеабелизировали клеточные мембраны с помощью набора реагентов IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter; США) и осуществляли внутриклеточное окрашивание с помощью конъюгатов антител anti-IL2 (IL2.39.1) и anti-IFN γ (45.15) (Beckman Coulter; США).

Анализ осуществляли на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter; США). Для каждого образца регистрировали не менее 100 тысяч T-клеток. Анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения CytExpert Acquisition and Analysis Software, версия 2.4 (Beckman Coulter; США). Графики подготовлены в программном обеспечении GraphPad Prism 9. Для статистического анализа во всех случаях применяли дисперсионный анализ ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитометрия МПК, стимулированных N-белком штаммов Ухань, Дельта, Омикрон

Моделирование встречи иммунных клеток вакцинированных и переболевших пациентов со штаммами Ухань, Дельта и Омикрон вируса SARS-CoV-2 было проведено с помощью инкубации клеток при добавлении репрезентативных антигенов каждого штамма. Клетки были инкубированы с антигеном SARS-CoV-2 в трех вариантах: а) полноразмерный N-белок с последовательностью, соответствующей референсному штамму (Ухань); б) пептидный пул N-белка штамма Дельта; в) пептидный пул N-белка штамма Омикрон.

Для создания пептидных пулов для штаммов Дельта и Омикрон был проведен следующий анализ.

1. На портале Coronavirus 3D [31] в разделе Lineages/Mutations отобраны мутации в нуклеокапсидном белке вируса интересующих клад.

2. На портале GISAID [32] загружена референсная нуклеотидная последовательность N-белка (штамм Ухань)

Пептидный пул Омикрон (BA.2/4/5):

- 1 NGGARSKQRRPQGLP
- 2 GSNQNGGARSKQRRP
- 3 SDSTGSNQNNGGARSK
- 4 KEDLKFPRGQGVPIIN
- 5 TQHGKEDLKFPRGQG
- 6 FTALTQHGKEDLKF
- 7 SKRTSPARMAGNGGD
- 8 TPGSSKRTSPARMAG
- 9 SRNSTPGSSKRTSPA
- 10 KKADETQALPQRQKK
- 11 KDKKKKADDETQALPQ
- 12 TEPKDKKKKADDETQ

Пептидный пул Дельта (B.1.617.2):

- 1 NGERSGARSKQRRPQ
- 2 GSNQNGERSGARSKQ
- 3 SDSTGSNQNNGERSGA
- 4 KEGLKFPRGQGVPIIN
- 5 TQHGKEGLKFPRGQG
- 6 FTALTQHGKEGLKF
- 7 SMGTSPARMAGNGCD
- 8 TPGSSMGTSPARMAG
- 9 SRNSTPGSSMGTSPA
- 10 KKAYETQALPQRQKK
- 11 KDKKKKAYETQALPQ
- 12 TEPKDKKKKAYETQ

Рис. 2. Выбранные пептидные пулы для штаммов Омикрон и Дельта. Различия между штаммами выделены желтым

и полногеномная референсная последовательность для штамма Дельта B.1.617.2 (EPI_ISL_1663516). На текущий момент для штаммов Омикрон BA.2, BA.4, BA.5 на GISAID отсутствуют референсные полногеномные последовательности.

3. С помощью инструмента VIGOR4 [33] нуклеотидные последовательности N-белка транслированы в аминокислотные.

4. С помощью UGENE [34] внесены мутации, отобранные в п. 1, в референсную последовательность N-белка. Четыре полученных FASTA файла объединены в мульти-FASTA файл.

5. Множественное выравнивание проведено с помощью инструмента MUSCLE [35].

Через выравнивание последовательностей N-белков, характерных для разных штаммов SARS-CoV-2 (рис. 1), было установлено, что различия между нуклеокапсидными белками штаммов Дельта и Омикрон могут быть сведены к следующим мутациям, по сравнению с N-белком референсного штамма Ухань. Омикрон: P13L, 31-33del, P151S, R203K, G204R, S413R; Дельта: D63G, R203M, G215C, D377Y.

На основании этого анализа были выбраны пептидные пулы для представления каждого штамма (рис. 2), с пятью мутациями и тремя пептидами для каждой с перекрытием в 11 аминокислот. Несмотря на наличие

литературных данных по иммунодоминантным эпитопам у вакцинированных и переболевших COVID-19 [36] в данной работе был сделан выбор в пользу эпитопов, содержащих мутации, поскольку они наиболее репрезентативны в плане изменений иммунного ответа в связи с эволюцией вируса.

Для анализа и сравнения клеточного иммунитета, вызываемого вакциной Конвасэл® и инфекцией SARS-CoV-2, кровь была отобрана у участников клинических исследований вакцины Конвасэл® и у добровольцев, перенесших COVID-19. Затем МПК были выделены и заморожены до момента проведения анализа. После разморозки клетки были разделены на аликвоты и специфично стимулированы антигенами из штаммов Ухань, Дельта и Омикрон. Кроме того, были введены соответствующие отрицательная (питательная среда) и положительная (ацетат форбола миристата и иономицин) контрольные пробы. Подробнее протокол стимуляции описан в разделе «Пациенты и методы».

После стимуляции была произведена окраска МПК флюоресцентными антителами к маркерам, соответствующим основным фенотипам Т-клеток — CD4, CD8, а также маркерам их активации — IFN γ , IL2. Затем был проведен цитометрический анализ окрашенных МПК.

Результаты анализа (рис. 3) показали, что для вакцинированных, в целом, стимуляция N-белком вызывает

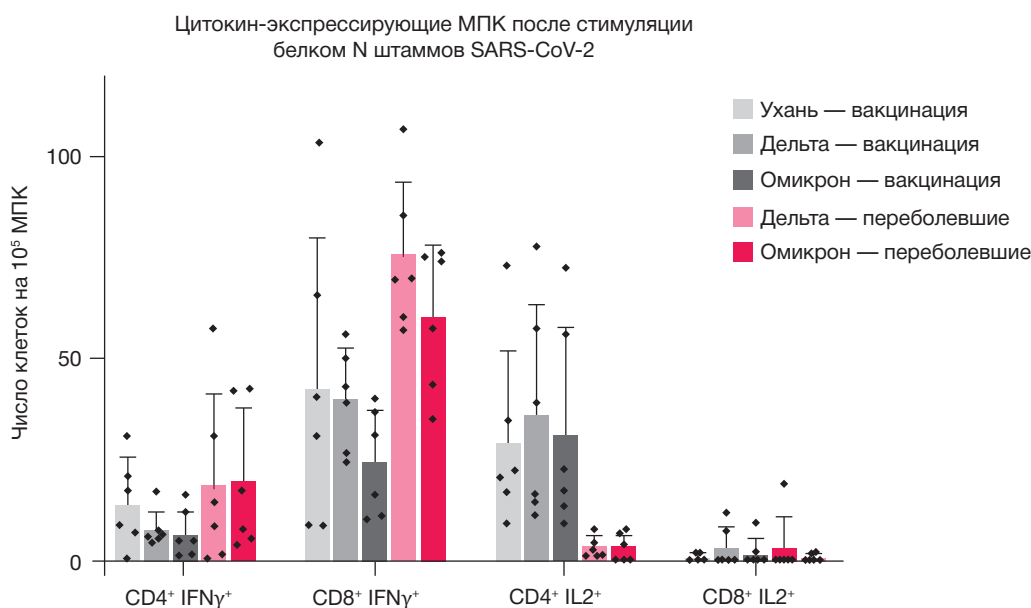


Рис. 3. Квантификация цитокин-экспрессирующих МПК для вакцинированных Конвасэл® и перенесших COVID-19 после стимуляции вирусным N-белком либо пептидными пулами на его основе

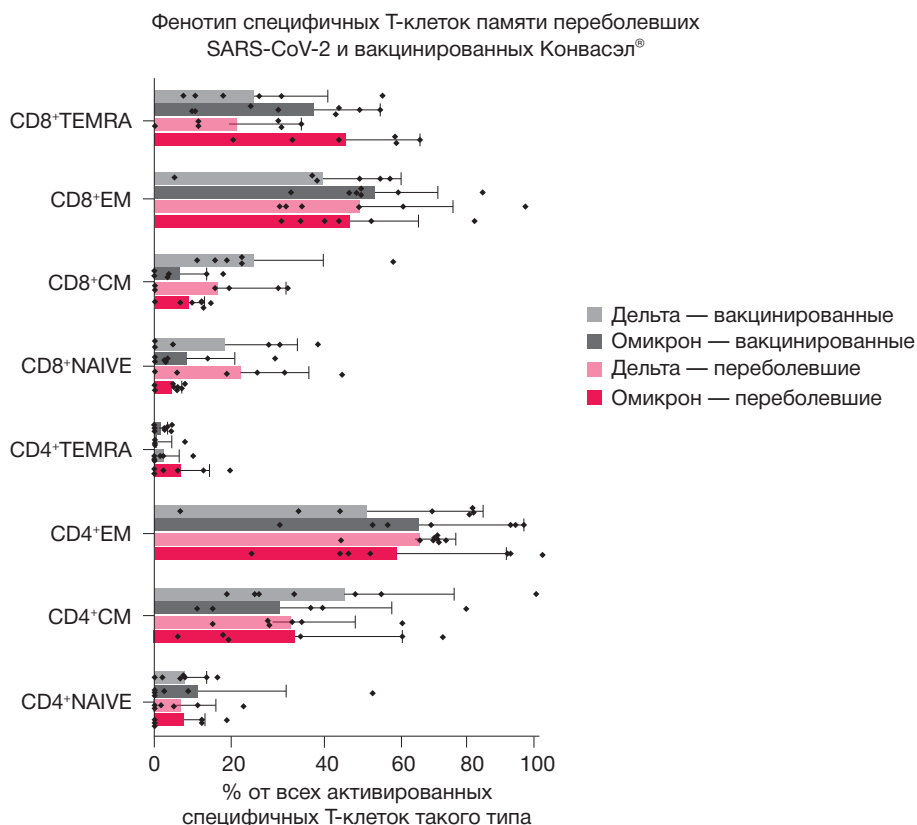


Рис. 4. Фенотипирование специфических Т-клеток памяти для вакцинированных Конвасэл® и перенесших COVID-19 после стимуляции N-белком

схожий иммунный ответ всех исследованных субпопуляций Т-хелперов и Т-киллеров для всех штаммов SARS-CoV-2.

Для субпопуляции МПК $CD4^+INF\gamma^+$ вакцинация Конвасэл® вызывает ответ, схожий с ответом после самого заболевания, при этом статистически значимые различия в количестве активированных клеток для N-белка разных штаммов отсутствуют как у вакцинированных, так и у переболевших.

Для субпопуляции МПК $CD8^+INF\gamma^+$ наблюдается немного более сильный ответ у перенесших заболевание, чем у вакцинированных, и более сильный ответ при стимуляции N-белком штаммов Ухань и Дельта, чем при стимуляции N-белком штамма Омикрон. Тем не менее статистически значимые различия между субпопуляциями отсутствуют, и во всех случаях стимуляция N-белком вызывает сильный ответ.

Для клеток $CD4^+IL2^+$ сильный ответ получен у вакцинированных и значимо более слабый — у переболевших. Разница при стимуляции N-белком разных штаммов отсутствует.

Наконец, для клеток $CD8^+IL2^+$ выявлен одинаково слабый ответ у всех субпопуляций, вне зависимости от источника иммунитета и штамма протеина для стимуляции.

Фенотипирование клеток памяти

Дополнительный анализ фенотипа специфических клеток памяти (рис. 4), активирующихся у вакцинированных Конвасэл® и перенесших COVID-19 после обработки N-белком разных штаммов вируса, показал отсутствие значимых различий между структурой иммунного ответа во всех субпопуляциях.

Для Т-хэлперов характерно доминирование эффекторных клеток памяти (EM) на уровне примерно 60% от всех активированных клеток и превалирование центральных клеток памяти (CM) на уровне примерно 30% от общего

числа клеток. Наивные (naive) Т-клетки представлены на уровне около 10%, а клетки памяти с увеличенным количеством эффекторов (TEMRA) представлены слабо. Каких-либо статистически значимых различий между переболевшими и вакцинированными, а также между штаммами SARS-CoV-2 нет.

Для цитотоксических Т-клеток характерно наличие 40–50% эффекторных клеток памяти и 20–40% TEMRA-клеток. Наивные Т-клетки и центральные клетки памяти представлены на уровне 10–20%. При стимуляции N-белком штамма Омикрон наблюдается более высокая пропорция TEMRA-клеток и более низкие пропорции наивных Т-клеток и клеток центральной памяти, по сравнению со стимуляцией белком штамма Дельта, но эти различия не являются статистически значимыми. Различий между вакцинированными и переболевшими не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее были опубликованы данные с долей $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеток, отвечающих экспрессией $IFN\gamma$ на стимуляцию антигенами [17, 37]. У вакцинированных мРНК-вакцинами с S-белком обнаружен более сильный ответ к гомологичному штамму, чем для переболевших COVID-19 [17]. Более сильный Т-клеточный ответ, в частности $CD4^+IL2^+$ -клеток (см. сравнение столбцов серых и красных оттенков на рис. 3), наблюдается для вакцинированных Конвасэл® по сравнению с переболевшими, однако в отличие от S-белковых вакцин этот эффект распространяется и на не гомологичные штаммы. В образцах крови переболевших около 40 из 10^5 $CD4^+$ -клеток и 50 из 10^5 $CD8^+$ -клеток секретируют $IFN\gamma$ при стимуляции пептидами из N-белка [17]. Количество отвечающих на стимуляцию клеток у переболевших, по нашим данным, немного меньше количества, приведенного в работе [17]. Стоит отметить что количество отвечающих на

стимуляцию Т-лимфоцитов пептидами из S-белка стремительно снижается как у переболевших, так и у вакцинированных мРНК-вакцинами [37, 38]. Число клеток снижается в 2 раза в среднем за 1–1,5 месяца.

Результаты свидетельствуют о том, что вакцина Конвасэл® способна вызывать такой же или более сильный иммунный ответ на SARS-CoV-2 по сравнению с перенесенным заболеванием: число активированных цитотоксичных Т-клеток и Т-хэлперов статистически не различается для вакцинированных и переболевших субъектов, а количество продуцирующих IL2 Т-хэлперов для вакцинированной группы значительно выше. Полученные данные подтверждают способность Конвасэл® создавать высоконапряженный клеточный иммунный ответ на N-белок SARS-CoV-2.

Отсутствуют также какие-либо значимые различия в числе активированных клеток для всех вакцинированных субпопуляций при стимуляции N-белком любого из использованных штаммов вируса, что свидетельствует о способности Конвасэл® формировать одинаково сильный иммунитет против новых штаммов.

Фенотипирование CD4⁺-клеток памяти у вакцинированных и переболевших проводили ранее [37]. Доминирование клеток CD4⁺-CM и CD4⁺-EM (40–50% от всех отвечающих

клеток), полученное в нашей работе, хорошо согласуется с данными этих авторов.

Отсутствие различий в структуре иммунного ответа у вакцинированных при стимуляции белками разных штаммов SARS-CoV-2 подтверждает способность Конвасэл® формировать высоконапряженный клеточный иммунитет против всех штаммов вируса, а схожесть структуры иммунного ответа при вакцинации и после перенесенного заболевания свидетельствует в пользу эффективности иммунного ответа, формируемого вакциной.

Выводы

Вакцина Конвасэл® показала способность формировать одинаково сильный клеточный иммунный ответ против штаммов Ухань, Дельта и Омикрон SARS-CoV-2. Это подчеркивает перспективность подхода к созданию универсальной вакцины от COVID-19 на основе белка N. Данное исследование демонстрирует способность Конвасэл® создавать высоконапряженный клеточный иммунитет против актуальных циркулирующих штаммов SARS-CoV-2. В свете быстрой эволюции вируса наличие универсальной вакцины позволит обеспечить защиту населения от новых волн COVID-19.

Литература

- Park M, Cook AR, Lim JT, Sun Y, Dickens BL. A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *JCM*. 2020; 9 (4): 967.
- Tsang HF, Chan LWC, Cho WCS, Yu ACS, Yim AKY, Chan AKC, et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2021; 19 (7): 877–88.
- van Oosterhout C, Hall N, Ly H, Tyler KM. COVID-19 evolution during the pandemic – Implications of new SARS-CoV-2 variants on disease control and public health policies. *Virulence*. 2021; 12 (1): 507–8.
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://covid19.who.int/>
- Siripanthong B, Asatryan B, Hanff TC, Chatha SR, Khanji MY, Ricci F, et al. The Pathogenesis and Long-Term Consequences of COVID-19 Cardiac Injury. *JACC: Basic to Translational Science*. 2022; 7 (3): 294–308.
- Martínez-Salazar B, Holwerda M, Stüdle C, Piragyte I, Mercader N, Engelhardt B, et al. COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 824851.
- Liao T, Meng D, Xiong L, Wu S, Yang L, Wang S, et al. Long-Term Effects of COVID-19 on Health Care Workers 1-Year Post-Discharge in Wuhan. *Infect Dis Ther*. 2022; 11 (1): 145–63.
- Yewdell JW. Antigenic drift: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2021; 54 (12): 2681–7.
- Mittal A, Khattri A, Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. Stapleford K, editor. *PLoS Pathog*. 2022; 18 (2): e1010260.
- Heinz FX, Stiasny K. Profiles of current COVID-19 vaccines. *Wien Klin Wochenschr*. 2021; 133(7–8): 271–83.
- García-Valtánen P, Hope CM, Masavuli MG, Yeow AEL, Balachandran H, Mekonnen ZA, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant escapes neutralizing antibodies and T cell responses more efficiently than other variants in mild COVID-19 convalescents. *Cell Reports Medicine*. 2022; 3 (6): 100651.
- Focosi D, Maggi F, Franchini M, McConnell S, Casadevall A. Analysis of Immune Escape Variants from Antibody-Based Therapeutics against COVID-19: A Systematic Review. *IJMS*. 2021; 23 (1): 29.
- Agerer B, Koblischke M, Gudipati V, Montaño-Gutiérrez LF, Smyth M, Popa A, et al. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8 + T cell responses. *Sci Immunol*. 2021; 6 (57): eabg6461.
- de Silva TI, Liu G, Lindsey BB, Dong D, Moore SC, et al. The impact of viral mutations on recognition by SARS-CoV-2 specific T cells. *Science*. 2021; 24 (11): 103353.
- Dolton G, Rius C, Hasan MS, Wall A, Szomolay B, Behiry E, et al. Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope. *Cell*. 2022; 185 (16): 2936–51.e19.
- Zhang H, Deng S, Ren L, Zheng P, Hu X, Jin T, et al. Profiling CD8+ T cell epitopes of COVID-19 convalescents reveals reduced cellular immune responses to SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports*. 2021; 36 (11): 109708.
- Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports Medicine*. 2021; 2 (7): 100355.
- Jamshidi E, Asgary A, Shafiekhani P, Khajeamiri Y, Mohamed K, Esmaily H, et al. Longevity of immunity following COVID-19 vaccination: a comprehensive review of the currently approved vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022; 18 (5): 2037384.
- Dutta NK, Mazumdar K, Gordy JT. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. Dutch RE, editor. *J Virol*. 2020; 94 (13): e00647-20, /jvi/94/13/JVI.00647-20.atom.
- Thura M, Sng JXE, Ang KH, Li J, Gupta A, Hong JM, et al. Targeting intra-viral conserved nucleocapsid (N) proteins as novel vaccines against SARS-CoVs. *Bioscience Reports*. 2021; 41 (9): BSR20211491.
- Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181 (7): 1489–501.e15.
- Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. A Novel Role for Non-Neutralizing Antibodies against Nucleoprotein in Facilitating Resistance to Influenza Virus. *J Immunol*. 2008; 181 (6): 4168–76.
- Huang B, Wang W, Li R, Wang X, Jiang T, Qi X, et al. Influenza A

- virus nucleoprotein derived from *Escherichia coli* or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virology*. 2012; 9 (1): 322.
24. LaMere MW, Moquin A, Lee FEH, Misra RS, Blair PJ, Haynes L, et al. Regulation of Antinucleoprotein IgG by Systemic Vaccination and Its Effect on Influenza Virus Clearance. *J Virol*. 2011; 85 (10): 5027–35.
 25. Vandervyn HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, et al. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. *EBioMedicine*. 2016; 8: 277–90.
 26. Wraith DC, Vessey AE, Askonas BA. Purified Influenza Virus Nucleoprotein Protects Mice from Lethal Infection. *Journal of General Virology*. 1987; 68 (2): 433–40.
 27. Gil L, Lopez C, Lazo L, Valdes I, Marcos E, Alonso R, et al. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice. *International Immunology*. 2009; 21 (10): 1175–83.
 28. Lazo L, Valdes I, Guillén G, Hermida L, Gil L. Aiming at the heart: the capsid protein of dengue virus as a vaccine candidate. *Expert Review of Vaccines*. 2019; 18 (2): 161–73.
 29. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, et al. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine*. 2007; 25 (6): 1064–70.
 30. Brentville V, Vankemmelbeke M, Metheringham R, Symonds P, Cook K, Urbanowicz R, et al. A novel bivalent DNA vaccine encoding both spike protein receptor-binding domain and nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 to elicit T cell and neutralising antibody responses that cross react with variants [Internet]. *Immunology*. 2021 Jun [cited 2021 Jul 6]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.18.448932>
 31. Coronavirus3D [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://coronavirus3d.org/>
 32. Re3data.Org. GISAID [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.re3data.org/repository/r3d100010126>
 33. Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) - Flaviviridae — VIGOR4 Genome Annotation [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.viprbrc.org/brc/vigorAnnotator.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=flavi>
 34. UGENE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://ugene.net/>
 35. MUSCLE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.drive5.com/muscle>
 36. Titov A, Shaykhutdinova R, Shcherbakova OV, Serdyuk YV, Sheetikov SA, Zornikova KV, et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*. 2022; 7 (9): e157699.
 37. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*. 2021; 374 (6572): abm0829.
 38. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, O'Connell S, McDermott AB, Flach B, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384 (23): 2259–61.

References

1. Park M, Cook AR, Lim JT, Sun Y, Dickens BL. A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *JCM*. 2020; 9 (4): 967.
2. Tsang HF, Chan LWC, Cho WCS, Yu ACS, Yim AKY, Chan AKC, et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2021; 19 (7): 877–88.
3. van Oosterhout C, Hall N, Ly H, Tyler KM. COVID-19 evolution during the pandemic – Implications of new SARS-CoV-2 variants on disease control and public health policies. *Virulence*. 2021; 12 (1): 507–8.
4. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. Siripanthong B, Asatryan B, Hanff TC, Chatha SR, Khanji MY, Ricci F, et al. The Pathogenesis and Long-Term Consequences of COVID-19 Cardiac Injury. *JACC: Basic to Translational Science*. 2022; 7 (3): 294–308.
6. Martínez-Salazar B, Holwerda M, Stüdle C, Piragyte I, Mercader N, Engelhardt B, et al. COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 824851.
7. Liao T, Meng D, Xiong L, Wu S, Yang L, Wang S, et al. Long-Term Effects of COVID-19 on Health Care Workers 1-Year Post-Discharge in Wuhan. *Infect Dis Ther*. 2022; 11 (1): 145–63.
8. Yewdell JW. Antigenic drift: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2021; 54 (12): 2681–7.
9. Mittal A, Khattri A, Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. Stapleford K, editor. *PLoS Pathog*. 2022; 18 (2): e1010260.
10. Heinz FX, Stiasny K. Profiles of current COVID-19 vaccines. *Wien Klin Wochenschr*. 2021; 133(7–8): 271–83.
11. Garcia-Valtanen P, Hope CM, Masavuli MG, Yeow AEL, Balachandran H, Mekonnen ZA, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant escapes neutralizing antibodies and T cell responses more efficiently than other variants in mild COVID-19 convalescents. *Cell Reports Medicine*. 2022; 3 (6): 100651.
12. Focosi D, Maggi F, Franchini M, McConnell S, Casadevall A. Analysis of Immune Escape Variants from Antibody-Based Therapeutics against COVID-19: A Systematic Review. *IJMS*. 2021; 23 (1): 29.
13. Agerer B, Koblischke M, Gudipati V, Montaño-Gutierrez LF, Smyth M, Popa A, et al. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I restricted epitopes evade CD8 + T cell responses. *Sci Immunol*. 2021; 6 (57): eabg6461.
14. de Silva TI, Liu G, Lindsey BB, Dong D, Moore SC, et al. The impact of viral mutations on recognition by SARS-CoV-2 specific T cells. *Science*. 2021; 24 (11): 103353.
15. Dolton G, Rius C, Hasan MS, Wall A, Szomolay B, Behiry E, et al. Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope. *Cell*. 2022; 185 (16): 2936–51.e19.
16. Zhang H, Deng S, Ren L, Zheng P, Hu X, Jin T, et al. Profiling CD8+ T cell epitopes of COVID-19 convalescents reveals reduced cellular immune responses to SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports*. 2021; 36 (11): 109708.
17. Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports Medicine*. 2021; 2 (7): 100355.
18. Jamshidi E, Asgary A, Shafiekhani P, Khajeamiri Y, Mohamed K, Esmaily H, et al. Longevity of immunity following COVID-19 vaccination: a comprehensive review of the currently approved vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022; 18 (5): 2037384.
19. Dutta NK, Mazumdar K, Gordy JT. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. Dutch RE, editor. *J Virol*. 2020; 94 (13): e00647-20, /jvi/94/13/JVI.00647-20.atom.
20. Thura M, Sng JXE, Ang KH, Li J, Gupta A, Hong JM, et al. Targeting intra-viral conserved nucleocapsid (N) proteins as novel vaccines against SARS-CoVs. *Bioscience Reports*. 2021; 41 (9): BSR20211491.
21. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181 (7): 1489–501.e15.
22. Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. A Novel Role for Non-Neutralizing Antibodies against Nucleoprotein in Facilitating Resistance to Influenza Virus. *J Immunol*. 2008; 181 (6): 4168–76.
23. Huang B, Wang W, Li R, Wang X, Jiang T, Qi X, et al. Influenza A virus nucleoprotein derived from *Escherichia coli* or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virology*. 2012; 9 (1): 322.
24. LaMere MW, Moquin A, Lee FEH, Misra RS, Blair PJ, Haynes L,

- et al. Regulation of Antinucleoprotein IgG by Systemic Vaccination and Its Effect on Influenza Virus Clearance. *J Virol*. 2011; 85 (10): 5027–35.
25. Vandervan HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, et al. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. *EBioMedicine*. 2016; 8: 277–90.
 26. Wraith DC, Vessey AE, Askonas BA. Purified Influenza Virus Nucleoprotein Protects Mice from Lethal Infection. *Journal of General Virology*. 1987; 68 (2): 433–40.
 27. Gil L, Lopez C, Lazo L, Valdes I, Marcos E, Alonso R, et al. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice. *International Immunology*. 2009; 21 (10): 1175–83.
 28. Lazo L, Valdes I, Guillén G, Hermida L, Gil L. Aiming at the heart: the capsid protein of dengue virus as a vaccine candidate. *Expert Review of Vaccines*. 2019; 18 (2): 161–73.
 29. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, et al. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine*. 2007; 25 (6): 1064–70.
 30. Brentville V, Vankemmelbeke M, Metheringham R, Symonds P, Cook K, Urbanowicz R, et al. A novel bivalent DNA vaccine encoding both spike protein receptor-binding domain and nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 to elicit T cell and neutralising antibody responses that cross react with variants [Internet]. *Immunology*. 2021 Jun [cited 2021 Jul 6]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.18.448932>
 31. Coronavirus3D [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://coronavirus3d.org/>
 32. Re3data.Org. GISAID [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.re3data.org/repository/r3d100010126>
 33. Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) - Flaviviridae — VIGOR4 Genome Annotation [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.viprbrc.org/brc/vigorAnnotator.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=flavi>
 34. UGENE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://ugene.net/>
 35. MUSCLE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.drive5.com/muscle>
 36. Titov A, Shaykhutdinova R, Shcherbakova OV, Serdyuk YV, Sheetikov SA, Zornikova KV, et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*. 2022; 7 (9): e157699.
 37. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*. 2021; 374 (6572): abm0829.
 38. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, O'Connell S, McDermott AB, Flach B, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384 (23): 2259–61.

ПАТОЛОГИЯ ВЕРХУШКИ ПИРАМИДЫ ВИСОЧНОЙ КОСТИ

X. M. A. Диаб^{1,2}, Н. А. Дайхес, О. А. Пашнина¹, А. М. Шамхалова¹ ✉, О. С. Панина¹¹ Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Представлен обзор публикаций, посвященных изучению различных новообразований, диагностики, выбора хирургического доступа, осложнений и частоты рецидивирования патологии верхушки пирамиды височной кости за период с 2008 по 2022 г. Наиболее распространенной доброкачественной патологией верхушки пирамиды височной кости являются выпот, мукоцеле, холестериновая гранулема, холестеатома. При лечении чаще всего используют такие хирургические доступы, как транслабиринтный, транскохлеарный, эндоскопический эндоназальный и доступ через среднюю черепную ямку. Для пациентов с сохранной слуховой функцией рекомендовано использование доступов через среднюю черепную ямку, инфракохлеарного, либо эндоскопического трансназального доступов. В случае распространенных патологических процессов, когда необходим дополнительный контроль сонной артерии и луковичи яремной вены, могут быть использованы транскохлеарный либо транслабиринтный хирургические коридоры.

Ключевые слова: верхушка пирамиды височной кости, новообразование, средняя черепная ямка, хирургический доступ, основание черепа, внутренняя сонная артерия, лицевой нерв, ликворея, осложнения, холестеатома, холестериновая гранулема, выпот, диагностика.

Вклад авторов: X. M. A. Диаб — дизайн исследования; редактирование статьи; Н. А. Дайхес — редактирование статьи; О. А. Пашнина, А. М. Шамхалова — написание текста рукописи; А. М. Шамхалова, О. С. Панина — обзор литературы.

✉ **Для корреспонденции:** Аминат Муслимовна Шамхалова
ул. Климашкина д. 12, кв. 38, г. Москва, 123557, aminaphd@mail.ru

Статья получена: 19.08.2022 **Статья принята к печати:** 20.09.2022 **Опубликована онлайн:** 29.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.032

PATHOLOGIES OF PETROUS APEX

Diab KhMA^{1,2}, Daikhes NA, Pashnina OA¹, Shamkhalova AM¹ ✉, Panina OS¹¹ National Medical Research Center for Otorhinolaryngology of the Federal Medial Biological Agency, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The review of papers, focused on studying various neoplasms, diagnosis, selection of surgical approach, complications, and recurrence rates of the petrous apex lesions, that have been published in 2008–2022, is provided. Effusion, mucocele, cholesterol granuloma, cholesteatoma are the most common benign lesions of the petrous apex. Such surgical approaches as translabyrinthine, transcochlear, endoscopic endonasal approach and the middle cranial fossa approach are most often used during treatment. The middle cranial fossa approach, infracochlear approach and endoscopic transnasal approach are recommended for patients with preserved hearing. In case of disseminated lesions, when the carotid artery and the jugular bulb should be additionally controlled, transcochlear and translabyrinthine surgical corridors could be used.

Keywords: petrous apex, neoplasm, middle cranial fossa, surgical approach, skull base, internal carotid artery, facial nerve, liquorhea, complications, cholesteatoma, cholesterol granuloma, effusion, diagnosis

Author contributions: Diab KhM — research design, manuscript editing; Daikhes NA — manuscript editing; Pashnina OA, Shamkhalova AM — manuscript writing; Shamkhalova AM, Panina OS — literature review.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aminat M. Shamkhalova
Klimashkina, 12–38, Moscow, 123557, Russia; aminaphd@mail.ru

Received: 19.08.2022 **Accepted:** 20.09.2022 **Published online:** 29.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.032

Верхушка пирамиды, располагаясь в каменистой части височной кости, является сложной для хирургического лечения анатомической областью, прилегающей к жизненно важным анатомическим структурам (второму сегменту внутренней сонной артерии (ВСА), кавернозному синусу, V ч.м.н., VI ч.м.н., височной доле мозга, подпаутинной цистерне).

В данной локализации встречается различная патология, чаще всего объемные образования, требующие исключительно хирургического лечения и выбор оптимального доступа в таких случаях является ключевой проблемой.

Патология верхушки пирамиды височной кости по этиологии делится на экстрадуральную и интрадуральную. Среди экстрадуральной наиболее часто встречаются кисты (асимметричный выпот), превосходящие по своему количеству холестериновые гранулемы, холестеатомы, хондромы, мукоцеле. К интрадуральной патологии относятся менингиомы и шванномы [1, 2].

Апикальная патология, как правило, является случайной находкой, она часто не имеет четкой симптоматики при малых размерах образования и ограниченности костными стенками пирамиды, что создает трудности для ее диагностики. При этом разрушение костных граней верхушки пирамиды и сдавление важных анатомических структур вызывают яркую клиническую картину (боли в половине лица (тройничный черепно-мозговой нерв (V)) или головные боли, диплопия (отводящий черепно-мозговой нерв (VI)), слабость мимической мускулатуры (лицевой черепно-мозговой нерв (VII)), снижение слуха и вестибулярные нарушения (преддверно-улитковый нерв (VIII)), синдром Градениго, что мотивирует пациента к обращению за срочной медицинской помощью [3, 4]. Разнообразие симптоматики возникает вследствие положения верхушки пирамиды височной кости на границе оториноларингологической и нейрохирургической практик. Хирургическое лечение пациентов с патологией верхушки пирамиды затруднено в связи с ее центральным

положением в основании черепа, близостью жизненно важных анатомических структур и, следовательно, высокой вероятностью их травматизации в ходе осуществления хирургического доступа. Хирургические техники сводятся к использованию микроскопических, эндоскопических или комбинированных методов с формированием переднего (со стороны верхней поверхности пирамиды или трансназально), латерального (транслабиринтный, транскохлеарный, инфракохлеарный доступы) или заднего (ретросигмовидный доступ при интрадуральной патологии) хирургических коридоров.

Каждый из этих подходов имеет определенные преимущества и недостатки. На сегодняшний день стандартного алгоритма хирургического вмешательства не разработано. Часть пациентов не получают адекватного лечения в связи с отсутствием опыта работы у хирургов (отохирургов / нейрохирургов) в данной зоне; публикации по данной теме в российских журналах практически отсутствуют. В случае предполагаемого доброкачественного характера процесса отмечается необходимость выбора щадящей стратегии лечения с максимальным сохранением прилежащих анатомических структур.

В этом обзоре представлены наиболее часто встречающаяся патология верхушки пирамиды височной кости, используемые хирургические доступы к верхушке пирамиды височной кости и ее анатомия.

Эпидемиология и патофизиология

Асимметричная пневматизация и выпот в клетках пирамиды являются наиболее частыми проявлениями при патологии верхушки пирамиды височной кости [5]. Частоту возникновения холестеариновой гранулемы верхушки пирамиды височной кости оценивают как 0,6 случая на 1 млн населения. Холестериновые гранулемы встречаются в 10 раз чаще, чем холестеатомы верхушки пирамиды височной кости и в 40 раз чаще, чем мукоцеле [5].

Существуют две теории образования холестеариновой гранулемы. Обструктивно-вакуумная теория основана на обструкции воздухоносного пространства, которое ведет к поглощению газа и резорбции, формированию вакуума, кровоизлиянию слизистой оболочки, воспалению, распаду эритроцитов с формированием кристаллов холестерина. При формировании кристаллов холестерина каскад воспаления инициируют резорбция кости и реакция на воспалительное тело [6]. Теория вовлечения губчатого вещества основана на формировании патологического сообщения между слизистой воздухоносных клеток в период интенсивной пневматизации верхушки пирамиды, и дальнейшем постепенном замещении губчатым веществом, что сопровождается кровоизлиянием в воздухоносные клетки верхушки пирамиды височной кости [6]. Эритроциты распадаются, формируя кристаллы холестерина, что вызывает каскадную реакцию воспаления [6].

Также была предложена гипотеза, согласно которой холестеариновые гранулемы образуются вследствие дисфункции слуховой трубы, отрицательного давления не только в барабанной полости, но и в клетках сосцевидного отростка и пирамиды височной кости, которые соединены с барабанной полостью, чаще всего опосредованно [7]. Вследствие создавшегося отрицательного давления через слизистую оболочку барабанной полости, клеток сосцевидного отростка и пирамиды височной кости протопевает жидкость (плазма) из сосудов, расположенных

субмукозно, а в некоторых случаях на определенных участках слизистой происходит разрыв сосудов с кровоизлиянием между собственно слизистой оболочкой и костной стенкой [7]. В условиях недостатка кислорода происходит гемолиз эритроцитов (гемоглобина), который ведет к образованию в том числе кристаллов холестерина из клеточных мембран, вызывающих гигантоклеточную реакцию, что в свою очередь приводит к образованию кисты [7]. Когда костная поверхность становится недостаточной для коадаптации с богатой сосудами выстилкой слизистых оболочек воздушных клеток, в результате накопления крови нарушаются пути ее оттока, нарастающее скопление крови обеспечивает прогрессивное расширение кисты [7]. По мере увеличения кисты площадь эрозии кости увеличивается, следовательно, увеличивается площадь обнаженной костной поверхности вдоль ее стенки [7]. На основании вышеизложенной теории было продемонстрировано, что у 6 из 13 пациентов с холестеариновой гранулемой действительно имелось расхождение между костной стенкой и слизистой воздухоносных клеток верхушки пирамиды височной кости, тогда как у контрольных пациентов с пневматизированными верхушками пирамиды признаков расхождения не было [7]. Данная теория была подтверждена дополнительными гистологическими исследованиями височной кости.

Холестеатома (эпидермоидная киста) состоит из эпителиального вала, фиброзного субэпителия и чешуек рогового вещества. Считается, что остатки эпидермиса формируются вблизи рваного отверстия в период эмбрионального развития [6] или же за счет миграции эктодермы наружного слухового прохода [6]. По мере увеличения холестеатомы костная эрозия может произойти от остеолитических энзимов эпителия и фиброзного субэпителия. Эпидермоидную кисту от дермоидной можно отличить по наличию кожных придатков (например, потовых желез). Мукоцеле образуется в результате обструкции дренажа высокопневматизированной верхушки пирамиды и тоже может быть причиной формирования кистозного образования [6].

Диагностика

Первичные патологии верхушки пирамиды обычно поздно диагностируют в связи с редкостью и бессимптомным течением заболевания на ранних стадиях. Дефект в области верхушки пирамиды и вокруг нее может быть вызван холестеатомой, менингиомой, шванномой, гигантоклеточной опухолью, холестеариновой гранулемой, аневризмой ВСА, метастазами или мукоцеле. Клинические особенности обусловлены сдавливанием черепных нервов IV, V и VI. Более крупные поражения могут вовлекать нервные комплексы с VII по VIII. Эрозия твердой мозговой оболочки может привести к отоликворее [8]. Образование в области верхушки пирамиды височной кости выявляют в основном с помощью КТ и МРТ. Эти методы диагностики используют также для определения объема пострезекционной полости и исключения послеоперационных осложнений.

Хирургическое лечение

Хирургическое лечение патологии верхушки пирамиды височной кости рекомендуется пациентам с такими симптомами, как потеря слуха и вестибулярные симптомы, т. е. когда патологический процесс вышел за пределы верхушки пирамиды в сторону лабиринта.

Основным фактором, который необходимо проанализировать до операции при поражении верхушки пирамиды, является локализация патологического процесса: экстрадуральная (холестериновая гранулема, хордома ската или хондросаркома) или интрадуральная (менингиома, эпидермоидные или дермоидные опухоли), поскольку это единственный фактор, который дает ключ к пониманию как этиопатогенеза, так и к тому, какие нервные и сосудистые элементы могут быть вовлечены в процесс [9]. Помимо того, выбор хирургического лечения основывается на оценке нарушения функций лицевого и слухо-вестибулярного нервов [9, 10].

Описано несколько подходов и доступов к верхушке пирамиды, их можно классифицировать как трансвисочные и трансназальные, а также как слухосохраняющие и не сохраняющие слух [5]. Хирургическое лечение включает в себя либо иссечение новообразования, либо его марсупиализацию (малую операцию по опорожнению кисты, гранулемы). Иссечение, например, холестериновой гранулемы обычно производят с широким обнажением очага поражения и оно часто требует трепанации черепа с соответствующей ретракцией височной доли головного мозга. Преимущество иссечения — в возможности уменьшения количества рецидивов, недостатки — в необходимости ретракции головного мозга (что может привести к энцефаломалации и редко судорогам), а также повышенном риске послеоперационного внутричерепного кровоизлияния [5–7]. Ликворея тоже является риском проведения внутричерепных процедур, особенно у пациентов с холестериновой гранулемой, у которых часто можно наблюдать гиперпневматизацию височных костей [11].

Существенным недостатком марсупиализации является рецидив симптомов заболевания, вследствие рубцевания, блокирующего хирургически созданный дренажный тракт [5].

Описан клинический случай пациента 24 лет с холестериновой гранулемой, осложнившейся синдромом Градениго, который первоначально поступил с тошнотой, лихорадкой, светобоязнью, левосторонней ретроорбитальной болью и головной болью [11]. Изначально был выставлен диагноз: бактериальный менингит по данным люмбальной пункции, в связи с выявленной в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) *H. influenzae*; проводили курс антибиотикотерапии. Через несколько дней к вышеизложенным симптомам присоединилась диплопия.

На МРТ головного мозга была выявлена экспансивная эрозивная холестеринковая гранулема, которую после стабилизации состояния удалили комбинированным хирургическим путем, выполненным нейрохирургом и оториноларингологом посредством эндоскопического трансфеноидального дренирования. После эвакуации содержимого кисты дефект верхушки пирамиды височной кости был марсупиализован с использованием трансплантата из слизистой правой средней носовой раковины, полученной ранее в ходе соответствующей процедуры. Патогистологически установлено ксантогранулематозное воспаление, соответствующее рентгенологически подозреваемой холестеринковой гранулеме [11].

Это атипичное проявление синдрома Градениго с редким осложнением менингита на фоне гранулемы верхушки пирамиды демонстрирует важность раннего его выявления и обязательного проведения лучевых методов исследования (МРТ), а также рассмотрения возможности выполнения хирургического вмешательства у пациентов с ранее существовавшими поражениями верхушки пирамиды

височной кости с потенциально более высоким риском опасных осложнений. Таким образом, выбор хирургического доступа и пути операции зависит от клинической картины, патологии, распространенности объемного образования, анатомического положения сосудов и опыта хирурга. Выделяют передние, боковые (латеральные или задние) и переднелатеральные (транспетрозоальные) доступы к верхушке пирамиды височной кости. К передним доступам относятся: медиальный трансфеноидальный доступ; медиальный трансфеноидальный с латерализацией ВСА; сфеноидальный доступ в нижней каменистой части височной кости; эндоскопический доступ через рваное отверстие; эндоскопическая передняя резекция пирамиды височной кости. К латеральным (задним) доступам относят: транслабиринтный, транскохлеарный, трансканальный инфракохлеарный, доступ через среднюю черепную ямку. К переднелатеральным доступам относят: открытую переднюю резекцию пирамиды височной кости.

Транслабиринтный доступ

Считается стандартным отохирургическим доступом. Он предоставляет наиболее широкий и прямой латеральный коридор к верхушке пирамиды височной кости с наилучшим контролем положения лицевого нерва на всем протяжении. Однако данный доступ влечет за собой удаление полукружных каналов, преддверия и идентификацию внутреннего слухового прохода. Он обеспечивает ограниченный подход к верхушке пирамиды височной кости. Риски этой операции включают возникновение ликвореи, повреждение лицевого нерва, вестибулярные расстройства и потерю остаточного слуха.

Инфракохлеарный или супракохлеарный доступ

Показан при поражениях, расположенных под внутренним слуховым проходом, между луковичей яремной вены, ВСА и улиткой [8–10, 12].

При использовании данного доступа костная стенка нижнего базального завитка улитки, луковича яремной вены и каменистая часть сонной артерии являются ключевыми ориентирами, которые обнажаются и идентифицируются в пределах медиальной стенки мезо- и гипотимпанума. Иногда более крупные или более латерально расположенные холестеринковые гранулемы расположены в латеральной части инфралабиринтного тракта и могут легко перейти извне в среднее ухо. Медиально расположенные холестеринковые гранулемы требуют более обширной резекции, которая иногда может быть затруднена наличием в этой локализации луковичи яремной вены или расположенной сзади каменистой частью сонной артерии. Риск ликвореи возрастает, если угол резекции направлен в сторону задней черепной ямки (ЗЧЯ) и водопровода улитки. Снижение слуха и головокружение могут возникать при травме водопровода улитки. Повреждение сонной артерии встречается редко, но требует неотложного интервенционного ангиографического лечения [13].

Трансотический доступ

Обеспечивает доступ ко всей верхушке пирамиды височной кости. При этом подходе используют те же этапы, что и при транслабиринтном доступе, с обязательным закрытием наружного слухового прохода и удалением задней стенки

канала сонной артерии и улитки. Лицевой нерв сохраняют интраканально, в отличие от транскохлеарного доступа, при котором вся внутривисочная часть нерва смещается кзади. Трансотический доступ имеет те же риски, что и транслабиринтный, а также возможны повреждение сонной артерии и формирование ятрогенной холестеатомы из-за неполного удаления кожи из наружного слухового прохода. Трансотический и транскохлеарный подходы обычно требуют облитерации слуховой трубы, так как во время кохлеоэктомии часто наблюдается ликворея. Эти подходы позволяют выполнить марсупиализацию, а в некоторых случаях и полное иссечение новообразования.

Трансканальный транспромонториальный доступ

Это усовершенствованный метод эндоскопического трансканального транспромонториального доступа для пациентов с плохим слухом или его отсутствием [9, 10, 12]. Показан для удаления поражений, расположенных во внутреннем слуховом проходе, с распространением на верхушку пирамиды височной кости, медиальнее ВСА [8, 9]. Это доступ между тимпанальным и мастоидальным сегментами лицевого нерва, луковицей яремной вены и ВСА через улитку, поэтому в послеоперационном периоде следует ожидать полную потерю слуха.

Описан клинический случай пациентки 51 года с шванномой тройничного нерва, которая поступила с жалобой на боль в лице на протяжении трех месяцев (локализация по ходу ветвей тройничного нерва справа) [4]. На МРТ-исследовании выявлено большое однородное контрастирующее образование в основании правой средней ямки с распространением через верхушку пирамиды на самый верхний и медиальный отделы задней черепной ямки. Больная была прооперирована доступом через среднюю черепную ямку (СЧЯ). В ходе операции образование было полностью резецировано; в послеоперационном периоде был отмечен парез лицевого нерва с сохраненной слезной функцией, который разрешился полностью через 6 месяцев после операции [4].

Еще один клинический случай пациентки 33 лет с постепенно прогрессирующим параличом лицевого нерва (IV степень по классификации Хауса–Брэкмана), головокружением и тошнотой. При нейровизуализации выявлена растущая опухоль, вовлекающая коллатеральный ганглий и распространяющаяся на СЧЯ, внутренний слуховой проход (ВСП) и мосто-мозжечковый угол (ММУ) [12].

Пациентка была прооперирована доступом через СЧЯ под контролем нейромониторинга лицевого нерва (ЛН). Интраоперационно было выявлено вовлечение лицевого нерва в опухолевый процесс. В ходе операции удалось максимально удалить образование с сохранением ЛН. В послеоперационном периоде парез ЛН постепенно улучшался; спустя 10 месяцев наблюдения после операции степень функции ЛН — III (по шкале Хауса–Брэкмана), без каких-либо признаков повторного роста опухоли [12].

Для обеспечения сохранности слуха при доброкачественных, неопухолевых и кистозных поражениях верхушки пирамиды височной кости используют доступ через среднюю черепную ямку (СЧЯ). Следует учитывать, что доступ через СЧЯ к верхушке пирамиды используют для того, чтобы удалить, а не просто дренировать кисту; этот доступ предпочтителен, когда локализация кисты и дефекты гипотимпанической пневматизации делают инфракохлеарный подход недопустимым.

Доступ через среднюю черепную ямку (транспирамидный)

Имеет направление сверху вниз на переднюю (верхнюю) поверхность пирамиды и к верхушке пирамиды височной кости; позволяет резецировать ограниченные патологические процессы. Этот слухосохраняющий подход уникален тем, что обеспечивает прямой доступ к верхушке пирамиды височной кости с идентификацией лицевого нерва на значительном протяжении (интракраниальный/цистернальный, интраканальный, лабиринтный и тимпанальный сегменты) вестибулокохлеарного нерва, структур ММУ [7]. Поскольку отличительная черта доступа через СЧЯ — сохранение слуха, он требует прецизионного знания микрохирургической анатомии латерального основания черепа, ввиду частого отсутствия ярко выраженных ориентиров, вариабельности анатомического строения и высокого риска появления осложнений в случае дезориентации хирурга в ходе операции [7].

Основные ориентиры латерального основания черепа при доступе через СЧЯ: средняя менингеальная артерия, большой и малый каменные нервы (GSPN); тройничный нерв (V3); проекция ВСП (IAC); дугообразное возвышение (EA); сегмент рваного отверстия (СЗ ВСА), область тройничного вдавления.

При патологических процессах большого размера, когда необходим дополнительный контроль за сонной артерией (в случае наличия кист, спускающихся книзу и окружающих сонную артерию), может быть применен транскохлеарный доступ, при необходимости с расширением в подвисочную ямку.

Эндоскопический эндоназальный доступ

Трансназальный эндоскопический доступ в некоторых случаях может обеспечить широкий дренажный путь у пациентов с холестеариновой гранулемой верхушки пирамиды височной кости. Обычно он требует широкой сфеноидотомии с созданием большого хода в очаг поражения вдоль задней боковой стенки клиновидной пазухи, а также широкой верхнечелюстной антростомии и полной этмоидэктомии в дополнение к удалению задней стенки верхнечелюстной пазухи для обнажения крыловидно-верхнечелюстной щели и подвисочной ямки. Этот подход имеет несколько преимуществ по сравнению с трансвисочным доступом. Значительно большой по ширине дренажный тракт обычно можно создать трансназальным доступом, который с меньшей вероятностью будет закрыт рубцом. Недостатки подхода включают носовое кровотечение, ликворею, рестеноз дренажного пути, сухость в носу, осложнения в виде травмы структур глазницы, головного мозга, повреждение сонной артерии и лицевого нерва, хронический серозный средний отит, требующий установки тимпаностомической трубки; хронический сфеноидит и транзитный паралич отводящего (VI) нерва, напряженная пневмоцефалия [9, 10, 12].

В литературе также описана роль отоэндоскопии при подходе к средней черепной ямке, проанализировав хирургическое лечение пациентов с холестеатомами верхушки пирамиды. Они обнаружили, что эндоскопическая хирургия показана для удаления остатков холестеатомы вокруг ВСА (особенно в медиальной части ВСА), твердой мозговой оболочки и лицевого нерва в области верхушки пирамиды, что приводит к менее инвазивному

хирургическому вмешательству и уменьшению количества рецидивов, путем полного удаления новообразования, особенно из так называемых слепых зон [14].

Между тем, в одной из работ была представлена значимость использования эндоскопической техники при хирургии супралабиринтных холестеатом, которые позволили визуализировать медиальные участки опухоли, окружающей улитку и внутреннюю сонную артерию из транскраниального доступа через СЧЯ. Для визуализации внутренней сонной артерии и нижней поверхности улитки использовали жесткий эндоскоп 70° [3].

Описан также случай использования комбинированного микроскопического и эндоскопического доступа при удалении гигантской холестеатомы пирамиды височной кости [15]. Авторы отметили, что комбинированный доступ обладает мобильностью и дает возможность манипулировать хирургу в операционной ране с использованием подходов к патологическому очагу с разных углов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно литературным данным, наиболее часто доброкачественной опухолью вершины пирамиды височной кости являются выпот, мукоцеле, холестеариновая гранулема, холестеатомы. В опубликованных источниках приведены различные используемые хирургические доступы, наиболее частые из которых — транслабиринтный, транскохлеарный, эндоскопический эндоназальный и доступ через среднюю черепную ямку.

Для пациентов с сохранной слуховой функцией рекомендовано использование доступов через среднюю черепную ямку, инфракохлеарного либо эндоскопического

трансназального доступов. В случае распространенных патологических процессов, когда необходим дополнительный контроль сонной артерии или луковички яремной вены, могут быть использованы транскохлеарный, либо транслабиринтный хирургические коридоры.

Несмотря на распространение эндоскопической техники в хирургии среднего уха, хирургия бокового основания черепа по-прежнему основана на микроскопии, поскольку патологические процессы, происходящие в этой области, часто имеют большие масштабы, а для их ликвидации целесообразнее использовать боковые доступы, в частности доступ через среднюю черепную ямку для достижения очага поражения в области вершины пирамиды височной кости, его качественного удаления и максимального сохранения жизненно важных сосудисто-нервных структур и слуха пациента.

В связи с этим, несмотря на все преимущества, эндоскопические доступы предпочтительнее использовать в комбинации с микроскопическими с целью визуализации «слепых» зон, как дополнительная помощь хирургу. Необходимость использования эндоскопического доступа как самостоятельного хирургического лечения остается спорной.

Доступ через среднюю черепную ямку является слухосохраняющим, обеспечивает хороший обзор вершины пирамиды височной кости на всем протяжении и контроль положения лицевого нерва. Для предотвращения осложнений при доступе к вершине пирамиды через среднюю черепную ямку необходимы детальное знание микрохирургической анатомии дна средней черепной ямки и прилежащих областей, хорошее пространственное мышление, хирургическая техника и достаточный опыт диссекции.

Литература

- Eytan DF, Kshetry VR, Sindwani R, Woodard TD, Recinos PF. Surgical outcomes after endoscopic management of cholesterol granulomas of the petrous apex: a systematic review. *Neurosurg Focus*. 2014; 37 (4): E14. DOI: 10.3171/2014.7.FOCUS14344. PMID: 25270133.
- Mehta GU, Raza SM. Endoscopic endonasal transpterygoid approach to petrous pathologies: technique, limitations and alternative approaches. *J Neurosurg Sci*. 2018; 62 (3): 339–46. DOI: 10.23736/S0390-5616.18.04302-3. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29327863.
- Kojima H, Tanaka Y, Yaguchi Y, Miyazaki H, Murakami S, Moriyama H. Endoscope-assisted surgery via the middle cranial fossa approach for a petrous cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx*. 2008; 35 (4): 469–74. DOI: 10.1016/j.ani.2007.09.010. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18226484.
- Cândido DNC, Rassi MS, Ceccato GHW, de Oliveira JG, Borba LAB. Microsurgical Resection of Trigeminal Schwannomas: 3-Dimensional Operative Video. *Oper Neurosurg (Hagerstown)*. 2020; 18 (1): E18. DOI: 10.1093/ons/ozp097. PMID: 31120116.
- Minor LB, Poe DS. *Surgery of the ear*. Shelton, Connecticut, USA. T2. 2015, p. 749.
- Bruchhage KL, Wollenberg B, Leichtle A. Transsphenoidal and infralabyrinthine approach of the petrous apex cholesterol granuloma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017; 274 (7): 2749–56. DOI: 10.1007/s00405-017-4593-9. Epub 2017 May 4. PMID: 28474189.
- Jackler RK, Cho M. A new theory to explain the genesis of petrous apex cholesterol granuloma. *Otol Neurotol*. 2003; 24 (1): 96–106; DOI: 10.1097/00129492-200301000-00020. PMID: 12544037.
- Van Gompel JJ, Alikhani P, Tabor MH, van Loveren HR, Agazzi S, Froelich S, et al. Youssef AS. Anterior inferior petrosectomy: defining the role of endonasal endoscopic techniques for petrous apex approaches. *J Neurosurg*. 2014; 120 (6): 1321–5. DOI: 10.3171/2014.2.JNS131773. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24655102.
- Marchioni D, Gazzini L, Bonali M, Bisi N, Presutti L, Rubini A. Role of endoscopy in lateral skull base approaches to the petrous apex. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020; 277 (3): 727–33. DOI: 10.1007/s00405-019-05750-9. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31792654.
- Marchioni D, Rubini A, Nogueira JF, Isaacson B, Presutti L. Transcranial endoscopic approach to lesions of the supragenulate ganglion fossa. *Auris Nasus Larynx*. 2018; 45 (1): 57–65. DOI: 10.1016/j.ani.2017.03.006. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28365066.
- Hodges J, Matsumoto J, Jaeger N, Wispelwey B. Gradenigo's Syndrome and Bacterial Meningitis in a Patient with a Petrous Apex Cholesterol Granuloma. *Case Rep Infect Dis*. 2020; 2020: 8822053. DOI: 10.1155/2020/8822053. PMID: 33133707; PMID: PMC7593741.
- Matsushima K, Kohno M, Izawa H, Tanaka Y. Middle Fossa Approach for Facial Nerve Schwannoma Aiming for Functional Improvement: 2-Dimensional Operative Video. *Oper Neurosurg (Hagerstown)*. 2020; 18 (5): E167–E168. DOI: 10.1093/ons/ozp178. PMID: 31301140.
- Gore MR. Gradenigo's syndrome: a review. *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 2018; 8: 220–4.
- Verma RR, Kumar R, Sagar P, Kumar R. Endoscopic Transsphenoidal Drainage of Petrous Apex Mucocele. *Ear Nose Throat J*. 2020; 145561320984997. DOI: 10.1177/0145561320984997. Epub ahead of print. PMID: 33355026.
- Iannella G, Savastano E, Pasquariello B, Re M, Magliulo G. Giant petrous bone cholesteatoma: combined microscopic surgery and an adjuvant endoscopic approach. *J Neurol Surg Rep*. 2016; 2: e46–e9.

References

- Eytan DF, Kshetry VR, Sindwani R, Woodard TD, Recinos PF. Surgical outcomes after endoscopic management of cholesterol granulomas of the petrous apex: a systematic review. *Neurosurg Focus*. 2014; 37 (4): E14. DOI: 10.3171/2014.7.FOCUS14344. PMID: 25270133.
- Mehta GU, Raza SM. Endoscopic endonasal transpterygoid approach to petrous pathologies: technique, limitations and alternative approaches. *J Neurosurg Sci*. 2018; 62 (3): 339–46. DOI: 10.23736/S0390-5616.18.04302-3. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29327863.
- Kojima H, Tanaka Y, Yaguchi Y, Miyazaki H, Murakami S, Moriyama H. Endoscope-assisted surgery via the middle cranial fossa approach for a petrous cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx*. 2008; 35 (4): 469–74. DOI: 10.1016/j.anl.2007.09.010. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18226484.
- Cândido DNC, Rassi MS, Ceccato GHW, de Oliveira JG, Borba LAB. Microsurgical Resection of Trigeminal Schwannomas: 3-Dimensional Operative Video. *Oper Neurosurg (Hagerstown)*. 2020; 18 (1): E18. DOI: 10.1093/ons/opz097. PMID: 31120116.
- Minor LB, Poe DS. *Surgery of the ear*. Shelton, Connecticut, USA. T2. 2015, p. 749.
- Bruchhage KL, Wollenberg B, Leichtle A. Transsphenoidal and infralabyrinthine approach of the petrous apex cholesterol granuloma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017; 274 (7): 2749–56. DOI: 10.1007/s00405-017-4593-9. Epub 2017 May 4. PMID: 28474189.
- Jackler RK, Cho M. A new theory to explain the genesis of petrous apex cholesterol granuloma. *Otol Neurotol*. 2003; 24 (1): 96–106; DOI: 10.1097/00129492-200301000-00020. PMID: 12544037.
- Van Gompel JJ, Alikhani P, Tabor MH, van Loveren HR, Agazzi S, Froelich S, et al. Youssef AS. Anterior inferior petrosectomy: defining the role of endonasal endoscopic techniques for petrous apex approaches. *J Neurosurg*. 2014; 120 (6): 1321–5. DOI: 10.3171/2014.2.JNS131773. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24655102.
- Marchioni D, Gazzini L, Bonali M, Bisi N, Presutti L, Rubini A. Role of endoscopy in lateral skull base approaches to the petrous apex. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020; 277 (3): 727–33. DOI: 10.1007/s00405-019-05750-9. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31792654.
- Marchioni D, Rubini A, Nogueira JF, Isaacson B, Presutti L. Transcanal endoscopic approach to lesions of the supragenicular ganglion fossa. *Auris Nasus Larynx*. 2018; 45 (1): 57–65. DOI: 10.1016/j.anl.2017.03.006. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28365066.
- Hodges J, Matsumoto J, Jaeger N, Wispelwey B. Gradenigo's Syndrome and Bacterial Meningitis in a Patient with a Petrous Apex Cholesterol Granuloma. *Case Rep Infect Dis*. 2020; 2020: 8822053. DOI: 10.1155/2020/8822053. PMID:33133707; PMCID: PMC7593741.
- Matsushima K, Kohno M, Izawa H, Tanaka Y. Middle Fossa Approach for Facial Nerve Schwannoma Aiming for Functional Improvement: 2-Dimensional Operative Video. *Oper Neurosurg (Hagerstown)*. 2020; 18 (5): E167–E168. DOI: 10.1093/ons/opz178. PMID: 31301140.
- Gore MR. Gradenigo's syndrome: a review. *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 2018; 8: 220–4.
- VermaRR, KumarR, SagarP, KumarR. Endoscopic Transsphenoidal Drainage of Petrous Apex Mucocoele. *Ear Nose Throat J*. 2020; 145561320984997. DOI: 10.1177/0145561320984997. Epub ahead of print. PMID: 33355026.
- Iannella G, Savastano E, Pasquariello B, Re M, Magliulo G. Giant petrous bone cholesteatoma: combined microscopic surgery and an adjuvant endoscopic approach. *J Neurol Surg Rep*. 2016; 2: e46–e9.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗРИТЕЛЬНОГО ГНОЗИСА С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ЭЭГ-МИКРОСОСТОЯНИЙ

С. А. Гуляев ✉

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

Инженерно-физический институт биомедицины Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Москва, Россия

Объективная диагностика мыслительных процессов человека представляет собой важную проблему современных нейрофизиологических исследований. Целью исследования было разработать систему анализа процессов зрительного гнозиса как модели высшей нервной функции. Обследовано 30 человек в возрасте 30–60 лет, не имеющих острых заболеваний или обострений хронических заболеваний, а также выраженных проблем со зрением. Анализ электроэнцефалограмм включал подавление артефактной ЭЭГ-активности, кластеризацию с выделением отдельных ЭЭГ-микросостояний согласно выбранной модели и последующим установлением локализации основного источника активности, формирующего ЭЭГ-микросостояние, посредством алгоритмов решения обратной задачи ЭЭГ пакета программ eLORETA. При тесте на зрительный гнозис с рассматриванием письменных знаков активность была зарегистрирована над большим числом полей Бродмана, чем в состоянии пассивного расслабленного бодрствования, и затрагивала поля Бродмана 18 и 19 (11 и 45% соответственно), ответственных за зрительное восприятие образов, 39-е поле — дополнительную часть области Вернике (6%), а также структуры премоторной и префронтальных областей (поля 6–11) (до 11%) при ($p < 0,001$; тест хи-квадрат Пирсона). Микросостояния, определяемые во время пребывания обследуемого в состоянии расслабленного бодрствования и при выполнении зрительной нагрузки, не представляют собой идентичные феномены, а являются градуированными производными кластерного анализа в рамках используемой математической модели. Решения обратной ЭЭГ-задачи на конечном этапе исследования позволяют определить усредненные последовательности ритмической активности, связанные с реализацией функции зрительного гнозиса.

Ключевые слова: ЭЭГ, обратная задача, микросостояния, модель, гнозис, зрение, функция

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России (протокол № 148-1 от 15 июня 2021 г.), проведено в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях. Каждый участник подписал добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Александрович Гуляев
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, г. Москва, Россия; s.gulyaev73@gmail.com

Статья получена: 31.05.2022 **Статья принята к печати:** 28.06.2022 **Опубликована онлайн:** 19.07.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.024

STUDYING VISUAL GNOSIS THROUGH EEG MICROSTATE ANALYSIS

Gulyaev SA ✉

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

Institute for Physics and Engineering in Biomedicine, National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

Objective diagnostic assessment of the human thought processes is an important issue of modern neurophysiology. The study was aimed to develop a system to analyze visual gnostic processes as a model of higher nervous function. A total of 30 people aged 30–60 having no acute disorders, exacerbations of chronic disorders or significant vision problems were examined. Electroencephalography analysis included EEG artifact removal, clustering and distinguishing specific EEG microstates according to the selected model with subsequent localization of the main source of activity, that had generated the EEG microstate, through the algorithms for solving the inverse EEG problem implemented in the sLORETA software package. When running the visual gnosis test (looking at written symbols), activity was recorded within a larger number of Brodmann areas compared to the state of relaxed wakefulness. Activity was detected within Brodmann areas 18 and 19 (11 and 45%, respectively) responsible for visual perception of images, area 39 being a part of Wernicke's area (6%), and the structures of premotor and prefrontal areas (areas 6–11) (up to 11%) ($p < 0.001$; Pearson's chi-squared test). Microstates defined when a subject is in a state of relaxed wakefulness or under visual load are not identical. Rather these are gauge derivatives of clustering in the context of used mathematical model. Solving the inverse EEG problem at the final stage of the study makes it possible to define the average sequences of rhythmic activity associated with realization of visual gnostic function.

Keywords: EEG, inverse problem, microstates, model, gnosis, vision, function

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Center for Brain and Neurotechnologies of FMBA (protocol № 148-1 dated June 15, 2021) and carried out in accordance with the principles of biomedical ethics set out in the Declaration of Helsinki (version issued in 1964 and the next updated versions). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey A. Gulyaev
Ostrovitianova, 1, str, 10, Moscow, Russia; s.gulyaev73@gmail.com

Received: 31.05.2022 **Accepted:** 28.06.2022 **Published online:** 19.07.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.024

Наиболее важной проблемой современной нейрофизиологии является установление связи между объективными данными и мыслительным процессом.

После разработки Н. Berger в 1929 г. метода записи электроэнцефалограммы у человека исследователи предлагали различные подходы к решению этой проблемы от попыток перевода мозговых ритмов в аудиозапись [1] до использования систем нисходящего искусственного интеллекта с применением массивов данных, полученных при обследовании людей, страдающих различными

заболеваниями. Однако, несмотря на все многообразие используемых технологий, решение данной проблемы по-прежнему далеко от реализации.

В настоящее время нейрофизиологические методики, основу которых составляет ЭЭГ/МЭГ-исследование в различных модальностях, вызывают меньший интерес исследователей вследствие ряда объективных причин. Так, классическое ЭЭГ-исследование построено на регистрации непрерывной ритмической активности головного мозга с помощью пула электродов, равномерно

распределенных по поверхности головы. При этом каждый из электродов эквивалентен по конструкции и функции всем остальным, что приводит к регистрации на каждом из них суммарного сигнала, связанного с активностью мозговых структур, а также множества артефактных сигналов физиологического и физического происхождения [2]. Возникает необходимость тщательной обработки общего сигнала с разделением его на отдельные составляющие с помощью математических методов [3], требующих углубленной подготовки специалиста. Следующей особенностью метода является трудность установления объективной связи характеристик исследуемых сигналов с изменением условий окружающей среды, т. е. его реактивность. Дискретные методики, такие как ВП, регистрируют изменение биоэлектрических потенциалов на предъявляемый стимул, что позволяет исследователю создать «нулевую» точку отсчета, по которой оценивают привязку наблюдаемых изменений для значимого и незначимого стимулов. Однако для оценки сложного когнитивного стимула, необходимо множество различных стимулов, что требует иной реализации метода [4, 5].

Среди предлагаемых для решения подобной задачи методов обработки ЭЭГ-данных, позволяющих получить объективную связь между изменением характеристик регистрируемого сигнала и внешним воздействием, наибольший интерес представляют алгоритмы кластерного анализа данных [6] и технологии решения обратной задачи ЭЭГ [7–9]. Данные методики позволяют реализовать структурирование и фиксацию изменений биоэлектрической активности отдельных структур головного мозга.

Кластерный анализ непрерывного ЭЭГ-сигнала, предложенный в 1990-х гг. [10], в настоящее время позволяет получить информацию о совместной работе нейронных структур головного мозга в реальном времени. В ее основе лежит наблюдение за характеристиками распределения биоэлектрических потенциалов поверхности головы, которые демонстрируют дискретное изменение общей плотности энергии суммарного потенциала поверхности головы. Так, один вариант остается стабильным в течение короткого промежутка времени, а затем быстро сменяется на другой, который тоже демонстрирует стабильность в течение определенного времени. В 1995 г. R. Pasqual-Marque предложил математический метод активного выделения ЭЭГ-микросостояний с помощью процедуры кластеризации непрерывного ЭЭГ-сигнала [11, 12]. Данные работы позволили подтвердить точку зрения о том, что каждое ЭЭГ-микросостояние отражает работу отдельной нейронной сети головного мозга или функционально связанной группы, а их последовательность можно рассматривать как отражение реализации отдельной мозговой функции [13]. Такой подход позволил разделить непрерывный поток ЭЭГ-данных, получаемый в результате первичного исследования на отдельные составляющие, которые в настоящее время позволяют выявить до 39 отдельных ЭЭГ-микросостояний. Однако максимальной репрезентативности удается добиться только у шести первых классов, что, вероятно, связано с активностью крупных нейронных сетей, отвечающих за реализацию базовых и наиболее устойчивых мозговых функций, нарушение которых проявляется в виде тяжелых изменений психической сферы [14–16]. Следовательно, в функциональном исследовании, организованном с помощью вышеописанного метода, возможно определить систему межсетевых взаимодействий, а с помощью

технологии решения обратной задачи локализовать мозговые структуры, участвующие в реализации исследуемой мозговой функции. Тем не менее применение технологий решения обратной задачи ЭЭГ должно учитывать, что для физиологического исследования понятия ЭЭГ-активность и функциональная активность нервной ткани не тождественны друг другу [17]. В условиях физиологического исследования мощность скальпового потенциала участков коры головного мозга, продуцирующих ритмическую активность, регистрируется как область высокой мощности сигнала, в отличие от участков возбуждения нервной ткани, для которых характерна низкоамплитудная и дезорганизованная ЭЭГ-активность [18, 19].

Поэтому комбинированный анализ с использованием разных функциональных технологий (ЭЭГ-фМРТ, МЭГ-фМРТ и др.) для подтверждения результатов физиологических исследований может быть малоэффективен [20]. Целью исследования было разработать систему анализа и диагностики процессов зрительного гнозиса как модели высшей нервной функции, с помощью решения обратной задачи ЭЭГ на основе кластерной модели ЭЭГ-микросостояний.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 30 практически здоровых человек в возрасте 30–60 лет ($32,4 \pm 9$ лет). Критерии включения: отсутствие выраженных проблем со зрением. Критерии исключения: травмы головы или глаз в анамнезе; прием лекарственных препаратов на постоянной основе. Всем обследуемым проводили непрерывную ЭЭГ-запись в состоянии пассивного расслабленного бодрствования с закрытыми глазами, открытыми глазами и непрерывным рассматриванием знаков (букв, цифр) в черно-белом контрастном изображении на экране компьютера. Между тестами участнику давали отдыхать 3 минуты для восстановления.

Последующий анализ электроэнцефалограмм включал подавление артефактной ЭЭГ-активности, связанной с физическими помехами ЭЭГ-исследования с помощью фильтрации на основе цифровых фильтров с фиксированной полосой пропускания 1–35 Гц, для подавления КГР и миографического компонентов. В дальнейшем физиологические артефакты подавляли методом независимого анализа компонентов, производимым с помощью утилиты RUNICA программного пакета EEGLAB Ver. 2022a (США). Кластеризацию непрерывного ЭЭГ-сигнала проводили с выделением отдельных стабильных ЭЭГ-микросостояний согласно выбранной шестикомпонентной модели методом адгези-распыления, обладающим большей чувствительностью в сравнении с методом k-средних. Выбор шести компонентов был основан на имеющихся в настоящий момент представлениях о двухпоточковой организации функциональных мозговых систем и функциональной связи отдельных микросостояний с обработкой информации. Два дополнительных микросостояния были в этом случае резервными величинами. На завершающем этапе рассчитывали пространственную локализацию ритмической активности каждого из определенных ЭЭГ-микросостояний посредством алгоритмов решения обратной задачи ЭЭГ пакета программ eLORETA.

На основании полученных результатов выстраивали гистограммы регистрации биоэлектрической активности полей Бродмана в каждом из тестов для каждого участника и в среднем по группе.

Программное и техническое обеспечение, используемое в исследовании

Электроэнцефалограф EGI-GES300 — 128 каналов ЭЭГ-записи в оригинальной системе нейроинтерфейса GydroCel-128 (аналог системы «10-5») (MAGSTIM; США). Пакет ЭЭГЛАБ под управлением системы MATLAB_Runtime 2021b (Center of the Institute for Neural Computation, the University of California San Diego; США). Пакет программ eLORETA v20210701 (University Hospital of Psychiatry, University of Zurich; Швейцария). Пакет программ статистической обработки информации GNU PSPP (International). Операционная система Linux Mate 21.10 (Canonic, Великобритания). Набор офисных программ LibreOffice 7.2 (Document Foundation; США). Коммерческое лицензируемое ПО в проведенном исследовании не использовали.

Выбор функционального дизайна исследования

В исследовании использовали стимуляцию зрительного анализатора, поскольку его нейронные сети занимают наибольшую площадь коры головного мозга и их возбуждение вызывает наибольшее изменение ритмической активности головного мозга, позволяя получить более точный результат, чем анализ активности других нейронных систем. В качестве нагрузочных проб были выбраны пребывание исследуемого в состоянии пассивного расслабленного бодрствования с закрытыми и открытыми глазами, а также в состоянии реализации зрительного гнозиса, посредством рассматривания различных символов и знаков на телевизионном экране. С целью выделения характеристик биоэлектрической активности при пребывании анализатора в неактивном состоянии (закрытые глаза), в активном состоянии, без формирования ментальной задачи (состояние пассивного бодрствования с открытыми глазами) и во время реализации ментальной задачи — в виде теста с рассматриванием знаков.

Методы статистического анализа

В исследовании использовали линейную модель, включающую один фактор — воздействие на систему зрительного анализатора. Несмотря на прямую взаимосвязь данных, получаемых в ходе эксперимента, после их проверки на нормальность распределения был выбран метод однофакторного дисперсионного анализа ANOVA из-за различий результатов, полученных с помощью модели разделения исследуемой активности на классы. Достоверность результатов решения обратной ЭЭГ-задачи оценивали с помощью критерия хи-квадрат Пирсона, поскольку получаемые результаты имели качественный характер изменений. Исследования выполняли согласно рекомендациям [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики ЭЭГ-микросостояний, полученные в результате проведения эксперимента

Основными объективными показателями ЭЭГ-микросостояний, учитываемых в исследовании, были: частота регистрации каждого микросостояния в 1 с, его продолжительность в секундах и процентный вклад в структуру общего ЭЭГ-потенциала. Эти показатели условно отражали характеристики отдельной нейронной сети, формирующей каждое отдельное микросостояние, частоту ее функциональной активации во время реализации исследуемой функции и относительное количество составляющих функциональных элементов, содержащихся в этой сети.

Исследование показателя частоты регистрации ЭЭГ-микросостояний показало, что наибольшие изменения возникали при сравнении состояния пассивного расслабленного бодрствования с закрытыми глазами и тестами, в которых глаза были открыты. Так, показатели первого и второго классов демонстрировали достоверные ($p < 0,05$; ANOVA) изменения при выполнении всех

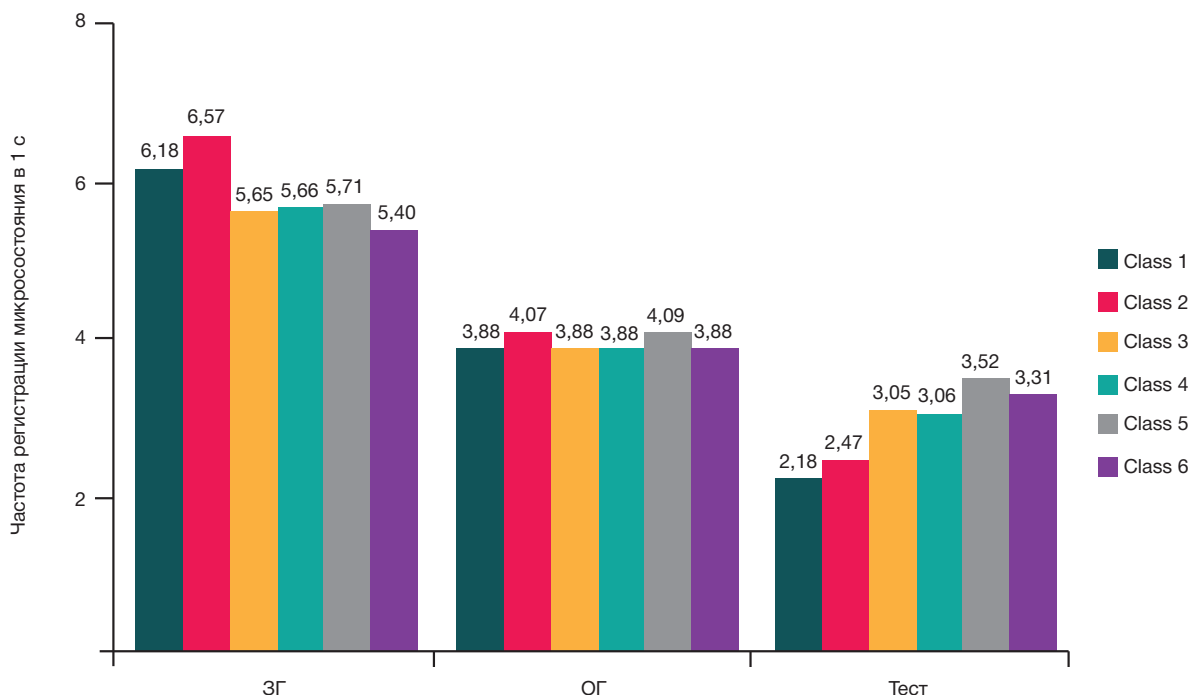


Рис. 1. Средние значения частоты регистрации шести классов ЭЭГ-микросостояний в 1 с при выполнении нагрузочных тестов

тестов, но остальные классы ЭЭГ-микросостояний имели достоверные различия ($p < 0,05$; ANOVA) только с состоянием расслабленного бодрствования с закрытыми глазами. В остальных случаях, при проведении тестов с открытыми глазами, достоверных различий в значениях частот регистрации не обнаружено ($0,1 < p < 0,8$; ANOVA) (рис. 1).

Расчет процента вклада каждого ЭЭГ-микросостояния в общую энергию потенциала поверхности головы не выявил достоверных различий между показателями, полученными в результате проведения всех трех тестов. Уровень статистической достоверности был выше 0,5 (рис. 2).

Продолжительность существования ЭЭГ-микросостояний показала наличие достоверного увеличения этого показателя при открывании глаз и выполнении нагрузочного теста на распознавание символов ($0,01 < p < 0,05$; ANOVA), в то время как эти величины при сравнении результатов пребывания обследуемого с открытыми глазами и при активном выполнении зрительного теста практически не различались ($0,1 < p < 0,9$; ANOVA).

Решение обратной задачи ЭЭГ для используемой модели классов ЭЭГ-микросостояний

Решение обратной задачи ЭЭГ было проведено с помощью набора прикладных программ обработки e-LORETA. В каждом из выделенных в результате процедуры кластерного анализа классе ЭЭГ-микросостояний была определена локализация их источника и произведено ее сопоставление с атласом К. Бродмана.

В состоянии пассивного расслабленного бодрствования с закрытыми глазами активность выявлена в следующих полях Бродмана: 11 — области обонятельного анализатора, 18 и 19 — вторичных зон зрительного анализатора, а также 21 — вестибулярного и 37–47 — областей музыкального восприятия продукции, что в свете регистрации ритмического характера ЭЭГ-активности отражало готовность данных центров к восприятию

и анализу тональных раздражителей или к ответу, в случае реакции человека на раздражение, проявляемое в качестве звуковой реакции (вскрик, звук, не имеющие морфо-фонетической структуры).

Открывание глаз изменяло регистрируемую картину с выделением трех основных зон активности: поля 18 — области зрительного анализатора, ответственной за распознавание письменной речи, поля 20 — коркового центра вестибулярного анализатора / распознавания сложных образов, поля 37 — акустико-гностического центра речи.

При тесте на зрительный гнозис с рассматриванием письменных знаков, активность была зарегистрирована над большим числом полей Бродмана, чем в состоянии пассивного расслабленного бодрствования (рис. 4). Она затрагивала как поля Бродмана 18 и 19, ответственных за зрительное восприятие образов, поле 39 — дополнительную часть области Вернике, а также структуры премоторной и префронтальных областей (поля 6–11).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что технология непрерывного ЭЭГ-исследования, дополненная методиками анализа ЭЭГ-микросостояний и решения обратной задачи ЭЭГ, может быть использована в качестве инструмента исследования изменений функциональной активности головного мозга во время реализации высших нервных функций.

Анализ основных характеристик ЭЭГ-микросостояний показал, что активация зрительного анализатора оказывает общее влияние на показатели частоты регистрации и продолжительность каждого класса ЭЭГ-микросостояний. Вместе с тем, достоверных изменений характеристик вклада каждого из классов в общий биопотенциал не наблюдалось. Данный факт соотносится с результатом ряда работ [22, 23], поскольку такая устойчивость обусловлена структурной сохранностью нейронных сетей,

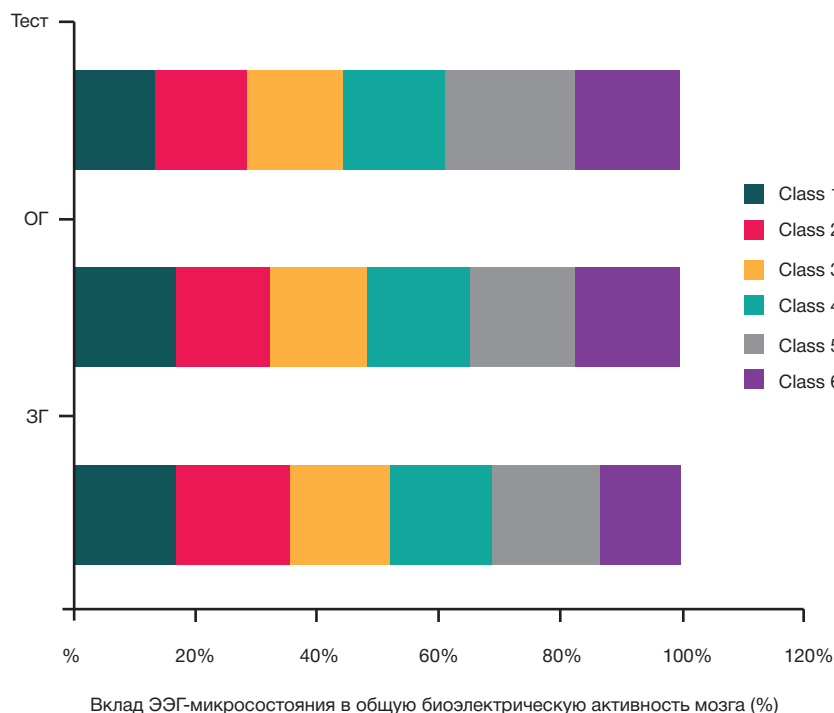


Рис. 2. Средние величины динамики изменений вклада каждого из микросостояний в формирование общей энергии потенциала поверхности головы при выполнении основных тестов исследования

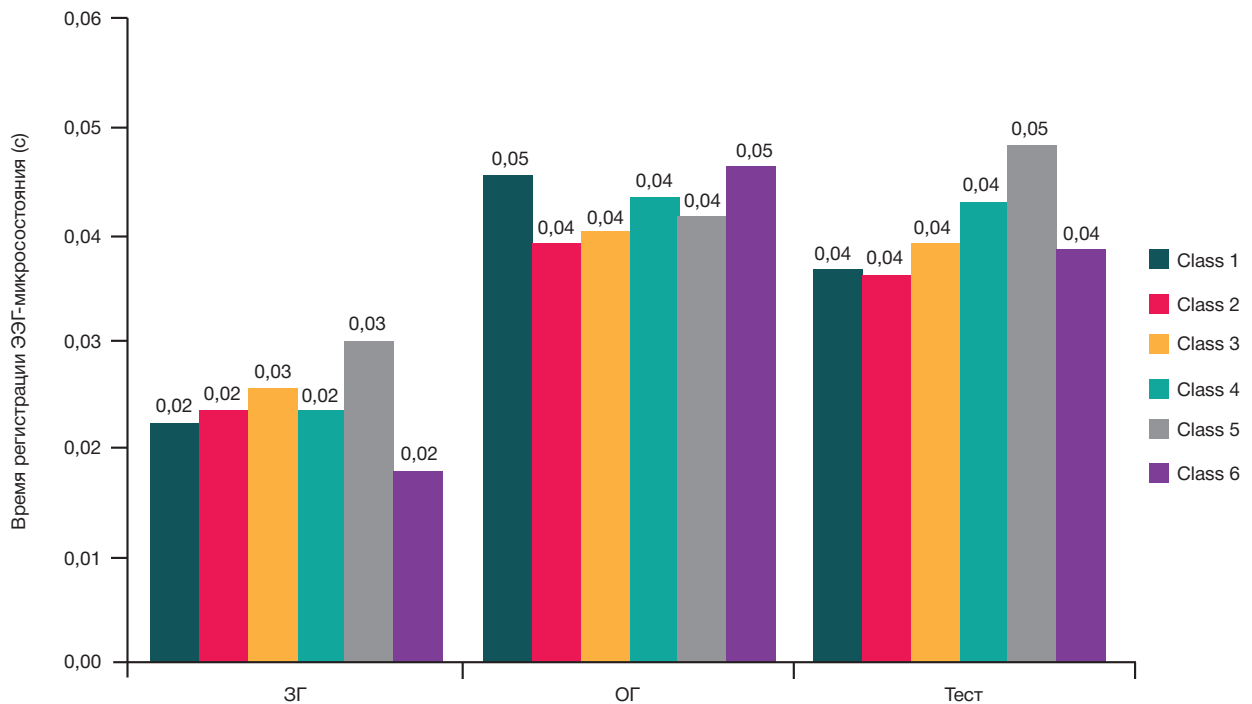


Рис. 3. Изменение продолжительности ЭЭГ-микросостояний (средние значения) в зависимости от нагрузки

участвующих в формировании каждого из микросостояний у практически здоровых участников эксперимента.

Достоверно значимая изменчивость показателей частоты регистрации и длительности существования первого и второго классов ЭЭГ-микросостояний также была ожидаемым результатом, уже описанным в литературе, связываемым с перестройкой активности крупных нейронных сетей во время реализации функционального ответа, а отсутствие подобной динамики в показателях остальных 4-х классов, вероятно, было связано с их худшей выделяемостью при анализе записи, что отмечено ранее [24].

Результаты наблюдения позволяют сделать вывод, что микросостояния, определяемые во время пребывания обследуемого в состоянии расслабленного бодрствования с закрытыми глазами и при выполнении зрительной нагрузки, не представляют собой идентичные феномены, поскольку активность нейронных сетей, их формирующих, имеет существенные различия как по частоте регистрации, так и по продолжительности каждого выделяемого класса ЭЭГ-микросостояний. Можно предположить, что основным эффектом используемой кластерной модели является возможность дискретизации результата ЭЭГ-исследования с выделением отдельных групп мозговой активности, соответствующим работе отдельных нейронных сетей. Однако расчет базовых показателей ЭЭГ-микросостояний не позволяет определить их специфичность.

В ходе эксперимента было выявлено, что ЭЭГ-микросостояния, определяемые во время пребывания, обследуемого в состоянии расслабленного бодрствования и при выполнении зрительной нагрузки, не представляют собой идентичные феномены. Они скорее являются градуированными производными кластерного анализа в рамках используемой математической модели, о чем свидетельствовали различия их базовых характеристик в покое, в состоянии с открытыми глазами и выполнении нагрузочного теста, хотя аналогичного описания подобных находок в обработанных литературных источниках не было обнаружено.

Решения обратной ЭЭГ-задачи на конечном этапе исследования позволили локализовать и определить три

усредненные последовательности (по полям Бродмана), характерные для использованных в ходе исследования нагрузок. С учетом особенностей регистрации и частотного анализа ЭЭГ-сигнала они отражали процессы подготовки / выбора соответствующих нейронных сетей для последующей функциональной активности, которые возможно назвать состоянием «ожидания» [25–27]. Однако в ходе реализации сложной (гностической) мозговой функции процессы возбуждения и ожидания ритмично сменяют друг друга, что позволяет характеризовать определенные участки именно как активные и связанные с реализацией исследуемой функции. Так, в условиях пассивного бодрствования с открытыми глазами практически не регистрировалась ритмическая активность 19-го поля Бродмана, поскольку данная нейронная сеть находилась в состоянии возбуждения и спектральная мощность ее сигнала была минимальной. В то же время спектральная мощность полей анализатора сложных образов (поле 20) и гностического центра звуковосприятия-анализа (поле 37) характеризовала готовность данных образований к включению, что фактически соответствовало состоянию повышенного внимания в ожидании обращенной к человеку речи. В состоянии пассивного бодрствования с закрытыми глазами таких компонентов, связанных с повышением внимания на конкретную задачу, не наблюдалось, изменения ритмической активности затрагивали зрительные области (поля 18 и 19), а также центр музыкального воспроизведения (поле 47), что больше соответствовало ожиданию восприятия внешней сигнальной информации, с готовностью к их анализу и первичной неспецифической реакции. В ходе тестовой нагрузки в виде рассматривания символических значений характеристики ритмической активности были более сложными, чем в состоянии пассивного расслабленного бодрствования, поскольку затрагивали большее число полей Бродмана. Это наблюдение было расценено как следствие циклических переходов невральные сети от состояния возбуждения к состоянию ожидания во время реализации функции зрительного гнозиса.

Таким образом, по нашему мнению, предложенная в работе методика, основанная на использовании

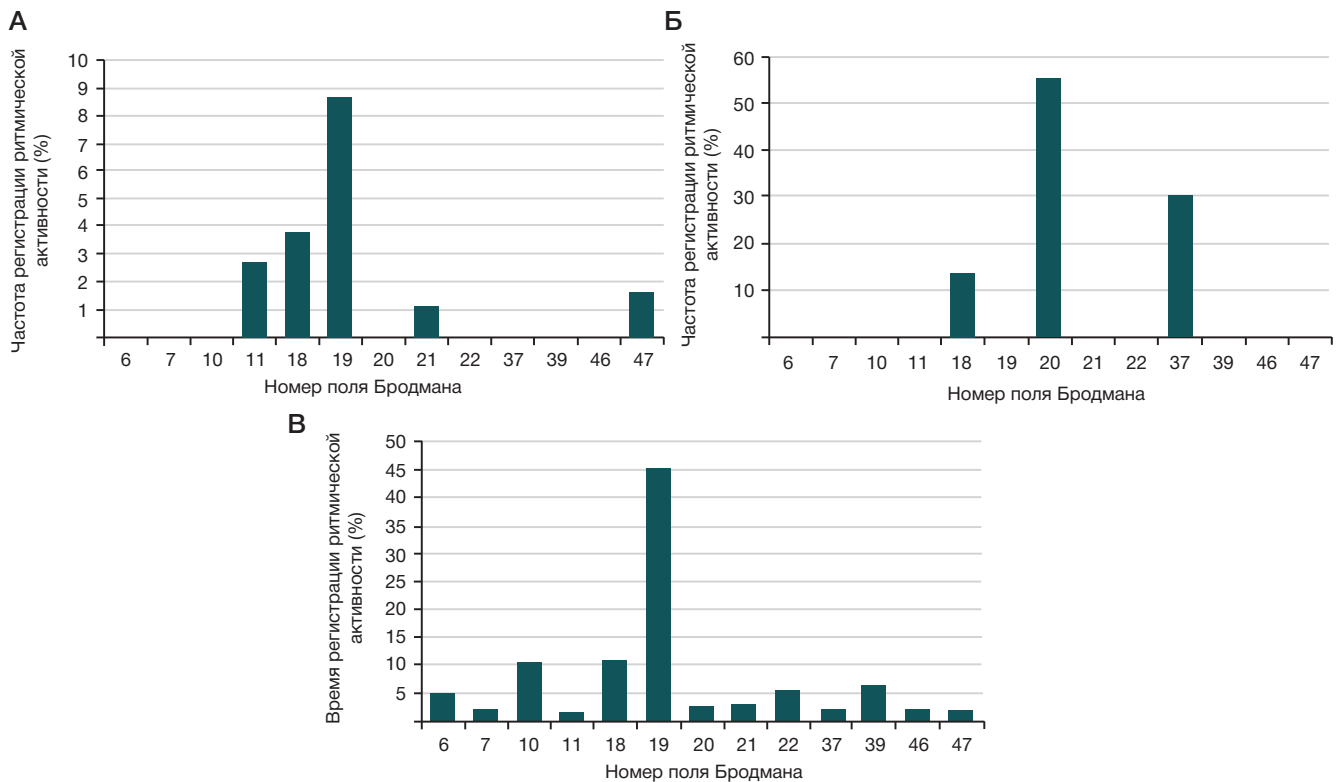


Рис. 4. Сравнение усредненных (по группе) количественных характеристик регистрации сигнала полей Бродмана в решении обратной задачи ЭЭГ при выполнении тестов исследования на модели шести классов ЭЭГ-микросостояний ($p < 0,001$; тест хи-квадрат Пирсона). а — глаза закрыты, б — глаза открыты; с — выполнение теста на распознавание

ЭЭГ-микросостояний, позволяет выявлять функциональные последовательности, связанные с реализацией отдельных мозговых функций, что в последующем можно использовать при разработке новой диагностической аппаратуры для объективного исследования мыслительных процессов головного мозга.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало возможности исследования высших нервных функций с помощью регистрации изменений характеристик биопотенциалов поверхности головы, однако реализация данной

методики требует радикального пересмотра как в отношении организации ЭЭГ-обследования, так и анализа полученных результатов. Необходима разработка новой диагностической аппаратуры, в значительной степени отличной от классических аппаратов ЭЭГ-диагностики, используемых в настоящее время с полным пересмотром аналитического блока в пользу систем автоматического анализа активности мозговых структур. Перспективы таких разработок весьма не только интересны для современной нейронауки, но и обладают значительным прикладным потенциалом для разработки систем контроля человека в сложных условиях окружающей среды.

Литература

- Pearce JMS, Lord Adrian, MD, PRS, OM. Eur Neurol. 2018; 79 (1–2): 64–67. Available from: <https://doi.org/10.1159/000485615>.
- Qi G, Zhao S, Ceder AA, Guan W, Yan X. Wielding and evaluating the removal composition of common artefacts in EEG signals for driving behaviour analysis. Accid Anal Prev. 2021; 159: 106223. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aap.2021.106223>.
- Bigdely-Shamlo N, Touryan J, Ojeda A, Kothe C, Mullen T, Robbins K. Automated EEG mega-analysis I: Spectral and amplitude characteristics across studies. Neuroimage. 2020; 207: 116361. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116361>.
- Serra LL, Serra C. Advances in evoked potential recording. A historical review. Acta Neurol (Napoli). 1990; 12 (6): 429–39. PMID: 2080721.
- Кулаичев А. П. Компьютерная электрофизиология и функциональная диагностика. М.: ИНФРА-М, 2007; с. 178–230. Available from: <http://protein.bio.msu.ru/~akula/anEEG/AnEEG.htm>.
- Dittman Z, Munia TTK, Aviyente S. Graph Theoretic Analysis of Multilayer EEG Connectivity Networks. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. 2021; 2021: 475–9. Available from: <https://doi.org/10.1109/EMBC46164.2021.9629514>.
- Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D. Segmentation of brain electrical activity into microstates: model estimation and validation. IEEE Trans Biomed Eng. 1995; 42 (7): 658–65. Available from: <https://doi.org/10.1109/10.391164>.
- Grech R, Cassar T, Muscat J, Camilleri KP, Fabri SG, Zervakis M, Xanthopoulos P, Sakkalis V, Vanrumste B. Review on solving the inverse problem in EEG source analysis. J Neuroeng Rehabil. 2008; 5: 25. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-0003-5-25>.
- Hecker L, Rupperecht R, Tebartz Van Elst L, Kornmeier J. ConvDip: A Convolutional Neural Network for Better EEG Source Imaging. Front Neurosci. 2021; 15: 569918. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.569918>.
- Lehmann D, Strik WK, Henggeler B, Koenig T, Koukkou M Brain electric microstates and momentary conscious mind states as

- building blocks of spontaneous thinking: I. Visual imagery and abstract thoughts. *Int J Psychophysiol.* 1998; 29 (1): 1–11. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0167-8760\(97\)00098-6](https://doi.org/10.1016/s0167-8760(97)00098-6).
11. Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D. Segmentation of brain electrical activity into microstates: model estimation and validation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1995; 42 (7): 658–65. Available from: <https://doi.org/10.1109/10.391164>.
 12. Mishra A, Englitz B, Cohen MX. EEG microstates as a continuous phenomenon. *Neuroimage.* 2020; 208: 116454. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116454>.
 13. Michel CM, Koenig T. EEG microstates as a tool for studying the temporal dynamics of whole-brain neuronal networks: A review. *Neuroimage.* 2018; 180 (Pt B): 577–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.11.062>.
 14. Sun Q, Zhou J, Guo H, Gou N, Lin R, Huang Y, Guo W, Wang X. EEG Microstates and Its Relationship With Clinical Symptoms in Patients With Schizophrenia. *Front Psychiatry.* 2021; 12: 761203. Available from: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.761203>.
 15. de Bock R, Mackintosh AJ, Maier F, Borgwardt S, Riecher-Rössler A, Andreou C. EEG microstates as biomarker for psychosis in ultra-high-risk patients. *Transl Psychiatry.* 2020; 10 (1): 300. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00963-7>. PMID: 32839449; PMCID: PMC7445239.
 16. Abreu R, Jorge J, Leal A, Koenig T, Figueiredo P. EEG Microstates Predict Concurrent fMRI Dynamic Functional Connectivity States. *Brain Topogr.* 2021; 34 (1): 41–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10548-020-00805-1>.
 17. Michel CM, Brunet D. EEG Source Imaging: A Practical Review of the Analysis Steps. *Front Neurol.* 2019; 10: 325. Available from: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00325>.
 18. Van Oosterom A. The inverse problem of bioelectricity: an evaluation. *Med Biol Eng Comput.* 2012; 50 (9): 891–902. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11517-012-0941-5>.
 19. Biscay RJ, Bosch-Bayard JF, Pascual-Marqui RD. Unmixing EEG Inverse Solutions Based on Brain Segmentation. *Front Neurosci.* 2018; 12: 325. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00325>.
 20. Ritter P, Villringer A. Simultaneous EEG-fMRI. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30 (6): 823–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.008>.
 21. Sarter M, Fritschy JM. Reporting statistical methods and statistical results in EJN. *Eur J Neurosci.* 2008; 28 (12): 2363–4. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06581.x>.
 22. Croce P, Quercia A, Costa S, Zappasodi F. EEG microstates associated with intra- and inter-subject alpha variability. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 2469. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58787-w>.
 23. Croce P, Spadone S, Zappasodi F, Baldassarre A, Capotosto P. rTMS affects EEG microstates dynamic during evoked activity. *Cortex.* 2021; 138: 302–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2021.02.014>.
 24. Kadier N, Stein M, Koenig T. EEG Microstates and Psychosocial Stress During an Exchange Year. *Brain Topogr.* 2021; 34 (2): 117–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10548-020-00806-0>.
 25. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 29 (2–3): 169–95. Available from: [https://www.doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00056-3](https://www.doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00056-3).
 26. Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S. EEG alpha oscillations: the inhibition-timing hypothesis. *Brain Res Rev.* 2007; 53 (1): 63–88. Available from: <https://www.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.003>.
 27. Klimesch W, Doppelmayr M, Hanslmayr S. Upper alpha ERD and absolute power: their meaning for memory performance. *Prog Brain Res.* 2006; 159: 151–65. Available from: [https://www.doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)59010-7](https://www.doi.org/10.1016/S0079-6123(06)59010-7).

References

1. Pearce JMS, Lord Adrian, MD, PRS, OM. *Eur Neurol.* 2018; 79 (1–2): 64–67. Available from: <https://doi.org/10.1159/000485615>.
2. Qi G, Zhao S, Ceder AA, Guan W, Yan X. Wielding and evaluating the removal composition of common artefacts in EEG signals for driving behaviour analysis. *Accid Anal Prev.* 2021; 159: 106223. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aap.2021.106223>.
3. Bigdely-Shamlo N, Touryan J, Ojeda A, Kothe C, Mullen T, Robbins K. Automated EEG mega-analysis I: Spectral and amplitude characteristics across studies. *Neuroimage.* 2020; 207: 116361. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116361>.
4. Serra LL, Serra C. Advances in evoked potential recording. A historical review. *Acta Neurol (Napoli).* 1990; 12 (6): 429–39. PMID: 2080721.
5. Kulaichev AP. *Comp'uternaya electrofisiologiya i funktsionalnaya diagnostica. M.: INFRA-M, 2007; s. Russian.*
6. Dittman Z, Munia TTK, Aviyente S. Graph Theoretic Analysis of Multilayer EEG Connectivity Networks. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2021; 2021: 475–9. Available from: <https://doi.org/10.1109/EMBC46164.2021.9629514>.
7. Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D. Segmentation of brain electrical activity into microstates: model estimation and validation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1995; 42 (7): 658–65. Available from: <https://doi.org/10.1109/10.391164>.
8. Grech R, Cassar T, Muscat J, Camilleri KP, Fabri SG, Zervakis M, Xanthopoulos P, Sakkalis V, Vanrumste B. Review on solving the inverse problem in EEG source analysis. *J Neuroeng Rehabil.* 2008; 5: 25. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-0003-5-25>.
9. Hecker L, Rupprecht R, Tebartz Van Elst L, Kornmeier J. ConvDip: A Convolutional Neural Network for Better EEG Source Imaging. *Front Neurosci.* 2021; 15: 569918. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.569918>.
10. Lehmann D, Strik WK, Henggeler B, Koenig T, Koukkou M. Brain electric microstates and momentary conscious mind states as building blocks of spontaneous thinking: I. Visual imagery and abstract thoughts. *Int J Psychophysiol.* 1998; 29 (1): 1–11. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0167-8760\(97\)00098-6](https://doi.org/10.1016/s0167-8760(97)00098-6).
11. Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D. Segmentation of brain electrical activity into microstates: model estimation and validation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1995; 42 (7): 658–65. Available from: <https://doi.org/10.1109/10.391164>.
12. Mishra A, Englitz B, Cohen MX. EEG microstates as a continuous phenomenon. *Neuroimage.* 2020; 208: 116454. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116454>.
13. Michel CM, Koenig T. EEG microstates as a tool for studying the temporal dynamics of whole-brain neuronal networks: A review. *Neuroimage.* 2018; 180 (Pt B): 577–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.11.062>.
14. Sun Q, Zhou J, Guo H, Gou N, Lin R, Huang Y, Guo W, Wang X. EEG Microstates and Its Relationship With Clinical Symptoms in Patients With Schizophrenia. *Front Psychiatry.* 2021; 12: 761203. Available from: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.761203>.
15. de Bock R, Mackintosh AJ, Maier F, Borgwardt S, Riecher-Rössler A, Andreou C. EEG microstates as biomarker for psychosis in ultra-high-risk patients. *Transl Psychiatry.* 2020; 10 (1): 300. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00963-7>. PMID: 32839449; PMCID: PMC7445239.
16. Abreu R, Jorge J, Leal A, Koenig T, Figueiredo P. EEG Microstates Predict Concurrent fMRI Dynamic Functional Connectivity States. *Brain Topogr.* 2021; 34 (1): 41–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10548-020-00805-1>.
17. Michel CM, Brunet D. EEG Source Imaging: A Practical Review of the Analysis Steps. *Front Neurol.* 2019; 10: 325. Available from: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00325>.
18. Van Oosterom A. The inverse problem of bioelectricity: an evaluation. *Med Biol Eng Comput.* 2012; 50 (9): 891–902. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11517-012-0941-5>.
19. Biscay RJ, Bosch-Bayard JF, Pascual-Marqui RD. Unmixing EEG Inverse Solutions Based on Brain Segmentation. *Front Neurosci.* 2018; 12: 325. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00325>.

20. Ritter P, Villringer A. Simultaneous EEG-fMRI. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30 (6): 823–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.008>.
21. Sarter M, Fritschy JM. Reporting statistical methods and statistical results in EJM. *Eur J Neurosci.* 2008; 28 (12): 2363–4. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06581.x>.
22. Croce P, Quercia A, Costa S, Zappasodi F. EEG microstates associated with intra- and inter-subject alpha variability. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 2469. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58787-w>.
23. Croce P, Spadone S, Zappasodi F, Baldassarre A, Capotosto P. rTMS affects EEG microstates dynamic during evoked activity. *Cortex.* 2021; 138: 302–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2021.02.014>.
24. Kadier N, Stein M, Koenig T. EEG Microstates and Psychosocial Stress During an Exchange Year. *Brain Topogr.* 2021; 34 (2): 117–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10548-020-00806-0>.
25. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 29 (2–3): 169–95. Available from: [https://www.doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00056-3](https://www.doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00056-3).
26. Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S. EEG alpha oscillations: the inhibition-timing hypothesis. *Brain Res Rev.* 2007; 53 (1): 63–88. Available from: <https://www.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.003>.
27. Klimesch W, Doppelmayr M, Hanslmayr S. Upper alpha ERD and absolute power: their meaning for memory performance. *Prog Brain Res.* 2006; 159: 151–65. Available from: [https://www.doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)59010-7](https://www.doi.org/10.1016/S0079-6123(06)59010-7).

РАЗРАБОТКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ КОМПОНЕНТАМИ РАКЕТНЫХ ТОПЛИВ

Г. А. Жариков¹ ✉, О. А. Крайнова¹, М. Р. Хайтов², А. И. Марченко¹

¹ Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, п. Большевик, Московская область, Россия

² Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Ракетное топливо, гептил и авиационный керосин, широко используют в двигательных установках космических кораблей «Протон» и «Союз». При падении отделяющихся первых ступеней ракет и в случае аварийных ситуаций компоненты ракетных топлив (КРТ) попадают в окружающую среду, вызывая сильные токсические эффекты. Целью исследования было выделить штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ и изучить их безопасность для биоремедиации загрязненных почв. Из природных почв выделены микроорганизмы, способные разлагать гептил, формалин и авиационный керосин. Получена ассоциация из двух штаммов бактерий *Pseudomonas putida* 5Г и *Rhodococcus erythropolis* 62М/3, отработана методика их применения для рекультивации загрязненной КРТ почвы. Результаты лабораторных и полевых испытаний показали высокую эффективность микробной деструкции загрязнителей, снижение интегральной токсичности и фитотоксичности очищаемой почвы до безопасных уровней, повышение ее биологической активности. Так, было отмечено повышение дегидрогеназной активности в 2,4 раза, гидролазной — в 2,1 раза, целлюлазной — в 5,1 раза. Ассоциацию микроорганизмов можно рекомендовать для рекультивации почв, загрязненных КРТ.

Ключевые слова: ракетное топливо, гептил, диметилгидразин, формальдегид, авиационный керосин, компоненты ракетных топлив, микроорганизмы-деструкторы, биоремедиация почв

Финансирование: исследования проводили в рамках государственных заказов Федерального медико-биологического агентства России (№ 26.008.02.0, № 22.009.21.800).

Вклад авторов: М. Р. Хайтов — общее руководство исследованиями; Г. А. Жариков — планирование и руководство лабораторными и полевыми исследованиями, проведение экспериментов, анализ полученных результатов; О. А. Крайнова — микробиологические исследования (выделение и селекция бактерий-деструкторов ракетных топлив, наработка микробных суспензий для экспериментов, поддержание музея биодеструкторов); А. И. Марченко — микробиологические и биохимические исследования (ферментативная активность почвы), биотестирование почвы на токсичность, статистическая обработка данных.

Соблюдение этических стандартов: работы с животными выполняли в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. Ветеринарные протоколы № 669 и № 677 по штаммам 5Г и 62М/3 утверждены комиссией по биоэтике (протокол № 165/2019 от 19 февраля 2019 г., протокол № 169/2019 от 16 апреля 2019 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Геннадий Алексеевич Жариков
ул. Ленина, д. 102А, п. Большевик, Серпуховский городской округ, Московская область, 142253, Россия; Zharikov@toxicbio.ru

Статья получена: 22.06.2022 **Статья принята к печати:** 18.08.2022 **Опубликована онлайн:** 15.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.031

DEVELOPMENT OF MICROBIAL PREPARATION FOR BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH ROCKET FUEL COMPONENTS

Zharikov GA¹ ✉, Krainova OA¹, Khaitov MR², Marchenko AI¹

¹ Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations of the Federal Medical Biological Agency, Bolshevik, Moscow region, Russia

² National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Heptyl rocket fuel and aviation kerosene are widely used in the propulsion systems of the Proton and Soyuz spacecraft. The propellant components (RFC) enter the environment, causing strong toxic effects, when the separating first stages of rockets fall away or in case of emergencies. The study was aimed to isolate strains of microorganisms-destroyers of RFC, as well as to assess their safety for bioremediation of contaminated soils. Microorganisms capable of decomposing heptyl, formalin, and aviation kerosene were isolated from natural soils. An association of two strains of bacterial destructors *Pseudomonas putida* 5G and *Rhodococcus erythropolis* 62M/3 was obtained, and a method of their use in recultivation of soil contaminated with RFC was developed. The results of laboratory and field tests showed high efficiency of the microbial destruction of pollutants, the decrease in integral toxicity and phytotoxicity of the cleaned soil to safe levels, and an increase in the soil biological activity. Thus, dehydrogenase activity increased by 2.4 times, hydrolase activity by 2.1 times, and cellulase activity by 5.1 times. Microbial association can be recommended for recultivation of soil contaminated with RFC.

Keywords: rocket fuel, heptyl, dimethylhydrazine, formaldehyde, aviation kerosene, rocket fuel components, degrading microorganisms, soil bioremediation

Funding: the study was carried out under state orders of the Federal Medical Biological Agency of Russia (№ 26.008.02.0, № 22.009.21.800).

Author contribution: Khaitov MR — general research management; Zharikov GA — planning and management of laboratory and field research, experimental procedure, data analysis; Krainova OA — microbiological testing (isolation and selection of bacterial destructors of rocket fuel, preparation of microbial suspensions for experiments, biodestructor collection maintenance); Marchenko AI — microbiological and biochemical testing (enzyme activity of soil), biotests for assessment of soil toxicity, statistical data processing.

Compliance with ethical standards: animals were treated in accordance with the principles of Good Laboratory Practice. Veterinary protocols № 669 and № 677 for strains 5G and 62M/3 were approved by the Bioethics Commission (protocol № 165/2019 of 19 February 2019, protocol № 169/2019 of 16 April 2019).

✉ **Correspondence should be addressed:** Gennady A. Zharikov
Lenina, 102A, Bolshevik, Serpukhov city district, Moscow region, 142253, Russia; Zharikov@toxicbio.ru

Received: 22.06.2022 **Accepted:** 18.08.2022 **Published online:** 15.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.031

Гептил (несимметричный диметилгидразин — НДМГ) используют в качестве жидкого топлива для вывода на орбиту космических кораблей типа «Протон», «Циклон», «Космос», «Рокот», «Стрела» и автоматических спутников Земли. Широкое использование НДМГ в ракетно-космической технике обусловлено его особыми эксплуатационными свойствами, и замены ему, как горючему, в ближайшем будущем не предвидится [1]. Благодаря его физико-химическим свойствам (высокая летучесть и растворимость в водных растворах) диметилгидразин мигрирует в природной среде, разлагается на ряд высокотоксичных продуктов, длительно сохраняется в почве. НДМГ относится к 1 классу опасности, он обладает канцерогенным, мутагенным, эмбриотоксическим («желтые дети») и тератогенным (нарушения эмбрионального развития) действием, вызывая развитие злокачественных опухолей у работающих с ним людей или проживающих на загрязненных территориях [1, 2]. Авиационный керосин, который применяют в пилотируемых кораблях типа «Союз», также высокотоксичен [1].

К настоящему моменту не разработаны действенные, экологически безопасные и дешевые методы очистки почв, загрязненных гептилом и авиационным керосином. Все существующие технологии можно условно разделить на три группы: термические (сжигание); методы глубокого окисления НДМГ с применением водных растворов, содержащих активные вещества, которые реагируют с НДМГ и в одном случае образуют нерастворимые или малорастворимые комплексы, а в другом — способствуют разложению до более простых по своему составу соединений. В основном применяют химические средства (перекись водорода, растворы марганцовокислого калия, негашеную известь), что дорого, экологически вредно и приводит к потере плодородия рекультивируемых почв. Другая разновидность методов включает использование водных растворов, содержащих активные вещества, в частности мета-нитробензойную кислоту, которая при определенных значениях pH среды образует с НДМГ комплексное соединение в виде твердой фазы. Далее, согласно предложенному методу, загрязненные НДМГ растворы подвергают термическому обезвреживанию в специальной печи. Применяют также связывание НДМГ в почве составами, содержащими гуминовые кислоты, торф, шунгит. Однако этот метод не обеспечивает очистку грунта до уровня ПДУ (0,1 мг/кг) [3].

Для детоксикации почвы и нейтрализации НДМГ на поверхности металлоконструкций, стен укрытий и т. д. применяют пероксид кальция, при разложении которого выделяется атомарный кислород, участвующий в реакции распада НДМГ. Недостатком данного способа является низкая степень очистки загрязненных участков, длительный процесс детоксикации [3].

Биологические технологии рекультивации загрязненных территорий являются наиболее предпочтительными ввиду экологической безопасности, низкой себестоимости работ и достаточно высокой эффективности, что было неоднократно продемонстрировано при решении различных экологических задач. Известно большое количество содержащих в своем составе набор бактериальных штаммов с аэробным типом дыхания биологических препаратов экологического назначения, предназначенных для биохимической деструкции и утилизации загрязнителей в основном углеводородной природы (нефти и продуктов ее промышленной переработки) [4–7]. Известны биологические способы, в основе которых

лежит метод управляемого биокомпостирования. При этом используемые биопрепараты созданы на основе микроорганизмов, для которых опасные отходы являются источником питания. При таком способе детоксикация почв не используются токсичные химические соединения, метод экологически безопасен, микроорганизмы-деструкторы после разложения НДМГ погибают из-за недостатка питания, сохраняются биологическая активность и плодородие обрабатываемой почвы [8].

В России и за рубежом все более активно используют микроорганизмы для очистки загрязненной КРТ почвы и воды. Так, на космодроме «Байконур» (Казахстан) проводят исследования по применению аборигенных почвенных микроорганизмов для разложения диметилгидразина. Их выделяют из почвы и затем выращивают в ферментерах для внесения в загрязненную почву [9]. В настоящее время имеются единичные сообщения о видах и ассоциациях микроорганизмов, способных утилизировать НДМГ. Так, разработан способ биодеструкции гептила с использованием ассоциации микроорганизмов *Acinetobacter sp.* Н-1, *Rhodococcus sp.* Н-2, *Arthrobacter sp.* Н-3 [10]. Предложен способ биологической очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов при помощи экибиопрепарата «Центрум-MMS» [11], также способного обеспечить биодеструкцию несимметричного диметилгидразина в водных растворах. Основой экибиопрепарата являются микроорганизмы видов *Pseudomonas fluorescens* ВКМ В-6847 и *Rhodococcus erythropolis* АС-1769. Однако, по данным авторов изобретения, экибиопрепарат «Центрум-MMS» не обладает способностью очищать загрязненную гептилом почву [11].

Разработка и внедрение в практику эффективных технологий биоремедиации загрязненных высокотоксичными КРТ почв крайне актуальны. В настоящее время нет готовых микробных препаратов и высокоэффективных промышленных штаммов бактерий для биоремедиации почвы от НДМГ и авиационного керосина, что и явилось основанием для проведения исследования.

Целью исследования было выделить штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ, а также изучить их эколого-токсикологическую безопасность и возможности применения для биоремедиации загрязненных почв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе многолетних экспедиционных работ по отбору загрязненных почв и последующих лабораторных исследований в НИЦ ТБП создана коллекция культур микроорганизмов, разлагающих различные токсичные химические вещества (нефтепродукты, полициклические ароматические углеводороды, минеральные масла, фенолы, полихлорированные бифенилы, этиленгликоль, гептил, авиационный керосин, пестициды, иприт, люизит, хлорорганические и фосфорорганические соединения). Для выделения штаммов микроорганизмов, разлагающих гептил и авиакеросин, использовали образцы почв из длительно загрязненных пестицидами и нефтепродуктами территорий, с участков аварийных проливов гептила и с места падения ракеты носителя «Протон-М» — комплекс Байконур, площадка 81 (Казахстан).

Для выделения микроорганизмов-деструкторов КРТ использовали метод накопительных культур и последующий высев на минимальную питательную среду, содержащую в качестве единственного источника

Таблица 1. Численность микроорганизмов-деструкторов и сапрофитной микрофлоры в динамике при проведении микробной биоремедиации почвы в лабораторных условиях, КОЕ/г почвы

Вариант	Продолжительность испытаний, сутки				
	0	7	14	21	30
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	$(3,2 \pm 0,62) \times 10^4$ < 10^3 $(1,2 \pm 0,17) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,34) \times 10^5$ < 10^3 $(2,7 \pm 0,31) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,21) \times 10^4$ < 10^3 $(3,1 \pm 0,24) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^4$ < 10^3 $(6,5 \pm 0,24) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,24) \times 10^4$ < 10^3 $(6,5 \pm 0,24) \times 10^5$
Почва + формалин + авиакеросин + микрокапсулированные микроорганизмы	$(3,3 \pm 0,54) \times 10^4$ < 10^3 $(1,0 \pm 0,12) \times 10^5$	$(1,8 \pm 0,41) \times 10^5$ < 10^3 $(1,6 \pm 0,45) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,38) \times 10^4$ < 10^3 $(4,5 \pm 0,34) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,24) \times 10^4$ < 10^3 $(7,2 \pm 0,54) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,24) \times 10^4$ < 10^3 $(7,2 \pm 0,48) \times 10^5$
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	< 10^3 – $(1,6 \pm 0,48) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,44) \times 10^4$ – $(4,2 \pm 0,61) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,41) \times 10^5$ – $(1,4 \pm 0,37) \times 10^5$	$(2,4 \pm 0,45) \times 10^4$ – $(6,5 \pm 0,59) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,44) \times 10^4$ – $(8,5 \pm 0,24) \times 10^5$
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	– – $(1,5 \pm 0,24) \times 10^5$	– – $(4,5 \pm 0,54) \times 10^5$	– – $(3,8 \pm 0,24) \times 10^5$	– – $(2,5 \pm 0,45) \times 10^5$	– – $(6,5 \pm 0,44) \times 10^6$
Почва чистая (контроль)	– – $(2,7 \pm 1,2) \times 10^6$	– – $(3,2 \pm 0,26) \times 10^6$	– – $(4,3 \pm 0,18) \times 10^6$	– – $(5,4 \pm 0,24) \times 10^6$	– – $(3,4 \pm 0,24) \times 10^6$

Примечание: в колонках приведены показатели для штамма 5Г, штамма 62М/3, сапрофитов почвы.

углерода формальдегид (продукт первичной деструкции гептила) или авиационный керосин [12].

Чистые культуры выделенных микроорганизмов идентифицировали методом МАЛДИ во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пушкино; Россия).

Биомассу микроорганизмов-деструкторов КРТ для лабораторных и полевых экспериментов наращивали на термостатируемой качалке Certomats-BS1 (Sartorius; Швеция) до выхода культуры на стационарную фазу роста (24–48 ч в зависимости от штамма) при температуре 28 °С и скорости 180 об./мин.

В качестве референс-штамма использовали штамм бактерии *Rhodococcus globerulus* 19Ф — биодеструктора НДМГ (гептила) [13].

В лабораторных и полевых экспериментах использовали дерново-подзолистую почву.

Микробную суспензию обрабатывали микрокапсулами на основе полимочевины (ООО «БНТ»; Россия).

Интегральную (суммарную) токсичность проб воды и почвы оценивали на лабораторной культуре рачка *Daphnia magna*, культивируемой в НИЦ ТБП в климатостате. Биотестирование проводили в соответствии с методиками [14, 15].

Определение интегральной токсичности почв проводили биолюминесцентным методом с использованием бактериального теста «Эколюм» (МГУ; Россия) на приборе «Биотокс-10М» (МГУ; Россия) согласно методическим рекомендациям [16, 17].

При определении дегидрогеназной активности почвы в качестве субстрата использовали бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый. Общую гидролазную активность почвы изучали по реакции гидролиза флуоресцеин диацетата. Для оценки целлюлозоразлагающей способности почвы применяли аппликационный метод [18].

Фитотоксичность образцов почвы определяли тестированием на семенах овса по методу О. А. Берестецкого [19].

Содержание авиационного керосина определяли с помощью анализатора нефтепродуктов, инфракрасного спектрометра КН-2 («Новолаб»; Россия) согласно методике [20].

Исследования патогенности (безопасности) микроорганизмов-деструкторов КРТ выполняли в соответствии с методическими указаниями МЗ СССР № 2620-82, № 4263-87 с учетом рекомендаций Всемирной организации здравоохранения [21–23]. Исследования включали в себя изучение вирулентности, токсичности,

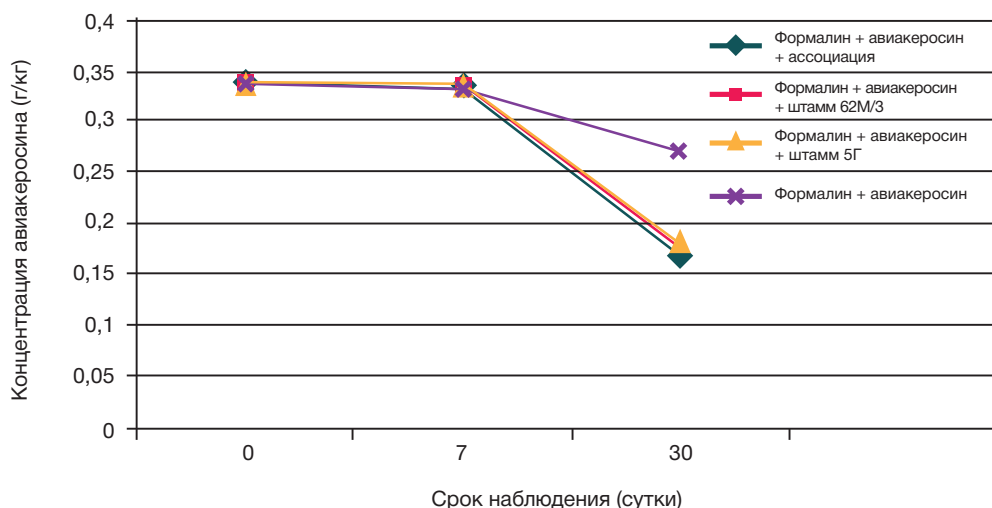


Рис. 1. Разложение авиакеросина микроорганизмами-деструкторами в динамике в лабораторных экспериментах, г / кг почвы

Таблица 2. Определение острой токсичности почвы для дафний во время микробной деструкции формалина и авиакеросина в лабораторных экспериментах

Вариант опыта	Число выживших дафний, <i>n</i>		Гибель дафний, % от контроля	Оказывает/не оказывает острое токсическое действие
	в контроле	в опыте		
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин	30	0	100	Оказывает
Через 7 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	13	57	Оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	18	40	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	8	74	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 14 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	20	33	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	18	40	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	8	74	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 21 сутки				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	18	40	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	15	50	Оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	8	74	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 30 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	30	0	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	29	3	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	15	50	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает

токсигенности и диссеминации во внутренних органах белых мышей и крыс.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel 7.0 (Microsoft; США) и Statistica 10.0 (StatSoft; США). Экспериментальные данные представляли в виде средних арифметических величин и их доверительных интервалов, рассчитанных с вероятностью 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение микроорганизмов-деструкторов КРТ из загрязненной почвы

Микроорганизмы-деструкторы гептила выделяли из образцов почв, загрязненных НДМГ. Всего было получено более 100 микробных изолятов. Затем микроорганизмы пересеивали на минимальную среду с формальдегидом в градиенте концентрации от 0 до 500 мг/л, длительное время культивировали (до 10 суток), наблюдая за ростом. Штаммы 2Г, 4Г, 5Г, Г8/2, Y-21 были способны расти при

концентрации формальдегида 200 мг/л; референс-штамм 19Ф и штамм Г-803 росли при концентрации 100 мг/л; штаммы 19 С/1 и 37М/1 сохраняли жизнеспособность при концентрации 80 мг/л.

Микроорганизмы-деструкторы авиакеросина выделяли из загрязненных нефтепродуктами почв с территорий аэропортов, нефтебаз, автомобильных заправок. Из 34 полученных изолятов были отобраны шесть наиболее активных штаммов бактерий, растущих на минимальной питательной среде, содержащей 5% дизельного топлива. По результатам проведенных дальнейших лабораторных исследований были выбраны три наиболее активных штамма-деструктора авиакеросина — 12Р, 37М/1 и 62М/3.

По результатам лабораторных исследований на загрязненной почве и оценки параметров роста микроорганизмов на питательной среде для дальнейших экспериментов по созданию ассоциации биодеструкторов КРТ были отобраны штаммы *Pseudomonas putida* 5Г (НДМГ) и *Rhodococcus erythropolis* 62М/3 (авиакеросин). Ассоциация микроорганизмов-деструкторов активно размножалась в загрязненной КРТ почве и разлагала

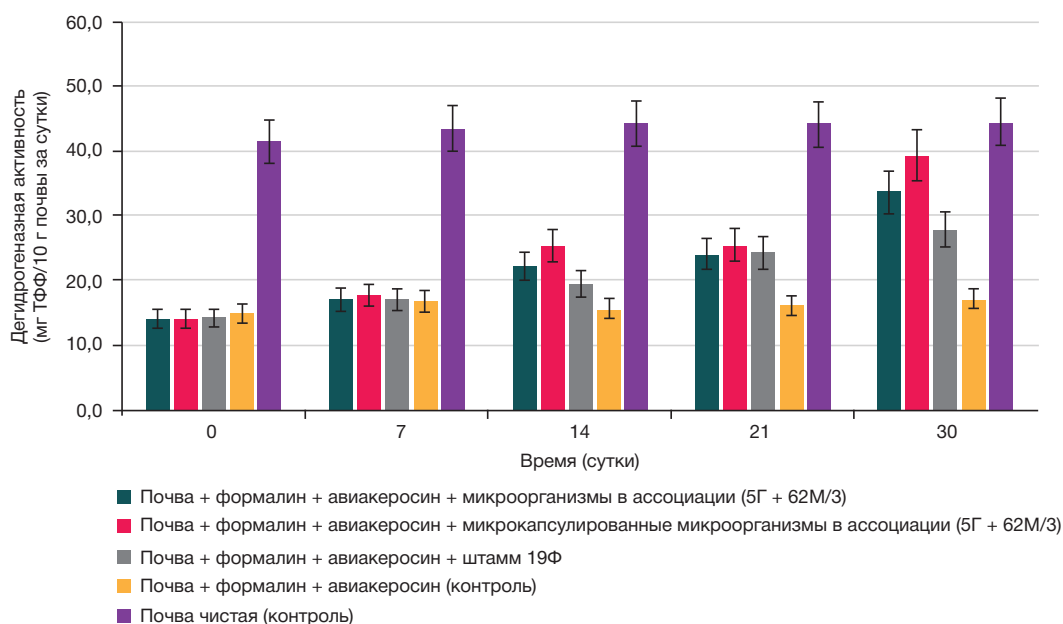


Рис. 2. Дегидрогеназная активность загрязненной формалином (0,05%) и авиакеросином (0,1%) почвы в ходе микробной биоремедиации в лабораторных экспериментах

эти токсиканты. Интегральная токсичность загрязненной гептилом и авиакеросином почвы после обработки ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ постепенно снижалась до безопасного уровня, при этом повышалась ее ферментативная активность.

Токсикологические исследования выделенных штаммов микроорганизмов-деструкторов КРТ на лабораторных животных

Исследования патогенности микроорганизмов-деструкторов гептила *Ps. putida* 5Г и авиакеросина *Rh. erythropolis* 62M/3 включали в себя изучение вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации во внутренних органах беспородных белых мышей и крыс. Устанавливали также степень проявления раздражающего действия этих бактерий на слизистую оболочку глаз кроликов.

Вирулентность изучали при однократном введении бактерий внутрижелудочно и внутрибрюшинно белым мышам и крысам. К концу срока наблюдения все

опытные животные были живы. Клиническое состояние, потребление корма и воды у животных соответствовали показателям физиологической нормы. Установлено, что при внутрижелудочном введении *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62M/3 показатель ЛД₅₀ для крыс и мышей превышал 10⁹ микробных клеток, а при внутрибрюшинном ЛД₅₀ превышала 10⁸ микробных клеток.

Токсичность изучали при внутрибрюшинном введении белым мышам взвесей суточных культур исследуемых штаммов. К концу срока наблюдения все животные опытной группы были живы. Клиническое состояние, потребление корма и воды у животных соответствовали показателям физиологической нормы. Показано, что испытанные штаммы *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62M/3 не были токсичны для теплокровных животных.

Токсигенность определяли путем внутрибрюшинного и внутрижелудочного введения белым мышам фильтратов 3- и 7-суточных бульонных культур исследуемых штаммов. К концу срока наблюдения все животные были живы. Клиническое состояние, потребление корма и воды у

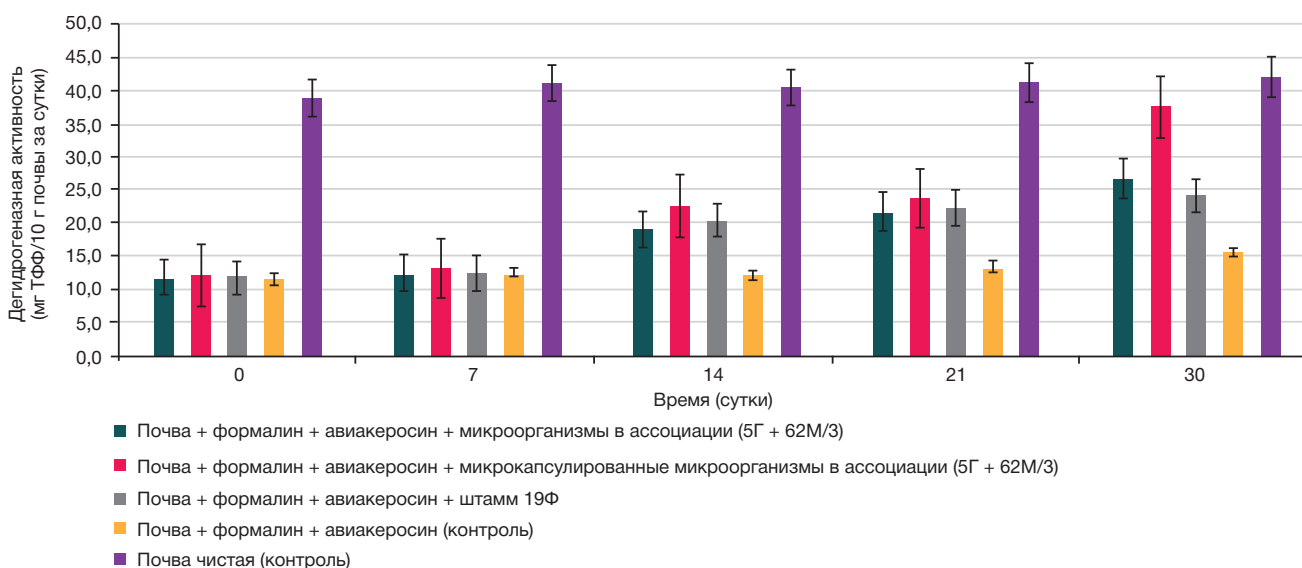


Рис. 3. Гидролазная активность загрязненной формалином и авиакеросином почвы в ходе микробной биоремедиации в лабораторных экспериментах

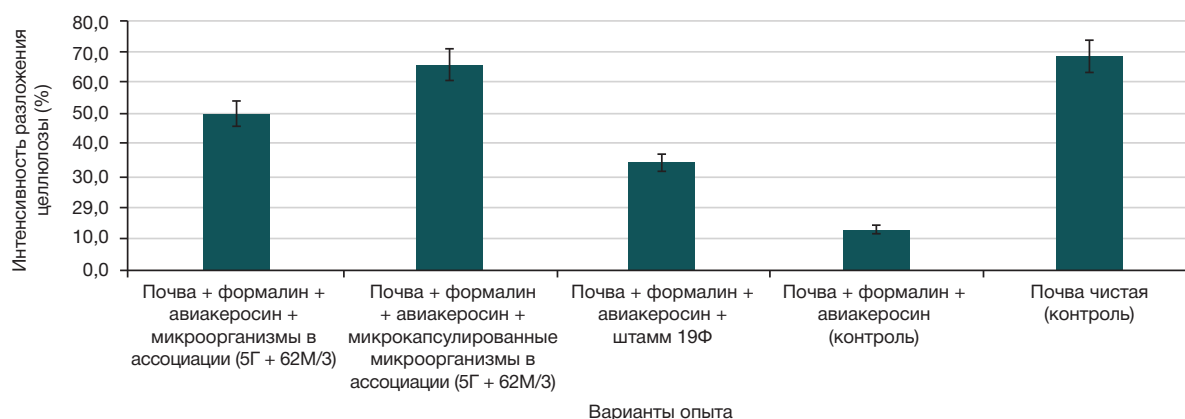


Рис. 4. Гидролазная активность загрязненной формалином и авиакеросином почвы в ходе микробной биоремедиации в лабораторных экспериментах

животных соответствовали показателям физиологической нормы, признаков проявления токсических эффектов у животных отмечено не было. Таким образом, испытанные штаммы микроорганизмов-деструкторов *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 не токсичны для теплокровных животных.

Чтобы исследовать диссеминацию во внутренних органах животных, заражение белых мышей и крыс выделенными штаммами проводили внутрижелудочно и внутрибрюшинно. К концу срока наблюдения гибели животных отмечено не было. При патологоанатомическом вскрытии различия между органами животных опытных и контрольных групп не установлены. Органы грудной и брюшной полостей имели анатомически правильное расположение и нормальную макроструктуру, патологических изменений на макроуровне не обнаружено. Роста культур микроорганизмов в высевах из органов животных не наблюдали. Следовательно, по данным высевов отпечатков органов, изученные штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ не способны к диссеминации и не вызывают бактериального поражения органов теплокровных животных.

При изучении раздражающего действия на слизистую оболочку глаза через 4 ч после внесения микробной суспензии *Ps. putida* 5Г или *Rh. erythropolis* 62М/3 в

конъюнктивный мешок глаза кроликов и на протяжении всего периода наблюдения признаков раздражающего действия выявлено не было. У всех животных состояние глаза, в который вносили бактерии, не отличалось от контрольного. Проведенные исследования показали, что бактерии *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 не обладают раздражающим действием на слизистую оболочку глаз теплокровных животных.

Таким образом, в результате токсикологических исследований по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсичности установлено, что микроорганизмы-деструкторы формальдегида (гептила) *Ps. putida*, штамм 5Г, и авиакеросина *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, являются непатогенными (безопасными) для теплокровных животных. Микроорганизмы безопасны и могут применяться для биоремедиации загрязненных почв без ограничений.

Определение основных параметров и режимов культивирования микроорганизмов-деструкторов в ферментационной установке

Отобранные нами штаммы *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 имеют различную родовую принадлежность. В связи

Таблица 3. Фитотоксичность загрязненной формалином и авиакеросином почвы для семян овса после биоремедиации почвы в лабораторных экспериментах

Вариант опыта	Вид измерения	Единица измерения	Среднее арифметическое показателей (M ± 6)	Число семян в повторности, n	Число повторностей
Почва + формалин + авиакеросин (отрицательный контроль)	Корни	мм	34,0 ± 23,9	25	3
	Проростки	мм	46,5 ± 30,0		
	Вес (корни и проростки)	г	3,5 ± 0,1		
	Число непроросших семян	n	16		
Почва (контроль)	Корни	мм	62,0 ± 30,0	25	3
	Проростки	мм	45,0 ± 24,6		
	Вес (корни и проростки)	г	4,0 ± 0,4		
	Число непроросших семян	n	7		
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация 5Г+62М/3	Корни	мм	30,5 ± 22,8	25	3
	Проростки	мм	58,0 ± 39,1		
	Вес (корни и проростки)	г	3,3 ± 0,7		
	Число непроросших семян	n	11		

Примечание: М — среднее арифметическое, 6 — стандартное отклонение.

Таблица 4. Численность интродуцированных в почву микроорганизмов и сапрофитной микробиоты в динамике в полевом эксперименте, КОЕ/г

Вариант	Продолжительность испытаний, сутки					
	0	7	14	30	45	60
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	$(2,4 \pm 0,24) \times 10^5$ $(2,6 \pm 0,28) \times 10^5$ $(5,0 \pm 0,31) \times 10^4$	$(5,9 \pm 0,48) \times 10^6$ $(6,5 \pm 0,55) \times 10^6$ $(2,7 \pm 0,28) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,26) \times 10^6$ $(1,2 \pm 0,27) \times 10^6$ $(1,2 \pm 0,14) \times 10^6$	$(1,2 \pm 0,17) \times 10^6$ $(8,3 \pm 1,03) \times 10^5$ $(1,5 \pm 0,37) \times 10^6$	$(6,0 \pm 0,68) \times 10^5$ $(3,7 \pm 0,34) \times 10^5$ $(9,0 \pm 0,17) \times 10^6$	$(3,0 \pm 0,75) \times 10^5$ $(1,9 \pm 0,20) \times 10^5$ $(1,1 \pm 0,45) \times 10^6$
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	– – $(2,3 \pm 0,41) \times 10^4$	– – $(3,2 \pm 0,24) \times 10^5$	– – $(2,1 \pm 0,21) \times 10^5$	– – $(2,0 \pm 0,31) \times 10^5$	– – $(7,6 \pm 0,27) \times 10^5$	– – $(6,54 \pm 0,48) \times 10^5$
Почва чистая (контроль)	– – $(1,2 \pm 0,45) \times 10^6$	– – $(2,4 \pm 0,48) \times 10^6$	– – $(2,8 \pm 0,34) \times 10^6$	– – $(3,2 \pm 0,21) \times 10^7$	– – $(2,3 \pm 0,48) \times 10^6$	– – $(6,4 \pm 0,25) \times 10^6$

Примечание: в колонках приведены показатели для штамма 5Г, штамма 62М/3, сапрофитов почвы.

с этим была изучена возможность их совместного роста на агаризованной среде (перекрестный посев) на чашках Петри. Угнетения роста при совместном выращивании штаммов не наблюдалось.

Определены основные параметры и режимы культивирования штаммов-деструкторов КРТ *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 на различных питательных средах. Оптимальный режим культивирования штаммов составил 28 °С в течение 24 ч.

Эффективность деструкции 0,05% формалина и 0,1% авиакеросина в почве ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ в лабораторных условиях

Исследования микробной биоремедиации почвы от загрязнения КРТ проводили в лабораторных условиях в пластиковых стаканах емкостью 0,5 л. Рабочие концентрации загрязнителя в почве создавали путем внесения растворов 0,05% (или 500 мг/кг) формалина

Таблица 5. Интегральная токсичность почвы для дафний в полевом эксперименте

Вариант опыта	Число выживших дафний, <i>n</i>		Гибель дафний, % от контроля	Оказывает/не оказывает острое токсическое действие
	в контроле (вода)	в опыте		
Исходная				
Почва + формалин + авиакеросин	30	10	67	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 7 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	20	33	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	14	54	Оказывает
Через 14 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	25	17	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	16	53	Оказывает
Через 30 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	27	10	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	15	50	Оказывает
Через 45 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	27	10	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	14	46	Не оказывает
Через 60 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	30	0	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	20	33	Не оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает

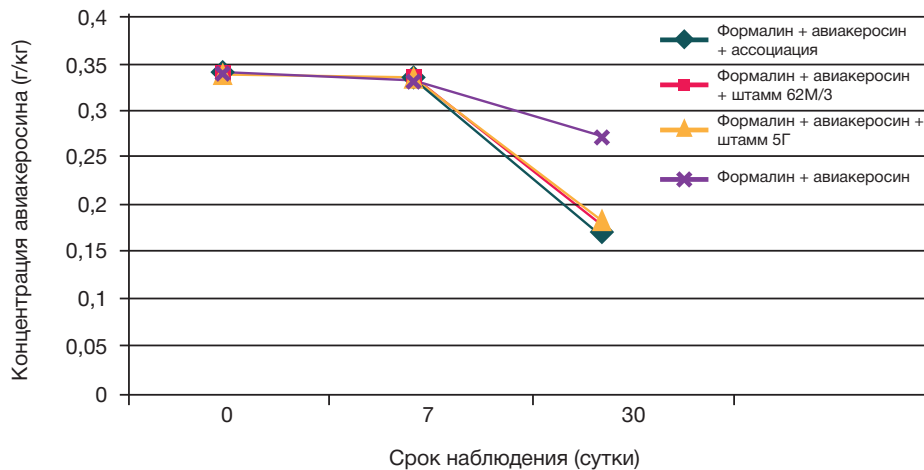


Рис. 5. Концентрация авиакеросина в почве в динамике в ходе полевого эксперимента, г/кг почвы

(имитатор гептила, продукт его первичного разложения) и 0,1% (или 1000 мг/кг) авиационного керосина.

Пробы почвы для проведения химических анализов и определения токсичности отбирали до внесения микроорганизмов-деструкторов, через 7, 14, 21 и 30 суток (по окончании эксперимента).

В процессе эксперимента проводили целый комплекс исследований, в том числе определение концентрации авиакеросина, интегральной токсичности почвы на дафниях, концентраций микроорганизмов-деструкторов и почвенной микрофлоры, дегидрогеназной, гидролазной и целлюлозоразлагающей активности, фитотоксичности для семян овса.

Изучение микробной обсемененности почвы показало, что численность микроорганизмов-деструкторов гептила и авиационного керосина сохранялась в почве в течение всего срока биоремедиации, их подавляла сапрофитная микрофлора (табл. 1). Численность сапрофитной микробиоты почвы во время всего эксперимента оставалась практически на одном уровне (табл. 1).

В ходе микробной ремедиации концентрация загрязнителя в почве постепенно снижалась (рис. 1).

Биотестированием на дафниях определена интегральная токсичность загрязненной почвы до и

после обработки микроорганизмами-деструкторами. До обработки загрязненная авиакеросином и формалином почва вызывала гибель 100% дафний. После 14 суток микробной ремедиации токсичность почвы снижалась до безопасного уровня (табл. 2).

Определена ферментативная активность загрязненной почвы (дегидрогеназная, гидролазная и целлюлазная) до и после обработки микроорганизмами-деструкторами. Загрязнение почвы авиакеросином и формалином вызывало снижение ферментативной активности. После 30 суток микробной ремедиации ферментативная активность почвы постепенно повышалась (рис. 2–4).

В ходе микробной ремедиации фитотоксичность почвы значительно снизилась, а по показателям «Длина проростков» и «Число непроросших семян» приблизилась к уровню условно-чистой почвы (табл. 3).

Полевые испытания микробной деструкции формалина и авиакеросина в почве ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ

Изучение микробной деструкции гептила и авиакеросина в почве проводили в полевых условиях на экспериментальных делянках. Рабочие концентрации загрязнителя в

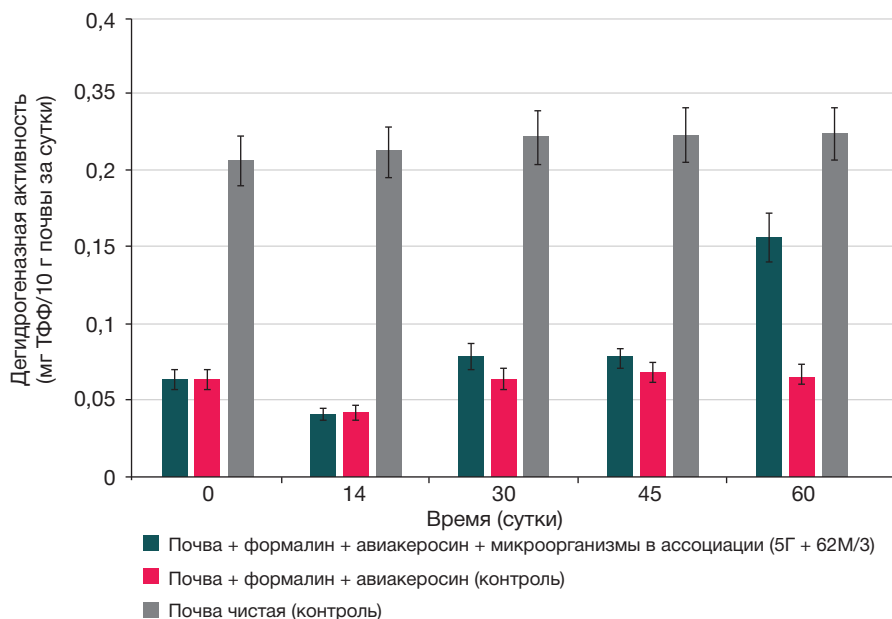


Рис. 6. Дегидрогеназная активность почвы в полевом эксперименте

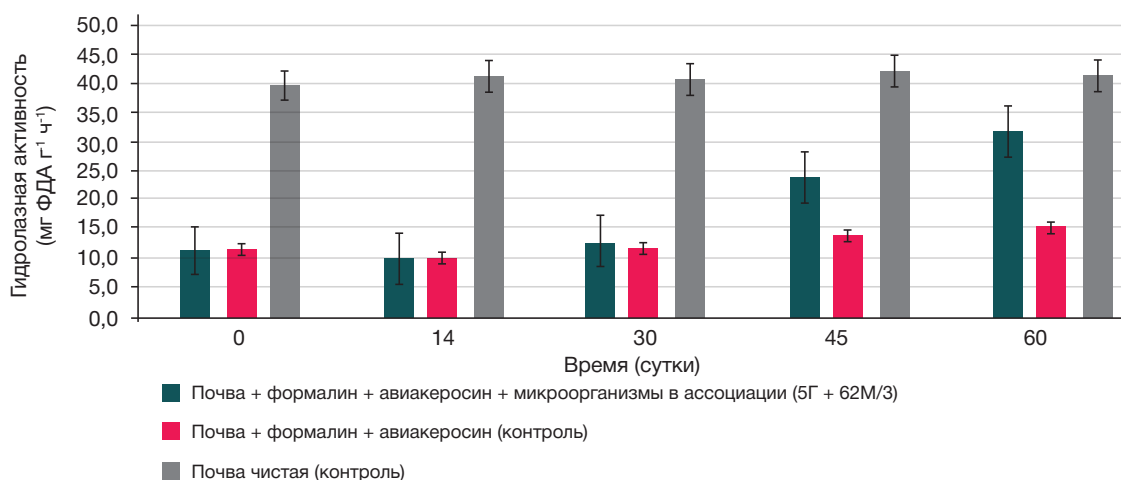


Рис. 7. Гидролазная активность почвы в полевом эксперименте

почве создавали путем внесения 0,1% формалина и 0,1% авиакеросина. Микробную ассоциацию штаммов-деструкторов *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 вносили в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл из расчета 1 л/м² почвы. Отбор проб почвы для исследований проводили в течение 60 суток. Экстракт из почвенных образцов высевали на чашки Петри с гидролизатом рыбной муки и формалином (100 мг/л) для штамма 5Г, на чашки Петри с минимальной солевой средой и 1% дизельного топлива для штамма 62М/3. Концентрацию сапрофитных (аборигенных) бактерий определяли на среде ГРМ.

В ходе полевого эксперимента проводили комплекс исследований, а именно определение в почве концентрации авиакеросина, интегральной токсичности почвы на дафниях, численности микроорганизмов-деструкторов и почвенной микробиоты (табл. 4), дегидрогеназной, гидролазной и целлюлозоразлагающей активности, фитотоксичности.

Исходная численность обоих штаммов (после внесения в почву) находилась на уровне 10^5 КОЕ/г почвы, почвенных сапрофитов — на уровне 10^4 КОЕ/г почвы. Максимальная численность бактерий наблюдалась на 7-е сутки: она составила $(5,9 \pm 0,48) \times 10^6$ КОЕ/г почвы для штамма 5Г, $(6,5 \pm 0,55) \times 10^6$ КОЕ/г почвы для штамма 62М/3. Начиная с 45-х суток происходило небольшое снижение численности биодеструкторов в связи с разложением ими загрязняющих веществ в почве и соответствующим

уменьшением необходимых для их существования питательных субстратов. Численность сапрофитных бактерий в загрязненной почве достигла максимальных значений на 60-е сутки опыта. В чистой почве численность сапрофитных микроорганизмов оставалась практически на одном уровне в течение всего эксперимента.

Обработанная формалином и авиакеросином почва в начале эксперимента обладала высокой токсичностью для дафний (табл. 5). В ходе эксперимента обработанная микроорганизмами загрязненная почва стала нетоксичной к 7-м суткам.

Концентрация авиационного керосина в почве во время биоремедиации постепенно снижалась (рис. 5).

Ферментативная активность почвы во время биоремедиации претерпела значительные изменения (рис. 6–8).

Как показали результаты исследований, при внесении формалина и авиакеросина биологическая активность почвы значительно снизилась. Так, дегидрогеназная и гидролазная активности почвы на 7-е сутки полевого эксперимента составили 19 и 24% соответственно в исследуемых вариантах по сравнению с чистой почвой (контроль). Начиная с 30-х суток эксперимента наблюдалось увеличение биологической активности в загрязненной почве, обработанной микроорганизмами-деструкторами. Через 60 суток показатели ферментативной активности почвы существенно превышали аналогичные показатели

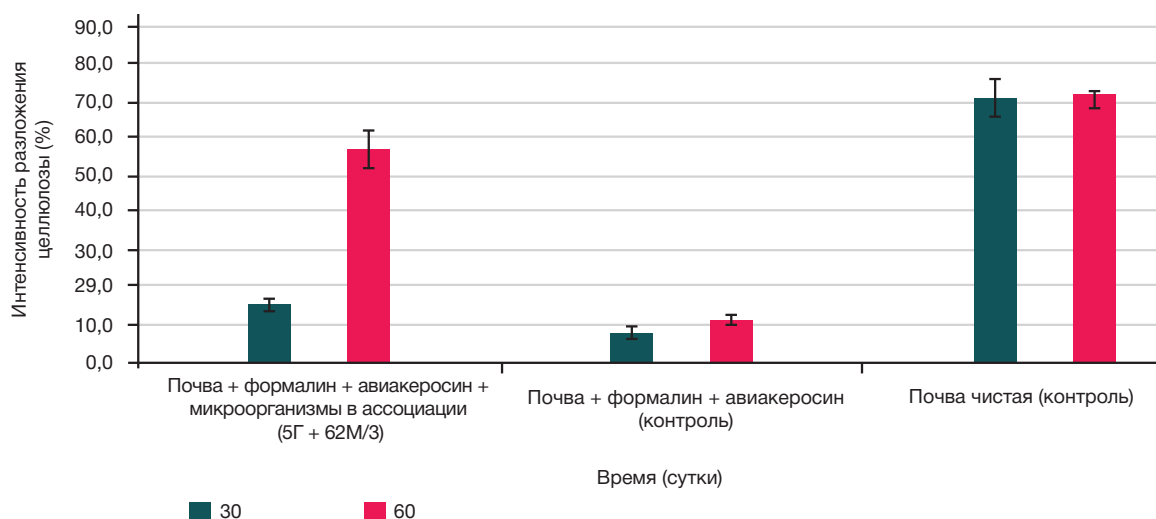


Рис. 8. Целлюлазная активность (%) в почве в полевом эксперименте

Таблица 6. Фитотоксичность почвы для семян овса на 60-е сутки полевого эксперимента

Варианты опыта	Вид измерения	Единица измерения	Среднее арифметическое показателей (M ± 6)	Число семян в повторности, n	Число повторностей
Контроль (чистая почва)	Корни	мм	76,9 ± 45,3	25	3
	Проростки	мм	49,8 ± 18,7		
	Вес (корни и проростки)	г	4,2 ± 0,1		
	Число непроросших семян	n	6		
Почва + формалин + авиакеросин	Корни	мм	72,2 ± 37,3	25	3
	Проростки	мм	46,2 ± 16,9		
	Вес (корни и проростки)	г	3,9 ± 0,1		
	Число непроросших семян	n	14		
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	Корни	мм	78,4 ± 29,0	25	3
	Проростки	мм	53,4 ± 20,4		
	Вес (корни и проростки)	г	4,4 ± 0,1		
	Число непроросших семян	n	7		

Примечание: М — среднее арифметическое, 6 — стандартное отклонение.

в загрязненной почве без микробной ремедиации: дегидрогеназная активность почвы — в 2,4, гидролазная — в 2,1, целлюлазная — в 5,1 раза.

В ходе полевого эксперимента определена фитотоксичность загрязненной формалином и авиационным керосином почвы. К 60-м суткам выявлено снижение фитотоксичности рекультивированной почвы для семян овса по показателям «Длина проростков и корней», «Число непроросших семян» до уровня чистой почвы (табл. 6).

В ходе полевого эксперимента выявлено снижение острой токсичности и фитотоксичности очищаемой почвы, повышение ее биологической активности (уровни дегидрогеназ, гидролаз, целлюлаз).

Микроорганизмы-деструкторы КРТ *Ps. putida* штамм 5Г и *Rh. erythropolis* штамм 62М/3 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами ВКМ Ас-2933D и ВКМ В-3636 D.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено выделение из почв, длительное время загрязненных диметилгидразином и авиационным керосином, микроорганизмов, способных разлагать эти вещества. В ходе лабораторных исследований отобраны два наиболее активных штамма микроорганизмов — биодеструктора формальдегида (гептила) *Ps. putida*, штамм 5Г, и биодеструктора авиакеросина *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3. Отработаны режимы их раздельного и совместного культивирования.

По результатам токсикологических исследований на белых мышах и крысах, по показателям вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации установлено, что *Ps. putida*, штамм 5Г, и *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, являются непатогенными (безопасными) для теплокровных животных. Микроорганизмы можно применять для биоремедиации загрязненных почв без ограничений.

Результаты лабораторных экспериментов показали, что обработка загрязненной формалином и авиационным керосином почвы ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ в течение 30 суток приводит к снижению загрязнения почвы, уменьшению ее интегральной токсичности и фитотоксичности. В ходе микробной ремедиации ферментативная активность почвы постепенно повышалась до уровня незагрязненной почвы.

Результаты полевого эксперимента показали, что ассоциация микроорганизмов, состоящая из биодеструктора формалина (гептила) *Ps. putida*, штамм 5Г, и биодеструктора авиакеросина *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, пригодна для очистки почв, загрязненных КРТ. Внесенные в загрязненную почву микроорганизмы-деструкторы КРТ не подавляются аборигенной микрофлорой и активно размножаются.

Выделенные штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ можно без ограничений применять на российских космодромах и «Байконуре» (Казахстан) для очистки загрязненных территорий.

Осуществление комплекса мероприятий по детоксикации загрязненной КРТ почвы позволит снизить риск возникновения профпатологий у работников, занятых на работах по биоремедиации почвы и при утилизации ракетной техники.

ВЫВОДЫ

Результаты лабораторных и полевых испытаний ассоциации микроорганизмов-деструкторов компонентов ракетных топлив (КРТ) *Pseudomonas putida*, штамм 5Г, и *Rhodococcus erythropolis*, штамм 62М/3, показали ее высокую эффективность в очистке от КРТ и экологотоксикологическую безопасность. Ассоциацию микроорганизмов *Ps. putida*, штамм 5Г, и *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, можно рекомендовать для практического применения — биоремедиации загрязненной КРТ почвы.

Литература

1. Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ. 1,1-диметилгидразин. Регистрационный номер ВТ-002431. Available from: <https://www.rpohv.ru/online/detail.html?id=2431>.
2. Петрова З. М., Остапенко Н. С., Бойцова Л. В. Миграция несимметричного диметилгидразина и его производных при рекультивации загрязненных почв. Почвоведение. 1999; 12: 1502–8.
3. Пимкин В. Г., Качин В. Г. Методы и средства локализации и обезвреживания КРТ в окружающей среде. СПб.: Изд-во РНЦ прикладной химии, 1992; 184 с.
4. Емельянова Е. К., Алексеев А. Ю., Мокеева А. В. Биорекультивация загрязненных нефтью объектов в Тюменской области. Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2010; 8 (4): 155–61.
5. Малыгина Л. В., Шайдуллина И. А., Антонов Н. А. Применение биопрепарата «Гумакс» и аборигенных штаммов микроорганизмов-деструкторов нефти в сочетании с нанобентонитом для рекультивации типичных и выщелоченных черноземов со смешанным типом нефтезагрязнения. Сборник научных трудов ТатНИПнефть ПАО «Татнефть». М., 2016; с. 298–307.
6. Олискевич В. В., Талаловская Н. М., Третьякова С. Э. Оптимизация технологии биоремедиации сельскохозяйственных земель, загрязненных гербицидом «Гезагард». Известия Саратовского университета. Серия: Химия. Биология. Экология. 2013; 13 (2): 101–7.
7. Четвериков С. П. Микробиологические методы рекультивации нефтезагрязненных земель. Уральский экологический вестник. 2012; 4 (33): 34–5.
8. Пимкин В. Г., Сулима Т. А., Софьин А. П. Деактивация почв после аварийных и технологических проливов НДМГ. В сборнике: Экологические аспекты воздействия компонентов жидких ракетных топлив на окружающую среду. Материалы научно-практической конференции. СПб.: Изд-во РНЦ прикладной химии, 1996; с. 91–104.
9. Технологический регламент на детоксикацию почв, загрязненных несимметричным диметилгидразином и продуктами его химической трансформации комбинированным методом. Национальное космическое агентство республики Казахстан. Алматы, 2012; 18 с.
10. Способ биодеструкции гептила. Патент РФ № 98102248А. 11.02.1998.
11. Забокрицкий А. А., Савиных Д. Ю., Тарабара А. В., Зорин А. Д., Забокрицкий Н. А., Занозина В. Ф. и др. Биологический деструктор несимметричного диметилгидразина. Патент РФ № 2650864. 17.04.2018.
12. Звягинцев Д. Г., редактор. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991; 304 с.
13. Жариков Г. А., Крайнова О. А., Капранов В. В., Дядищева В. П., Киселева Н. И. Штамм бактерий *Rhodococcus globerulus* 19Ф, разлагающий 1,1-диметилгидразин (гептил). Патент РФ № 2236453. 18.09.2002.
14. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06. Издание 2021 г. 16.1:2:2.2:2.3:3.9-06 ФР.1.39.2021.40207; 15 с.
15. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний ФР.1.39.2001.00283; 34 с.
16. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 Т 16.1:2:3:3.8-04. М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2010; 22 с.
17. Методика определения токсичности химических веществ, полимеров, материалов и изделий с помощью биотеста «Эколюм». Методические рекомендации N 01.018-07. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2014; 14 с.
18. Минеев В. Г., редактор. Практикум по агрохимии. 2 изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, 2001; 689 с.
19. Берестецкий О. А. Методы определения токсичности почвы. Микробиологические и биохимические исследования почв. Киев: Изд-во «Урожай», 1971; 208 с.
20. Методика измерений массовой концентрации нефтепродуктов в питьевых, поверхностных и сточных водах методом ИК-спектрометрии. ПНД Ф 14.1:2:4.5-95. М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации; 2011; 18 с.
21. Методические указания по гигиенической оценке микробиологических средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов (МУ № 2620-82). 1982; 24 с.
22. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды (МУ № 5789/1-91). 1991; 23 с.
23. Шейна Н. И. Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза. Вестник ОГУ. 2012; 6 (142): 165–9.

References

1. Rossijskij registr potencial'no opasnyh himicheskij i biologicheskij veshhestv. 1,1-dimetilgidrazin. Registracionnyj nomer VT-002431. Available from: <https://www.rpohv.ru/online/detail.html?id=2431>. Russian.
2. Petrova ZM, Ostapenko NS, Bojцова LV. Migracija nesimmetrichnogo dimetilgidrazina i ego proizvodnyh pri rekul'tivacii zagraznennyh pochv. Pochvovedenie. 1999; 12: 1502–8. Russian.
3. Pimkin VG, Kachin VG. Metody i sredstva lokalizacii i obezvrezhivaniya KRT v okruzhajushhej srede. SPb.: Izd. RNC prikladnoj himii, 1992; 184 p. Russian.
4. Emeljanova EK, Alekseev AJu, Mokeeva AV. Biorekul'tivacija zagraznennyh نفتju objektov v Tjumenskoj oblasti. Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Biologija, klinicheskaja medicina. 2010; 8 (4): 155–61. Russian.
5. Malyhina LV, Shajdullina IA, Antonov NA. Primenenie biopreparata "Gumaks" i aborigennyh shtammov mikroorganizmov-destruktorov nefiti v sochetanii s nanobentonitom dlja rekul'tivacii tipichnyh i vyshhelochennyh chernozemov so smeshannym tipom neftezagraznenija. Sbornik nauchnyh trudov TatNIPneft' PAO «Tatneft'». M., 2016; p 298–307. Russian.
6. Olskevich VV, Talalovskaja NM, Tretjakova SJ. Optimizacija tehnologii bioremediacii sel'skohozjajstvennyh zemel', zagraznennyh gerbicidom "Gezagard". Izvestija Saratovskogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Jekologija. 2013; 13 (2): 101–7. Russian.
7. Chetverikov SP. Mikrobiologicheskie metody rekul'tivacii neftezagraznennyh zemel'. Ural'skij jekologicheskij vestnik. 2012; 4 (33): 34–35. Russian.
8. Pimkin VG, Sulima TA, Sofin AP. Dezaktivacija pochv posle avariynnyh i tehnologicheskij prolivov NDMG V sbornike: Jekologicheskie aspekty vozdejstvija komponentov zhidkijh raketnyh topliv na okruzhajushhuju sredu. Materialy nauchno-prakticheskij konferencii. SPb.: Izd-vo RNC prikladnoj himii, 1996; p. 91–104.
9. Tehnologicheskij reglament na detoksikaciju pochv, zagraznennyh

- nesimmetrichnym dimetilgidrazinom i produktami ego himicheskoy transformacii kombinirovannym metodom. Nacional'noe kosmicheskoe agentstvo respubliky Kazahstan. Almaty, 2012; 18 p.
10. Sposob biodestrukcii geptila. Patent RF № 98102248A. 11.02.1998.
 11. Zabokrickij AA, Savinyh DJu, Tarabara AV, Zorin AD, Zabokrickij NA, Zanozina VF i dr. Biologicheskij destruktory nesimmetrichnogo dimetilgidrazina. Patent RF № 2650864. 17.04.2018.
 12. Zvjagincev DG, editor. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. M.: Izd-vo MGU, 1991; 304 p. Russian.
 13. Zharikov GA, Krajnova OA, Kapranov VV, Djadishheva VP, Kiseleva NI. Shtamm bakterij *Rhodococcus globerulus* 19F, razlagajushhij 1,1-dimetilgidrazin (geptil). Patent RF № 2236453. 18.09.2002.
 14. Metodika opredelenija toksichnosti vodnyh vytjazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod i othodov, pit'evoy, stochnoj i prirodnoj vody po smertnosti test-objekta *Daphnia magna* Straus. PND F T 14.1:2:3:4.12-06. Izdanie 2021 g. 16.1:2:2.2:2.3:3.9-06 FR.1.39.2021.40207; 15 p. Russian.
 15. Metodika opredelenija toksichnosti vody i vodnyh vytjazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod, othodov po smertnosti i izmeneniju plodovitosti dafnij. FR.1.39.2001.00283; 34 p. Russian.
 16. Metodika opredelenija integral'noj toksichnosti poverhnostnyh, v tom chisle morskikh, gruntovyh, pit'evykh, stochnyh vod vodnyh jekstraktov pochv, othodov, osadkov stochnyh vod po izmeneniju intensivnosti bakterial'noj bioluminescencii test-sistemoy "Jekoljum". PND F T 14.1:2:3:4.11-04 T 16.1:2:3:3.8-04. M.: Ministerstvo prirodnyh resursov Rossijskoj Federacii, 2010; 22 p. Russian.
 17. Metodika opredelenija toksichnosti himicheskikh veshhestv, polimerov, materialov i izdelij s pomoshh'ju biotesta "Jekoljum". Metodicheskie rekomendacii N 01.018-07. M.: Federal'nyj centr Gossanjepidnadzora Minzdrava Rossii, 2014; 14 p. Russian.
 18. Mineev VG, editor. Praktikum po agrohimii. 2 izd., pererab. i dop. M.: Izd-vo MGU, 2001; 689 p. Russian.
 19. Beresteckij OA. Metody opredelenija toksichnosti pochvy. Mikrobiologicheskie i biohimicheskie issledovanija pochv. Kiev: Izd-vo "Urozhaj", 1971; 208 p. Russian.
 20. Metodika izmerenij massovoj koncentracii nefteproduktov v pit'evykh, poverhnostnyh i stochnyh vodah metodom IK-spektrometrii. PND F 14.1:2:4.5-95. M.: Ministerstvo prirodnyh resursov Rossijskoj Federacii; 2011. 18 p. Russian.
 21. Metodicheskie ukazaniya po gigienicheskoj ocenke mikrobiologicheskikh sredstv zashhity rastenij ot nasekomyh i boleznij na osnove nesporoobrazujushhikh mikroorganizmov (MU № 2620-82). 1982; 24 p. Russian.
 22. Metodicheskie ukazaniya po jeksperimental'nomu obosnovaniju PDK mikroorganizmov-producentov i sodержashhikh ih gotovyh form preparatov v ob#ektah proizvodstvennoj i okruzhajushhej sredy (MU № 5789/1-91). 1991; 23 p. Russian.
 23. Sheina NI. Kriterii ocenki patogennyh svojstv shtammov-producentov, predlagaemyh dlja ispol'zovanija v promyshlennosti mikrobiologicheskogo sinteza. Vestnik OGU. 2012; 6 (142): 165–9.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭКСПЕРТИЗЫ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ У ПИЛОТОВ ГРАЖДАНСКОЙ АВИАЦИИ

И. В. Бухтияров^{1,2}, В. Б. Панкова^{3,4,5} ✉, И. Н. Федина^{1,4}, Н. А. Дайхес⁴, Н. Г. Бомштейн⁴

¹ Научно-исследовательский институт медицины труда имени Н. Ф. Измерова, Москва, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт гигиены транспорта Роспотребнадзора, Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁵ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Показатели профессиональной тугоухости представителей летных профессий гражданской авиации (ГА) преобладают в структуре профессиональных потерь слуха. Целью исследования было проанализировать ошибки в экспертно-диагностической работе с летным персоналом, имеющим потери слуха. Проведен анализ 213 заключительных диагнозов профессиональной тугоухости за период 2015–2021 гг. Экспертные ошибки выявлены в 73% случаев. Описаны наиболее часто встречающиеся типичные ошибки, которые были явно выражены в 12-ти случаях, представленных на судебно-медицинскую экспертизу. Основными ошибками были некорректная оценка параметров внутрикабинного шума, незнание особенностей клинико-аудиологической картины «шумовой» тугоухости, неправильная оценка аудиологических показателей, недоучет роли коморбидной патологии и др. По результатам исследования установлено, что высокий удельный вес показателей заболеваемости профессиональной тугоухостью у лиц летного состава ГА в значительной степени обусловлен несовершенством экспертных решений, связанным с незнанием базовых критериев диагностики и связи потерь слуха, вызванных шумом, с профессией. Не были учтены основные требования проведения экспертизы связи потерь слуха, вызванных шумом, с профессией и вопросы профессиональной пригодности, изложенные в действующих нормативно-регламентирующих документах Минздрава РФ и основополагающих публикациях. Имел место недоучет опорных моментов экспертной работы по вопросам связи заболевания органа слуха с профессией у представителей летного состава ГА, который приводил к необоснованной потере профессиональной пригодности, инвалидизации работников в трудоспособном возрасте, экономическим потерям.

Ключевые слова: пилоты гражданской авиации, профессиональная нейросенсорная тугоухость, экспертиза, профессиональная пригодность

Вклад авторов: И. В. Бухтияров — концепция исследования, научное руководство, обсуждение и анализ материалов; В. Б. Панкова — научное руководство, формулировка цели и задач исследования, проведение судебно-медицинских экспертиз, принятие экспертных решений, обсуждение и анализ заключительных диагнозов, написание статьи; И. Н. Федина — проведение судебно-медицинских экспертиз, принятие экспертных решений, обсуждение и анализ заключительных диагнозов, написание статьи; Н. А. Дайхес — концепция исследования, научное руководство, обсуждение и анализ материалов; Н. Г. Бомштейн — проведение судебно-медицинских экспертиз, принятие экспертных решений, обсуждение и анализ заключительных диагнозов, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Вера Борисовна Панкова
Пакгаузное шоссе, д. 1, корп. 1, г. Москва, 125438, Россия; pankova@vniijg.ru

Статья получена: 02.07.2022 **Статья принята к печати:** 17.07.2022 **Опубликована онлайн:** 31.07.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.025

CURRENT ISSUES OF THE OCCUPATIONAL SENSORINEURAL HEARING LOSS EVALUATION IN AIRLINE PILOTS

Bukhtiyarov IV^{1,2}, Pankova VB^{3,4,5} ✉, Fedina IN^{1,4}, Daikhes NA⁴, Bomshtein NG⁴

¹ Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

³ Russian Scientific Research Institute of Railway Hygiene, Moscow, Russia

⁴ National Medical Research Center for Otorhinolaryngology of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁵ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Occupational hearing loss in the civilian flight crew members prevails in the structure of occupational hearing loss. The study was aimed to assess errors made in forensic evaluation of flight personnel with hearing loss. A total of 213 definitive diagnoses of occupational hearing loss established in 2015–2021 were assessed. Expert errors were found in 73% of cases. The most common, typical errors were reported that were evident in 12 cases submitted for forensic evaluation. The main errors were as follows: incorrect assessment of the parameters of noise inside the aircraft cabin, lack of knowledge about the clinical and audiological features of noise-induced hearing loss, incorrect assessment of audiological indicators, underestimation of the role of comorbidities, etc. The findings showed that high proportion of occupational hearing loss in the civilian flight crew members was in large part due to imperfection of expert solutions resulting from the lack of knowledge about the basic criteria of the diagnosis and the relationship between the noise-induced hearing loss and profession. The major requirements for evaluation of the relationship between the noise-induced hearing loss and profession and the issues related to professional suitability set out in the current regulatory documents issued by the Ministry of Health of the Russian Federation and seminal publications were not taken into account. The cornerstones of expert work on the issues of the relationship between the hearing organ disorder and profession in the civilian flight crew members were underestimated. This resulted in unsubstantiated professional unsuitability, disability among working-age people, and economic losses.

Keywords: airline pilots, occupational sensorineural hearing loss, expertise, professional suitability

Author contribution: Bukhtiyarov IV — study concept, scientific management, discussion and data analysis; Pankova VB — scientific management, statement of the goal and objectives of the study, forensic evaluations, expert solutions, discussion and analysis of definitive diagnosis, manuscript writing; Fedina IN — forensic evaluations, expert solutions, discussion and analysis of definitive diagnosis, manuscript writing; Daikhes NA — study concept, scientific management, discussion and data analysis; Bomshtein NG — forensic evaluations, expert solutions, discussion and analysis of definitive diagnosis, manuscript writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vera B. Pankova
Pakgauznoye shosse, 1, korp. 1, Moscow, 125438, Russia; pankova@vniijg.ru

Received: 02.07.2022 **Accepted:** 17.07.2022 **Published online:** 31.07.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.025

В настоящее время в Российской Федерации (РФ) наблюдается устойчивая тенденция к регистрации высоких показателей профессиональной нейросенсорной тугоухости, занимающей первое место в структуре профессиональной заболеваемости работников, а также составляющей более половины всех профессиональных заболеваний, вызываемых физическими факторами рабочей среды (см. рис.).

В свою очередь, среди всего объема профессиональной тугоухости практически треть заболеваний регистрируют у представителей летных профессий воздушных судов гражданской авиации (ВС ГА) [2–4].

Подобная тенденция вызывает тревогу у медицинских работников и работодателей, так как гражданская авиация представляет собой одну из ведущих экономических отраслей страны. Слуховая функция членов летных экипажей имеет важное профессиональное значение для медицинского обеспечения безопасности полетов [5]. Следует заметить, что, несмотря на использование одних и тех же видов воздушных судов, эта проблема практически полностью отсутствует в мире [6–7].

На протяжении более 20 лет парк ВС ГА РФ на 80% представлен авиалайнерами зарубежного производства, уровни шума в кабинах которых не превышают установленные в России санитарно-гигиенические нормативы, то есть отсутствует прямой априорный риск повреждающего воздействия шума на орган слуха пилотов [8]. Вместе с тем, по данным зарубежных авторов, у пилотов военно-воздушных сил даже при уровне шума 90–100 дБА отсутствует повышение порогов слуха [9].

Целью исследования было проанализировать ошибки в экспертно-диагностической работе с летным персоналом, имеющим потери слуха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группой экспертов, в которую вошли главный профпатолог Минздрава России (МЗ РФ), главный оториноларинголог МЗ РФ, два оториноларинголога-сурдолога высшей категории, имеющие специализацию по профпатологии, руководитель НКО профпатологии ЛОР-органов, профпатолог высшей категории, проведен экспертный анализ 213 заключительных диагнозов профессиональной

тугоухости, установленных в 2015–2021 гг. Экспертные ошибки установлены в 73% случаев. Путем изучения доказательной базы установления самого диагноза и критериев связи заболевания органа слуха с профессией (анализ санитарно-гигиенической характеристики условий труда, данных клинико-аудиологического анамнеза, клинической картины, характера аудиологических кривых по данным аудиоархива и пр.) выбраны 12 случаев, которые были представлены на судебно-медицинскую экспертизу. В работе описаны наиболее часто встречающиеся, типичные ошибки, которые были явно выражены во всех 12 анализируемых случаях.

Уровень убедительности оценивания С (уровень достоверности доказательств 5).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ранее опубликованных работах [10] приведен обзор всех экспертных ошибок, наблюдавшихся при экспертизе связи потерь слуха с условиями труда у работников различных «шумоопасных» профессий, основанный на анализе 213 заключительных диагнозов профессиональной нейросенсорной тугоухости. В настоящей статье представлены основные ошибки, допущенные при экспертно-диагностической работе с летным персоналом гражданской авиации, имеющим нарушение звуковосприятия. Проанализированы материалы 12 судебно-медицинских экспертиз, представленных на рецензирование с целью определения обоснованности заключительных диагнозов профессиональной тугоухости.

Тщательный разбор всех представленных документов, обосновывающих связь заболевания органа слуха (хронической двусторонней нейросенсорной тугоухости) с условиями труда, позволил выделить ряд основных, принципиальных ошибок, обусловивших некорректность и недостаточную доказательную базу формулировки заключительного диагноза во всех 12 случаях, рассмотренных в рамках судебно-медицинской экспертизы.

Ниже перечислены наиболее типичные ошибки:

- не учтены основные клинико-патогенетические характеристики, патогномичные для развития нарушений слуха при воздействии шума;
- некачественные аудиограммы, или использование

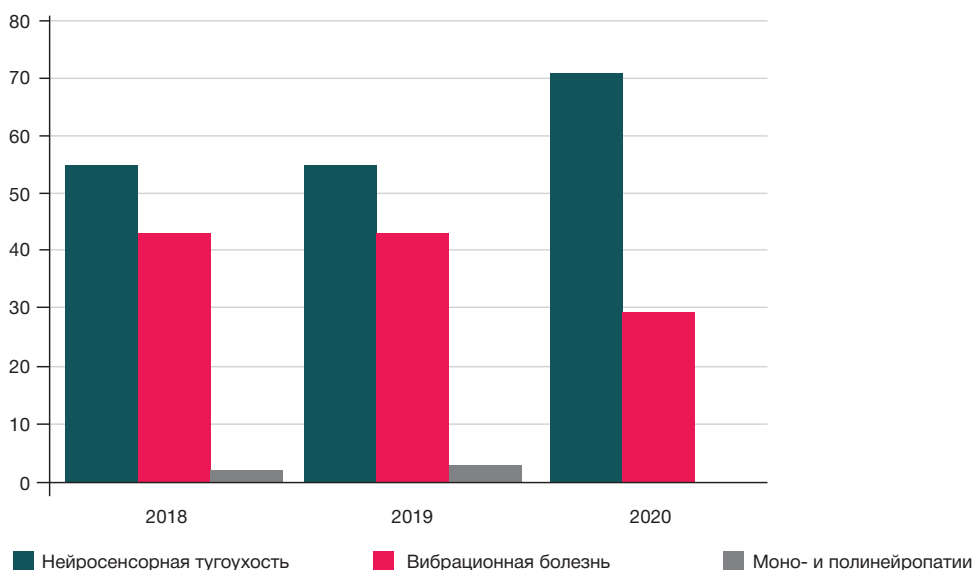


Рис. Доля профессиональной нейросенсорной тугоухости в структуре профессиональной патологии от воздействия физических факторов (%) в РФ, 2018–2020 гг. [1]

аудиограмм, отражающих расхождение результатов аудиологических исследований, выполненных в различных медицинских учреждениях;

- формализовка заключительных диагнозов без учета базовых критериев связи заболевания органа слуха с профессией, изложенных в современных регламентирующих и методических документах МЗ РФ;

- некорректная оценка параметров внутрикабинной акустической нагрузки, недоучет шумозащитных свойств авиагарнитур;

- наличие сопутствующей коморбидной патологии сердечно-сосудистой системы, неврологических и системных заболеваний, нарушений липидного статуса;

- искажение (или сокрытие) диагнозов в медицинских книжках работника при очередном медицинском освидетельствовании: фиксация разнообразных диагнозов, таких как евстахеит, тубоотит и др., при наличии аудиограмм, отражающих характерную картину нарушения звуковосприятия;

- некорректное направление больного на экспертизу связи заболевания органа слуха с профессией;

- неправильный учет степени снижения слуха как критерии профессиональной годности или негодности при отстранении работника от работы;

- деонтологические ошибки, заключающиеся в создании у пациента необоснованной рентной установки на профессиональную причину потери слуха.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные клинично-патогенетические особенности развития и течения потерь слуха у пилотов ВС ГА изложены в современных руководствах [10–12] и публикациях авторов, посвященных вопросам экспертизы связи заболевания органа слуха с профессией у работников других ведущих отраслей экономики [13–15]. Основными из них являются стаж работы в условиях воздействия производственного шума, превышающего допустимые санитарно-гигиенические нормы, не менее 8–10 лет, обязательное двустороннее начало развития слуховых нарушений, планомерная отрицательная динамика потерь слуха, отсутствие костно-воздушной диссоциации звуковосприятия, динамика развития слуховых потерь и отсутствие прогрессирования потери слуха от производственного шума в постконтактном периоде работы в условиях повышенного уровня шума.

Однако даже соавторы методических руководств, содержащих алгоритмы диагностики и экспертизы связи заболевания органа слуха с профессией для использования специалистами практического здравоохранения, делают ошибки, будучи при этом членами врачебных комиссий. Во всех рассмотренных случаях диагностические ошибки связаны с использованием некачественных аудиограмм или расхождением результатов аудиологических исследований, выполненных в различных медицинских учреждениях. В подобных случаях необходимо учитывать результаты комплексного, углубленного аудиологического обследования, выполненного на базе специализированного медицинского учреждения. Следует также учитывать, что расхождение результатов исследования состояния слуховых порогов может быть обусловлено флюктуирующим (нестабильным) течением нарушения звуковосприятия, что не характерно для шумового повреждения органа слуха.

Важное значение при решении вопросов возможной профессиональной (шумовой) причины нарушения

звуковосприятия имеет характер аудиометрической кривой. Горизонтальный профиль кривой с отсутствием характерных для «шумовой» тугоухости признаков (наличие «провала» на 4000 или реже 3000 Гц, достоверная разница среднеарифметических величин показателей восприятия речевых и высоких звуковых частот и медленное, планомерное снижение остроты слуха) не может быть расценено как связанный с шумовым воздействием на орган слуха. К диагностическим ошибкам приводит недоучет важной роли наличия сопутствующей коморбидной патологии сердечно-сосудистой системы, неврологических и системных заболеваний, нарушений липидного статуса, то есть состояний, которые сами по себе могут вызывать нарушение звуковосприятия или усугублять повреждающее действие шума. Нехарактерным для тугоухости шумовой этиологии является также расхождение акустических и аудиологических показателей состояния слуховых порогов.

Одним из основополагающих положений экспертизы связи заболевания органа слуха с профессией у пилотов ВС ГА является корректная оценка параметров внутрикабинной акустической нагрузки. Такая работа должна основываться на актуализированных в 2022 г. указаниях Роспотребнадзора [16], согласно которым для экспертизы необходим анализ «Протокола акустической нагрузки» за весь период летной деятельности конкретного работника с указанием типа и вида ВС, а также шумозащитных свойств используемых авиарадиогарнитур. Только эти данные могут быть использованы при указании характеристик шума в санитарно-гигиенической характеристике рабочего места работника. К сожалению, имеет место представление данных по параметрам производственного шума за несколько месяцев в году с выборочными указаниями лишь тех месяцев, когда наблюдалось наибольшее превышение предельно допустимых уровней (ПДУ). Следует учитывать и нормы налета, существующие в настоящее время в ГА — в 1990-е годы летная нагрузка была существенно снижена, поэтому имел место факт защиты временем пилота от воздействия внутрикабинного шума [17].

При прохождении медицинского освидетельствования в рамках ВЛЭК по регламентам отраслевых требований [18] пилоты зачастую скрывают свои жалобы из-за страха потерять профессию, а жалобы на снижение слуха преуменьшают, часто даже аггравировав, лишь при признании негодности к летной работе. При этом врачи, проводящие медицинское освидетельствование работников, уступают их настойчивому желанию продолжать свою профессиональную деятельность и потому фиксируют в медицинских книжках «маскирующие» диагнозы (евстахеит, тубоотит и др.) при наличии аудиограмм, отражающих характерную картину нарушения звуковосприятия.

Базовой составляющей экспертизы установления профессиональной пригодности при наличии потери слуха, вызванной шумом, является строгий учет степени снижения слуха как критерия профессиональной годности или негодности при отстранении работника от работы на основе корректной оценки степени потери слуха.

Нельзя не отметить и деонтологические аспекты некорректных экспертных решений, вызывающих у пациента рентную установку на профессиональное заболевание. Бездоказательное, поспешное и безапелляционное высказывание, не подкрепленное объективными и документальными доказательствами, заявление или обещание работнику наличия у

него профессиональной причины потери слуха вызывают необоснованную уверенность пациента в профессиональной природе патологических изменений, рентную установку на материальную компенсацию ущерба здоровью. Это порождает медицинские и социальные конфликты, сутяжные ситуации, которые, в свою очередь, ухудшают состояние здоровья пациента.

Необходимо помнить, что в настоящее время регламенты установления профессионального заболевания диктуют осуществление данной работы в два этапа, которые предполагают формулирование предварительного и заключительного диагноза [19]. При этом последний вправе установить только врачебная комиссия специализированного профпатологического учреждения, имеющего лицензию на проведение работ по профилям «Профпатология», «Экспертиза связи заболевания с профессией», «Экспертиза профпригодности» [20].

Решение вопроса об установлении связи заболевания органа слуха с профессией является сложным процессом, требующим участия целой группы специалистов: врача гигиениста или специалиста по медицине труда, специалистов клинического профиля (оториноларинголога, терапевта, невролога, окулиста) и по необходимости других специалистов, членов врачебной комиссии, имеющих соответствующие сертификаты по специальности «Профпатология», учреждения профпатологического профиля, имеющего лицензии на осуществление деятельности по направлениям «Экспертиза связи заболевания с профессией», «Экспертиза профессиональной пригодности».

Следствием недоучета основных опорных моментов экспертной работы являются необоснованная потеря профессиональной пригодности, инвалидизация работников в трудоспособном возрасте, экономические потери, затяжные конфликты со стороны пациента или работодателя, отрицательно влияющие на качество жизни пациента, врача и общества в целом.

Врачебная этика и деонтология, основные формально-логические принципы проведения экспертиз предполагают, что каждую последующую экспертизу сложного конфликтного случая, особенно затрагивающую социально значимую проблему профессиональных заболеваний, должны проводить эксперты с более высоким уровнем квалификации. Это необходимо для того, чтобы исключить один из основных источников, порождающих экспертные ошибки, а именно слабое знание экспертами основ методологии и неумение применять на практике ее теоретические положения [21].

Выводы

Высокий удельный вес показателей заболеваемости профессиональной тугоухостью у лиц летного состава ГА в значительной степени обусловлен несовершенством экспертных решений, связанным с незнанием базовых критериев диагностики и связи потерь слуха, вызванных шумом с профессией. Основные ошибки — это некорректная оценка параметров внутрикабинного шума, незнание особенностей клинико-аудиологической картины развития нарушений звуковосприятия, неправильная оценка аудиологических показателей потери слуха, недоучет роли коморбидной патологии и др. Не учитываются основные требования проведения экспертизы связи потерь слуха, вызванных шумом, с профессией и вопросы профессиональной пригодности, изложенные в действующих нормативно-регламентирующих документах МЗ РФ и основополагающих публикациях. Недоучет опорных моментов экспертной работы по вопросам связи заболевания органа слуха с профессией у представителей летного состава ГА ведет к необоснованной потере профессиональной пригодности, инвалидизации работников в трудоспособном возрасте, экономическим потерям.

Литература

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021.
2. Панкова В. Б., Федина И. Н. Профессиональные заболевания ЛОР-органов: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021; 544 с.
3. Мионов В. Г., Солдатов И. К., Паневин П. А. и др. Ретроспективный анализ профессиональной тугоухости военнослужащих воздушно-космических сил. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2018; 1 (61): 75–7.
4. Зинкин В. М., Шешегов П. М. Авиационный шум: риск нарушения здоровья человека и меры профилактики. VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Защита от повышенного шума и вибрации». СПб., 2017; с. 493–520.
5. Вильк М. Ф., Панкова В. Б., Глуховский В. Д. Патология слуха у членов летных экипажей гражданской авиации: проблемы и пути решения. Материалы XII Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. Российская гигиена — развивая традиции, устремляемся в будущее. М., 2017; с.17–18.
6. Evans S, Radcliffe SA. The annual incapacitation rate of commercial pilots. *Aviat Space Environ Med.* 2012 Jan; 83 (1): 42–9. PubMed PMID: 22272515.
7. Raynal M, Kossowski M, Job A. Hearing in military pilots: one-time audiometry in pilots of fighters, transports, and helicopters. *Aviat Space Environ Med.* 2006; 77: 57–61. PubMed PMID: 16422455.
8. Вильк М. Ф., Глуховский В. Д., Курьеров Н. Н., Панкова В. Б., Прокопенко Л. В. Современный методический подход к оценке акустической нагрузки на членов летных экипажей воздушных судов гражданской авиации. Медицина труда и промышленная экология. 2017; (3): 27–36.
9. Kuronen P, Toppila E, Starck J. Modelling the risk of noise-induced hearing loss among military pilots. *Int J Audiol.* 2004; 43: 79–84. PubMed PMID: 15035560.
10. Панкова В. Б., Глуховский В. Д. Тугоухость у членов летных экипажей гражданской авиации. Под ред. д.м.н., проф. М. Ф. Вилька. М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К^о», 2018; 180 с.
11. Измеров Н. Ф., редактор. Профессиональная патология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011; 784 с.
12. Клинические рекомендации МЗ РФ «Потеря слуха, вызванная шумом», 2018 (№ 609 Рубрикатора Клинических рекомендаций МЗ РФ).
13. Дмитриев Н. С., Таварткиладзе Г. А. Медико-социальная экспертиза пациентов с нарушением слуха. Материалы 17-го съезда оториноларингологов России. 2006; с. 20–1.
14. Булацкая Т. В., Меркулова Е. П. Экспертиза состояния здоровья работников локомотивных бригад с профессиональной сенсоневральной тугоухостью в динамике. Вестник оториноларингологии. 2013; 4: 31–4.

15. Райцелис И. В. Методические основы оценки и управления рисками нейросенсорной тугоухости у рабочих газохимического производства [диссертация]. М., 2013.
16. Методика оценки акустической нагрузки членов летных экипажей воздушных судов гражданской авиации. Методические указания. МУК 3694-21. ГСЭН РФ 2.5. Гигиена и эпидемиология на транспорте.
17. Приказ Минтранса России от 21.11.2005 № 139 «Об утверждении Положения об особенностях режима рабочего времени и времени отдыха членов экипажей воздушных судов гражданской авиации Российской Федерации».
18. Приказ Минтранса РФ от 22.04.2002 № 50 «Об утверждении Федеральных авиационных правил "Медицинское освидетельствование летного, диспетчерского состава, бортопроводников, курсантов и кандидатов, поступающих в учебные заведения гражданской авиации».
19. Постановление Правительства России от 15.12.2000 № 967 «Об утверждении Положения о расследовании и учете профессиональных заболеваний».
20. Приказ Минздрава России от 13.11.2012 № 911н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи при острых и хронических профессиональных заболеваниях».
21. Россинская Е. Р., редактор. Судебная экспертиза: типичные ошибки. М.: Проспект, 2012; 301 с.

References

1. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020: State Report. M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being, 2021. Russian.
2. Pankova VB, Fedina IN. Occupational diseases of ENT organs: guidelines. M.: GEOTAR-Media, 2021. Russian.
3. Mironov VG, Soldatov IK, Panevin PA, et al. Retrospective analysis of occupational hearing loss in military personnel of the aerospace forces. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2018; 1 (61): 75–7.
4. Zinkin VM, Sheshegov PM. Aircraft noise: the risk for human health and prevention measures. VI All-Russian scientific and practical conference with international participation "Protection from Increased Noise and Vibration". St. Petersburg, 2017; p 493–520.
5. Vilik MF, Pankova VB, Glukhovskiy VD. Hearing pathology in members of civil aviation flight crews: problems and solutions. Materials of the XII All-Russian Congress of Hygienists and Sanitary Doctors. Russian hygiene — developing traditions, rushing into the future. M., 2017; p. 17–18. Russian.
6. Evans S, Radcliffe SA. The annual incapacitation rate of commercial pilots. Aviat Space Environ Med. 2012 Jan; 83 (1): 42–9. PubMed PMID: 22272515.
7. Raynal M, Kossowski M, Job A. Hearing in military pilots: one-time audiometry in pilots of fighters, transports, and helicopters. Aviat Space Environ Med. 2006; 77: 57–61. PubMed PMID: 16422455.
8. Vilik MF, Glukhovskiy VD, Kuryerov NN, Pankova VB, Prokopenko LV. Modern methodological approach to the assessment of acoustic load on members of flight crews of civil aviation aircraft. Occupational medicine and industrial ecology. 2017; (3): 27–36. Russian.
9. Kuronen P, Toppila E, Starck J. Modelling the risk of noise-induced hearing loss among military pilots. Int J Audiol. 2004; 43: 79–84. PubMed PMID: 15035560.
10. Pankova VB, Vilik MF, Glukhovskiy VD. 7.4 Civil aviation. In the book: Professional sensorineural hearing loss: diagnosis, prevention, examination of working capacity. M.: Publishing and Trading Corporation "Dashkov and Co", 2017; p. 158–80. Russian.
11. Izmerov NF, editor. Occupational pathology: national guidelines. M.: GEOTAR-Media, 2011; 784 p.
12. Clinical recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation "Noise-induced hearing loss", 2018 (No. 609 of the Rubric of Clinical Recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation). Russian.
13. Dmitriev NS, Tavartkiladze GA. Medico-social examination of patients with hearing impairment. Proceedings of the 17th Congress of Otorhinolaryngologists of Russia. 2006. 20–1.
14. Bulatskaya TV, Merkulova EP. Examination of the state of health of employees of locomotive crews with occupational sensorineural hearing loss in dynamics. Bulletin of Otorhinolaryngology. 2013; 4: 31–4.
15. Raicelis IV. Methodological bases for assessing and managing the risks of sensorineural hearing loss in gas chemical production workers [dissertation]. M., 2013. Russian.
16. Methodology for assessing the acoustic load in members of flight crews of civil aviation aircraft. Methodical instructions. MUC 3694-21. GSEN RF 2.5. Hygiene and epidemiology in transport. Russian.
17. Order of the Ministry of Transport of the Russian Federation No. 139 dated 21.11.2005 "On approval of the regulations on the specifics of the working time and rest time of crew members of civil aviation aircraft of the Russian Federation". Russian.
18. Order of the Ministry of Transport of the Russian Federation of No. 50 dated April 22, 2002 "On Approval of the Federal Aviation Rules "Medical examination of flight, air traffic control personnel, flight attendants, cadets and candidates entering civil aviation educational establishments".
19. Decree of the Government of the Russian Federation No. 967 dated December 15, 2000 "On approval of the Regulations on the Investigation and accounting of occupational diseases". Russian.
20. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 911n dated November 13, 2012 "On approval of the procedure for providing medical care for acute and chronic occupational diseases". Russian.
21. Rossinskaya ER, editor. Forensic examination: typical mistakes. 2012; 301 p. Russian.

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ У ЖИТЕЛЕЙ УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

В. С. Никифоров^{1,2}✉, Е. А. Блинова^{1,2}, А. В. Аклеев^{1,2}

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Помимо повреждения генетического аппарата клетки, ионизирующее излучение способно приводить к эпигенетическим изменениям. Распространенной эпигенетической модификацией является метилирование ДНК, играющее важную роль в регуляции клеточных процессов. Метилирование ДНК происходит в последовательностях, богатых CpG-динуклеотидами, и осуществляется при помощи ферментов ДНК-метилтрансфераз. Целью работы было изучить экспрессию мРНК генов ДНК-метилтрансфераз (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) в отдаленные сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению на р. Теча. Обследование 112 человек было проведено спустя более чем 65 лет после начала хронического облучения. Средняя накопленная доза облучения красного костного мозга составляла $782,0 \pm 82,3$ мГр, а средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов — $93,2 \pm 13,6$ мГр. Возраст людей на время проведения обследования составил $67,9 \pm 0,8$ лет (54–83 года). Оценку относительного содержания мРНК исследуемых генов проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. Установлена прямая корреляция между экспрессией мРНК гена *DNMT1* и дозой облучения красного костного мозга ($p = 0,04$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($p = 0,02$), а также мощностью дозы облучения этих органов ($p = 0,05$, $p = 0,04$ соответственно) в период максимального радиационного воздействия. У облученных лиц в диапазоне больших доз (более 1000 мГр) наблюдается значимое увеличение экспрессии мРНК гена *DNMT1* относительно группы сравнения ($p = 0,02$). Полученные результаты могут свидетельствовать о вовлеченности гена *DNMT1* в изменение эпигенетического статуса у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в отдаленные сроки.

Ключевые слова: экспрессия генов, хроническое облучение, метилирование ДНК, река Теча, малые дозы

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России (Государственный контракт № 27.501.21.2 от 11 июня 2021 г.).

Вклад авторов: В. С. Никифоров — выполнение лабораторных исследований, статистическая обработка результатов, написание статьи; Е. А. Блинова, А. В. Аклеев — планирование исследования, редактирование и подготовка окончательного варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (протокол №3 от 28 июня 2022 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Владислав Сергеевич Никифоров
ул. Воровского, д. 68, корп. А, г. Челябинск, 454141, Россия; nikiforovx@mail.ru

Статья получена: 29.06.2022 **Статья принята к печати:** 17.07.2022 **Опубликована онлайн:** 09.08.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.027

TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF DNA-METHYLTRANSFERASE GENES IN THE CHRONICALLY EXPOSED RESIDENTS OF THE URAL REGION

Nikiforov VS^{1,2}✉, Blinova EA^{1,2}, Akleyev AV^{1,2}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

In addition to damaging the genetic apparatus of the cell, ionizing radiation can cause epigenetic alterations. DNA methylation that plays a vital part in regulation of cellular processes is a common epigenetic modification. DNA methylation ensured by DNA methyltransferases occurs in the CpG-rich sequences. The study was aimed to assess mRNA expression of genes encoding DNA methyltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) in the chronically exposed individuals who live along the River Techa over a long-term period. A total of 112 people were examined more than 65 years after the beginning of chronic exposure. The average accumulated dose to red bone marrow (RBM) was 782.0 ± 82.3 mGy, and the average accumulated dose to thymus and peripheral lymphoid organs was 93.2 ± 13.6 mGy. The subjects' age at the time of examination was 67.9 ± 0.8 years (54–83 years). The relative mRNA levels for the studied genes were assessed by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). mRNA expression of *DNMT1* correlated positively with the dose to RBM ($p = 0.04$), thymus and peripheral lymphoid organs ($p = 0.02$), as well as with the dose rate in these organs ($p = 0.05$, $p = 0.04$, respectively) during the period of the highest levels of radiation exposure. In individuals exposed in the high dose range (over 1000 mGy) there was a significant increase in the expression of *DNMT1* mRNA compared to the comparison group ($p = 0.02$). The findings may indicate the *DNMT1* gene involvement in epigenetic alterations that occur in the chronically exposed people in the long term.

Keywords: gene expression, chronic radiation exposure, DNA methylation, Techa River, low doses

Funding: the study was supported by the Federal Medical Biological Agency of Russia (Government contract № 27.501.21.2 of June, 11 2021).

Author contribution: Nikiforov VS — laboratory tests, statistical analysis, manuscript writing; Blinova EA, Akleyev AV — study planning, manuscript editing and preparing the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Urals Research Center for Radiation Medicine of FMBA of Russia (protocol № 3 dated June 28, 2022). The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladislav S. Nikiforov
Vorovskogo, 68, korp. 1, Chelyabinsk, 454141, Russia; nikiforovx@mail.ru

Received: 29.06.2022 **Accepted:** 17.07.2022 **Published online:** 09.08.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.027

Профиль метилирования генома — это динамическая характеристика, способная меняться в процессе онтогенеза, а также под действием факторов окружающей среды. Метилирование происходит в последовательностях, богатых CpG-динуклеотидами, и осуществляется при участии ферментов ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L) [1]. Метилтрансферазы DNMT3A и DNMT3B обладают *de novo* метилирующей активностью, а метилтрансфераза DNMT1 обеспечивает восстановление и поддержание ранее установленных метильных меток. При этом уровень метилирования каждого участка ДНК определяется двумя противоположно направленными процессами — метилированием и деметилированием, которые в целом зависят от активности ДНК-метилтрансфераз и ферментов с ДНК-диметилирующими свойствами [2].

Изменения экспрессии метилтрансфераз под действием ионизирующего излучения изучены в исследованиях *in vitro* на культурах клеток: в некоторых случаях эти изменения коррелируют с уровнем метилирования ДНК [3]. В экспериментах на мышах и тимидитах человека, предполагавших воздействие комбинированным облучением (низкие начальные дозы, с последующим облучением в высоких дозах), было выявлено снижение экспрессии генов *DNMT2*, *DNMT3B*, *DNMT3L* в тимидитах мышей и *DNMT2*, *DNMT3A* в облученных *in vitro* тимидитах человека [4]. У врачей-хирургов, проводивших интервенционные вмешательства более трех лет, наблюдалось увеличение экспрессии ДНК-метилтрансфераз [5]. Одним из регуляторов изменения экспрессии метилтрансфераз в ответ на действие ионизирующего излучения является белок p53, который непосредственно связывается с ДНК. При облучении уменьшается его прямое связывание, что приводит к увеличению транскрипционной активности гена *DNMT1* [6].

Показано, что на радиочувствительность клеток, в том числе стволовых клеток, влияют уровень метилирования генома и активность метилтрансфераз. Это обусловлено тем, что активность метилтрансфераз и метилирование отдельных участков ДНК потенциально могут изменять секрецию таких факторов, как TNF α , NO и TGF β [7]. Кроме того, метилирование и изменение экспрессии генов метилтрансфераз под действием ионизирующего излучения способствует индукции нестабильности генома [8].

В связи с этим целью настоящего исследования было изучить экспрессию мРНК генов ДНК-метилтрансфераз (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) в отдаленные сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию (преимущественно с низкой мощностью дозы).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы периферической крови, полученные от 112 жителей прибрежных сел р. Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов ПО «Маяк». Внутреннее облучение было сформировано за счет радионуклидов, поступивших в организм с речной водой и продуктами местного производства, а внешнее γ -излучение — за счет загрязнения радионуклидами донных отложений и пойменных почв.

Массированные сбросы радиоактивных отходов начались в 1950 г. В первые годы основными источниками облучения были короткоживущие радионуклиды.

Затем в результате защитных мероприятий и распада короткоживущих радионуклидов мощность дозы внешнего облучения, а также внутреннего облучения мягких тканей существенно снизилась: после 1960 г. она не превышала 10^{-5} Гр/год для всех, кто проживал на прибрежных территориях. Несколько иной была картина облучения красного костного мозга (ККМ), поскольку главный вклад в формирование дозы вносил долгоживущий остеотропный ^{90}Sr , обеспечивающий хроническое облучение с монотонно снижающейся мощностью дозы, которая к 1985 г. стала ниже 10^{-5} Гр/год у всех облученных людей [9].

Критерии включения людей в исследуемые группы: постоянное проживание в одном из 41 села, расположенных на побережье р. Течи, в период с 1 января 1950 г. по 31 декабря 1960 г.; наличие рассчитанных индивидуальных накопленных поглощенных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов на основе дозиметрической системы Techa River Dosimetry System-2016 (TRDS-2016) [10]. Критерии исключения: наличие аутоиммунных, острых или хронических (период обострения) воспалительных заболеваний, прием антибиотиков, глюкокортикоидов и цитостатических препаратов в течение последних шести месяцев до момента взятия образца крови.

В зависимости от величины накопленной дозы облучения ККМ участников исследования условно разделили на группу сравнения (67 человек), в которой значения доз облучения ККМ не превышали 70 мГр за весь период жизни, и группу хронически облученных лиц (45 человек), чьи дозы превышали 70 мГр.

Средняя накопленная доза облучения ККМ у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, составила $782,0 \pm 82,3$ мГр (диапазон доз 77,8–3179,7 мГр), а среднее значение мощности дозы облучения ККМ в период максимального радиационного воздействия (1950–1951 гг.) составило $145,7 \pm 16,3$ мГр/год (диапазон мощностей доз 0,1–542,6 мГр/год). Средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов была равна $93,2 \pm 13,6$ мГр (диапазон доз 2,8–644,8 мГр), при этом средняя мощность дозы облучения в период максимального радиационного воздействия составила $42,8 \pm 6,8$ мГр/год (диапазон мощностей доз 0,1–320,9 мГр/год). Средняя накопленная доза облучения ККМ в группе сравнения была равна $20,7 \pm 2,7$ мГр (диапазон доз 1,3–63,2 мГр), а средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов составила $8,8 \pm 1,6$ мГр (диапазон доз 0,2–33,5 мГр).

Средний возраст хронически облученных лиц составил $72,2 \pm 0,7$ года (63–83 года), а возраст лиц из группы сравнения — $63,7 \pm 1,0$ года (54–79 лет). В двух группах подавляющее большинство образцов было получено от женщин. Так, в группе хронически облученных людей доля женщин составила 70,1% (47 человек); в группе сравнения — 68,9% (31 человек).

Кровь для оценки относительного содержания мРНК метилтрансфераз отбирали из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Tubes (Thermo Scientific; США) в объеме 3 мл. Выделение РНК осуществляли колоночным методом при помощи коммерческого набора GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific; США). Качественные и количественные характеристики выделенных образцов общей РНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific; США). Чистоту препарата определяли по значениям поглощения на длинах волн

Таблица 1. Используемые последовательности праймеров и зондов

Ген	Олигонуклеотидные последовательности
<i>DNMT1</i>	Forward: 5'-CCTTCACGTTCAACATCAAGC-3' Reverse: 5'-GCTCTGGGTACAGGTCCTCATC-3' Probe: FAM-BHQ1 - 5'-CCAGTCCCCTGAAACGCCA-3'
<i>DNMT3A</i>	Forward: 5'-GGCTCCAGATGTTCTTCGTA-3' Reverse: 5'-GGATGGGCTTCCTTCTCA-3' Probe: FAM-BHQ1 - 5'-CACGACCAGGAATTTGACCCTCCA-3'
<i>DNMT3B</i>	Forward: 5'-GAATCAAGGAAATACGAGAACAAGAC-3' Reverse: 5'-CTTCATCCCCTCGGTCTTTG-3' Probe: FAM-BHQ1 - 5'-CGACTCAGCCACCTCTGACTACTGCC-3'

260 и 280 нм (A260/280). Реакцию обратной транскрипции проводили отдельным этапом с использованием коммерческого набора реактивов MMLV RT Kit («Евроген»; Россия). Относительное содержание мРНК определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием амплификатора Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories; USA). Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов был разработаны компанией ООО «ДНК-СИНТЕЗ» (Россия) (табл. 1).

Реакцию ПЦР-РВ проводили в следующем временном режиме: предварительная денатурация при температуре 95 °С в течение 5 мин, циклическая денатурация при 95 °С в течение 20 с, отжиг праймеров и элонгация при 65 °С в течение 60 с (50 циклов). Для каждого образца ставили по три реплики.

Относительную продукцию генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [11]. В качестве эндогенного контроля использовали ген «домашнего хозяйства» *ACTB*. Расчет проводили с помощью программного обеспечения прибора Real-Time CFX96 Touch (BioRad; США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного комплекса SPSS Statistics 17.0 (IBM; США) и Graph Pad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc.; США). Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. При описании выборок для данных, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали среднее арифметическое значение (M), с указанием ошибки среднего ($\pm SE$) и диапазона значений ($min-max$). При описании показателей, распределение которых отличалось от нормального, использовали медиану (Me) и 25–75-й процентиля (Q_1-Q_3). Сравнение выборок данных проводили с использованием U -критерия Манна–Уитни, поскольку распределение большинства значений было отличным от нормального. Корреляционный анализ для оценки влияния дозовых характеристик на количественные показатели относительного содержания мРНК генов метилтрансфераз проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции (R) по Спирмену. Для всех критериев и тестов различия признавали значимыми при $p < 0,05$. При $0,05 < p < 0,1$ различие считали тенденцией к значимому различию.

Таблица 2. Содержание (Me) мРНК (отн. ед.) генов ДНК-метилтрансфераз в клетках периферической крови у хронически облученных людей в отдаленные сроки

Группа	n	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3B</i>
Группа сравнения	45	1,18 (0,78–1,67)	0,71 (0,58–0,82)	0,78 (0,18–1,37)
Хронически облученные лица	67	1,43 (0,99–1,67)	0,71 (0,55–0,83)	0,46 (0,20–1,18)

Примечание: в скобках указаны 25–75-й процентиля; n — величина выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При сравнении двух выборок не были выявлены статистически значимые различия относительного содержания мРНК генов метилтрансфераз *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* (табл. 2).

В результате корреляционного анализа в объединенной выборке были обнаружены слабые положительные связи между относительным содержанием мРНК гена *DNMT1* и величиной накопленной дозы облучения ККМ ($R = 0,19$; $p = 0,04$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($R = 0,19$; $p = 0,05$), а также величиной мощности дозы облучения ККМ ($R = 0,21$; $p = 0,02$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($R = 0,20$; $p = 0,04$) в период максимального радиационного воздействия (табл. 2).

Зависимость относительного содержания мРНК гена *DNMT1* от дозовых характеристик была исследована методом регрессионного анализа в объединенной выборке. Анализ подтвердил наличие закономерности изменения экспрессии мРНК гена *DNMT1* в зависимости от величины мощности доз облучения ККМ ($R = 0,20$; $p = 0,03$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($R = 0,19$; $p = 0,04$) в период максимального радиационного воздействия. Не обнаружена зависимость относительного содержания мРНК генов *DNMT3A* и *DNMT3B* от дозовых параметров (табл. 3).

У лиц с накопленными дозами облучения ККМ более 1000 мГр (1044,8–3179,7 мГр) наблюдается значимое увеличение экспрессии мРНК гена *DNMT1* (среднее значение — $1659,0 \pm 155,7$; $p = 0,02$) относительно группы сравнения (рис. А).

Кроме того, отмечено, что относительное содержание мРНК гена *DNMT1* было значимо выше ($p = 0,04$) у людей с накопленными дозами облучения тимуса и периферических лимфоидных органов от 103,9 до 644,8 мГр (среднее значение — $200,9 \pm 30,3$ мГр) по сравнению с лицами, чьи дозы не превышали 10,0 мГр (среднее значение — 2,5 мГр) (рис. Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

DNMT1 — одна из основных ДНК-метилтрансфераз в клетках млекопитающих. Она представляет собой большой

Таблица 3. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) между относительным содержанием мРНК генов ДНК-метилтрансфераз и величинами дозы и мощности доз в период максимального радиационного воздействия

Ген	Доза облучения ККМ, мГр	Мощность дозы облучения ККМ в период максимального воздействия, мГр/год	Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр/год	Мощность дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов в период максимального воздействия, мГр/год
<i>DNMT1</i>	0,19 (0,04)	0,21 (0,02)	0,19 (0,05)	0,20 (0,04)
<i>DNMT3A</i>	-0,03 (0,74)	-0,07 (0,45)	-0,04 (0,65)	-0,04 (0,65)
<i>DNMT3B</i>	-0,13 (0,17)	-0,17 (0,08)	-0,14 (0,16)	-0,15 (0,11)

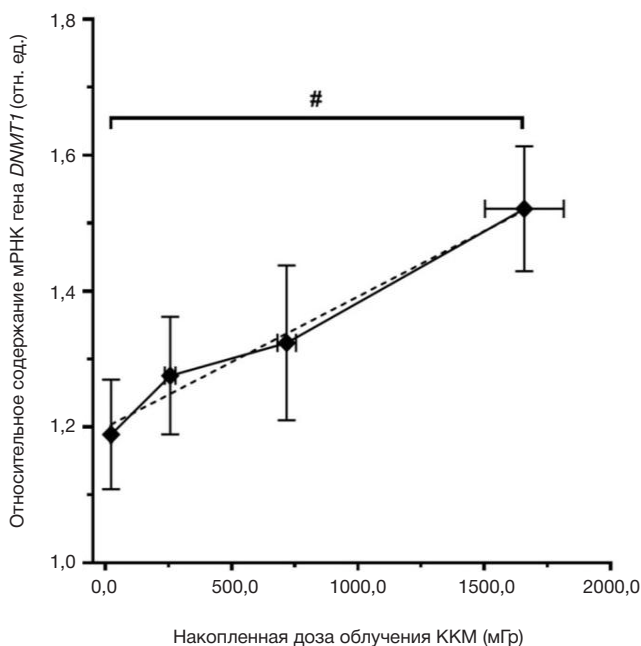
и высокодинамичный фермент с множеством регуляторных функций, которые могут контролировать метилирование ДНК. В частности, его экспрессия необходима для поддержания паттерна метилирования ДНК во время митоза. Кроме того, *DNMT1* играет непосредственную роль в восстановлении эпигенетической информации во время репарации ДНК [8].

Повышение экспрессии гена *DNMT1* часто бывает связано с тотальным гипометилированием [12]. Стоит отметить, что подобный эффект гипометилирования генома был зафиксирован у работников атомной промышленности, подвергшихся комбинированному воздействию излучений с высокой и низкой ЛПЭ. Группа исследователей [13] отметила, что у рабочих с суммарной накопленной дозой, превышающей 103,14 мЗв, уровень метилирования генома существенно выше такового при более низких уровнях облучения (менее 103,14 мЗв), что указывает на дифференциальный характер ответа эпигенома на воздействие низких и высоких доз.

В другой работе этого же коллектива авторов также показано снижение общего уровня 5-метилцитозина в лейкоцитах крови работников, подвергшихся воздействию γ -излучения и рентгеновского излучения [14].

Изменение экспрессии ДНК-метилтрансфераз зачастую бывает связано с локус-специфичным изменением метилирования генов, ответственных за поддержание клеточного гомеостаза. В работе [15] было рассмотрено гиперметилирование CpG-островков промоторов некоторых генов (в частности, *p16/INKA* и *GSTP1*) в нормальных лейкоцитах крови в отдаленный период после радиационного воздействия. Дальнейшие обследования работников ПО «Маяк» с индивидуальными рассчитанными накопленными дозами внешнего воздействия γ -излучения или комбинированного действия внешнего γ -внутриклеточного α -излучения, выполненные с расширением спектра анализируемых локусов, выявили совокупность генов *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1*, гиперметилирование которых ассоциировано с радиационным воздействием [16].

А



Б

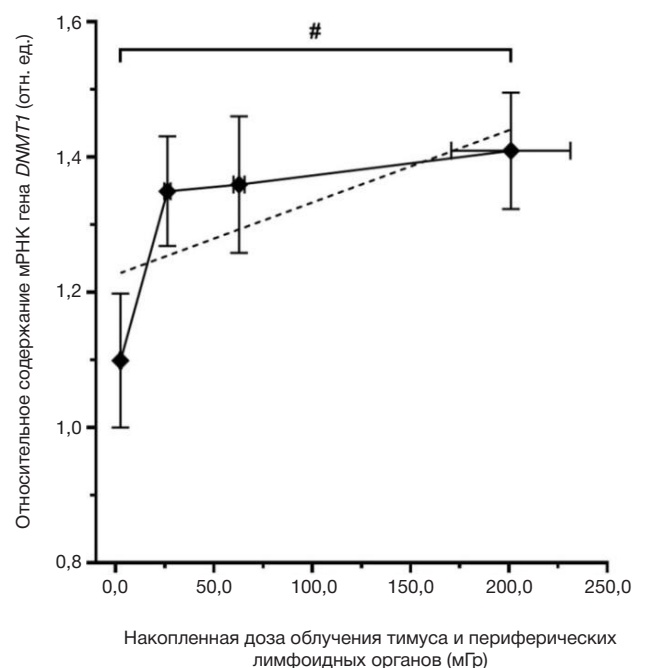


Рис. Относительное содержание мРНК гена *DNMT1* (отн. ед.) у облученных лиц в зависимости от величины дозы облучения ККМ (**А**), тимуса и периферических лимфоидных органов (**Б**): пунктирной линией обозначена линейная аппроксимация (линия тренда); # — значимые различия в экспрессии гена *DNMT1* между группой сравнения и хронически облученными лицами; вертикальная полоса погрешности соответствует ошибке среднего значения относительного содержания мРНК гена *DNMT1*; горизонтальная полоса погрешности соответствует ошибке среднего значения накопленной поглощенной дозы облучения ККМ (**А**), тимуса и периферических лимфоидных органов (**Б**)

В проведенных нами ранее исследованиях была отмечена положительная корреляционная связь между уровнем метилирования промоторного региона гена *ATM* и дозой облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов у облученных лиц [17]. Кроме этого, экспрессия гена *ATM* была значимо снижена в группе хронически облученных людей с дозами облучения ККМ, превышающими 1000 мГр [18].

Не исключено, что в отдаленные сроки после начала хронического облучения человека при дозах облучения ККМ более 1000 мГр изменение экспрессии гена *DNMT1* может быть вовлечено в индукцию эпигенетических нарушений. Для того чтобы ответить на вопрос, действительно ли *DNMT1* принимает участие в эпигенетических механизмах, необходимо изучить влияние транскрипционной активности

гена на уровень метилирования промоторных регионов генов, регулирующих репарацию, пролиферацию и гибель клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию.

Выводы

В отдаленные сроки после начала хронического низкоинтенсивного облучения человека в диапазоне доз более 1 Гр наблюдается значимое повышение экспрессии мРНК гена *DNMT1*. У хронически облученных лиц регистрируются положительные корреляционные связи экспрессии мРНК гена *DNMT1* с дозой облучения красного костного мозга, тимуса и периферических лимфоидных органов, а также мощностью дозы облучения этих органов в период максимального радиационного воздействия (1950–1951 гг.).

Литература

- Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLOS Genetics*. 2012; (8): 1002750. DOI:10.1371/journal.pgen.1002750.
- Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014; 39 (7): 310–18. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.05.002.
- Chaudhry MA, Omaruddin RA. Differential DNA methylation alterations in radiation-sensitive and -resistant cells. *DNA and Cell Biology*. 2012; 31 (6): 908–16. DOI: 10.1089/dna.2011.1509.
- López-Nieva P, González-Vasconcellos I, González-Sánchez L, Cobos-Fernández MA, Cobos-Fernández S, Pérez RS, et al. Differential molecular response in mice and human thymocytes exposed to a combined-dose radiation regime. *Sci Rep*. 2022; (12): 3144. DOI: 10.1038/s41598-022-07166-8.
- Chen B, Dai Q, Zhang Q, Yan P, Wang A, Qu L, et al. The relationship among occupational irradiation, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional physicians. *Medicine (Baltimore)*. 2022; 98 (39): e17373. DOI: 10.1097/MD.00000000000017373.
- Peterson EJ, Bogler O, Taylor SM. p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res*. 2003; 63 (20): 6579–82.
- Armstrong CA, Jones GD, Anderson R, Iyer P, Narayanan D, Sandhu J, et al. DNMTs are required for delayed genome instability caused by radiation. *Epigenetics*. 2012; 7 (8): P. 892–902. DOI: 10.4161/epi.21094.
- Rugo RE, Mutamba JT, Mohan KN, Yee T, Greenberger JS, Engelward BP. Methyltransferases mediate cell memory of a genotoxic insult. *Oncogene*. 2011; 30 (6): 751–6. DOI: 10.1038/onc.2010.480.
- Дегтева М. О., Напье Б. А., Толстых Е. И., Шишкина Е. А., Бугров Н. Г., Крестинина Л. Ю. и др. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523_98590475.
- Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Shagina NB, Volchkova AYU, et al. Enhancements in the Techa River Dosimetry System: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures. *Health Physics*. 2019; 117 (4): 378–87. DOI: 10.1097/HP.0000000000001067.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001; 25 (4): 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Svedruzic ZM. Dnmt1 structure and function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011; 101: 221–54. DOI: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00006-8.
- Lee Y, Kim YJ, Choi YJ, Lee JW, Lee S, Cho YH, et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers. *Int J Radiat Biol*. 2015; 91 (2): 142–9. DOI: 10.3109/09553002.2015.969847.
- Cho YH, Jang Y, Woo HD, Kim YJ, Kim SY, Christensen S, et al. LINE-1 hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers. *Environ Mol Mutagen*. 2018; 60 (2): 174–84. DOI: 10.1002/em.22237.
- Kuzmina NS, Lapteva NSh, Rubanovich AB. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ Res*. 2016; 146: 10–17. DOI: 10.1016/j.envres.2015.12.008.
- Кузьмина Н. С., Лаптева Н. Ш., Русинова Г. Г., Азизова Т. В., Вязовская Н. С., Рубанович А. В. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся сочетанному воздействию гамма- и альфаизлучений. *Генетика*. 2018; 54: S22–26. DOI: 10.1134/S0016675818130118.
- Блинова Е. А., Никифоров В. С., Котикова А. И., Янишевская М. А., Аклеев А. В. Статус метилирования генов апоптоза и интенсивность апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению. *Молекулярная биология*. 2022; 56 (5): 1–11.
- Никифоров В. С., Блинова Е. А., Аклеев А. В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск (Бюллетень национального радиационно-эпидемиологического регистра)*. 2020; 29 (2): 89–100. DOI: 10.21870/0131-3878-2020-29-2-89-100.
- Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014; 39 (7): 310–18. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.05.002.
- Chaudhry MA, Omaruddin RA. Differential DNA methylation alterations in radiation-sensitive and -resistant cells. *DNA and Cell Biology*. 2012; 31 (6): 908–16. DOI: 10.1089/dna.2011.1509.

References

- Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLOS Genetics*. 2012; (8): 1002750. DOI:10.1371/journal.pgen.1002750.
- Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014; 39 (7): 310–18. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.05.002.
- Chaudhry MA, Omaruddin RA. Differential DNA methylation alterations in radiation-sensitive and -resistant cells. *DNA and Cell Biology*. 2012; 31 (6): 908–16. DOI: 10.1089/dna.2011.1509.

4. López-Nieva P, González-Vasconcellos I, González-Sánchez L, Cobos-Fernández MA, Cobos-Fernández S, Pérez RS, et al. Differential molecular response in mice and human thymocytes exposed to a combined-dose radiation regime. *Sci Rep.* 2022; (12): 3144. DOI: 10.1038/s41598-022-07166-8.
5. Chen B, Dai Q, Zhang Q, Yan P, Wang A, Qu L, et al. The relationship among occupational irradiation, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional physicians. *Medicine (Baltimore).* 2022; 98 (39): e17373. DOI: 10.1097/MD.00000000000017373.
6. Peterson EJ, Bogler O, Taylor SM. p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res.* 2003; 63 (20): 6579–82.
7. Armstrong CA, Jones GD, Anderson R, Iyer P, Narayanan D, Sandhu J, et al. DNMTs are required for delayed genome instability caused by radiation. *Epigenetics.* 2012; 7 (8): P. 892–902. DOI: 10.4161/epi.21094.
8. Rugo RE, Mutamba JT, Mohan KN, Yee T, Greenberger JS, Engelward BP. Methyltransferases mediate cell memory of a genotoxic insult. *Oncogene.* 2011; 30 (6): 751–6. DOI: 10.1038/onc.2010.480.
9. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Bougrov NG, Krestinina LYu, et al. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa River. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523_98590475.
10. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Shagina NB, Volchkova AYu, et al. Enhancements in the Techa River Dosimetry System: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures. *Health Physics.* 2019; 117 (4): 378–87. DOI: 10.1097/HP.0000000000001067.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods.* 2001; 25 (4): 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
12. Svedruzic ZM. Dnmt1 structure and function. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011; 101: 221–54. DOI: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00006-8.
13. Lee Y, Kim YJ, Choi YJ, Lee JW, Lee S, Cho YH, et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers. *Int J Radiat Biol.* 2015; 91 (2): 142–9. DOI: 10.3109/09553002.2015.969847.
14. Cho YH, Jang Y, Woo HD, Kim YJ, Kim SY, Christensen S, et al. LINE-1 hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers. *Environ Mol Mutagen.* 2018; 60 (2): 174–84. DOI: 10.1002/em.22237.
15. Kuzmina NS, Lapteva NSh, Rubanovich AB. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ Res.* 2016; 146: 10–17. DOI: 10.1016/j.envres.2015.12.008.
16. Kuzmina NS, Lapteva NSh, Rusinova GG, Azizova TV, Vyazovskaya NS, Rubanovich AV. Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans exposed to both gamma-radiation and alpha-particles. *Genetika.* 2018; 54: S22–26. DOI: 10.1134/S0016675818130118.
17. Blinova EA, Nikiforov VS, Kotikova AI, Yanishevskaya MA, Akleyev AV. Methylation status of apoptose genes and intensity of apoptotic death of peripheral blood lymphocytes in persons chronically exposed to radiation. *Molecular Biology.* 2022; 56 (5): 1–11.
18. Nikiforov VS, Blinova EA, Akleyev AV. The transcriptional activity of cell cycle and apoptosis genes in chronically exposed people with an increased frequency of TCR mutant lymphocytes. *Radiation and Risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry).* 2020; 29 (2): 89–100. DOI: 10.21870/0131-3878-2020-29-2-89-100.

СОСТОЯНИЕ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ, ВПОСЛЕДСТВИИ ЗАБОЛЕВШИХ РАКОМ

Е. А. Блинова^{1,2}✉, А. И. Котикова^{1,2}, А. А. Аклеев³, А. В. Аклеев^{1,2}

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

³ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

В настоящее время онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности и инвалидизации среди зрелого трудоспособного населения в развитых странах. Одной из актуальных задач радиационной медицины является ранняя диагностика опухолевых заболеваний на основе мониторинга состояния здоровья людей, подвергшихся радиационному воздействию. Целью исследования было оценить количественные и функциональные показатели системы нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и натуральных киллеров у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию и впоследствии заболевших опухолевыми заболеваниями. Проведено исследование отдельных факторов врожденного иммунитета у 104 человек, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в широком диапазоне доз. Из них у 34 облученных лиц позднее были диагностированы злокачественные новообразования (ЗНО). Проведена оценка количества лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и НК-клеток (CD16⁺/CD56⁺-лимфоциты) в периферической крови, а также фагоцитарная, лизосомальная активность и интенсивность внутриклеточного кислородозависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов. У лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию за несколько лет до развития ЗНО, наблюдалось значимое повышение интенсивности фагоцитоза моноцитов (медиана — 10,50 усл. ед. против 6 усл. ед.; $p = 0,05$) и лизосомальной активности нейтрофилов (медиана — 482 усл. ед. против 435,5 усл. ед.; $p = 0,03$) по сравнению с пациентами без ЗНО. При анализе дозовых зависимостей у облученных лиц, впоследствии заболевших онкологическими заболеваниями, обнаружены увеличение интенсивности фагоцитоза моноцитов в зависимости от дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов ($p = 0,45$; $p = 0,009$), а также повышение активности фагоцитоза нейтрофилов с увеличением накопленной дозы облучения красного костного мозга ($p = 0,44$; $p = 0,01$).

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие, канцерогенез, нейтрофилы, моноциты, натуральные киллеры

Финансирование: работа проведена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года» (Государственный контракт № 11.313.21.2 от 15 июня 2021 г.).

Вклад авторов: Е. А. Блинова — обобщение первичного материала, анализ и обсуждение результатов, подготовка текста статьи; А. И. Котикова — статистическая обработка первичных данных; А. А. Аклеев, А. В. Аклеев — планирование исследования, редактирование текста, подготовка окончательного варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 4 от 23 августа 2022 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Евгения Андреевна Блинова
ул. Воровского, д. 68, корп. А, г. Челябинск, 454141, Россия; blinova@urcrm.ru

Статья получена: 26.08.2022 **Статья принята к печати:** 14.09.2022 **Опубликована онлайн:** 29.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.034

STATUS OF FACTORS OF INNATE IMMUNITY IN EXPOSED PEOPLE WHO SUBSEQUENTLY DEVELOPED CANCER

Blinova EA^{1,2}✉, Kotikova AI^{1,2}, Akleyev AA³, Akleyev AV^{1,2}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

³ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Currently, cancer is the major cause of mortality and disability among the working age population of the developed countries. Early diagnosis of tumors, that involves monitoring the health of people exposed to radiation, is one of the most pressing challenges faced by radiation medicine. The study was aimed to perform quantification and functional assessment of the system of neutrophil granulocytes, monocytes and natural killers (NK cells) in people who were diagnosed with tumors after chronic radiation exposure. Certain factors of innate immunity were assessed in 104 people, chronically exposed to low-dose radiation over a wide dose range. Of them 34 exposed individuals were later diagnosed with malignant tumors (MTs). We assessed the number of white blood cells, neutrophil granulocytes, eosinophils, basophils, monocytes and NK cells (CD16⁺/CD56⁺ lymphocytes) in peripheral blood, as well as phagocytic, lysosomal activity and intracellular oxygen-dependent metabolism of neutrophils and monocytes. Individuals, chronically exposed a few years before the development of MTs, showed a significant increase in the phagocytosis rate of monocytes (median 10.50 AU vs. 6 AU; $p = 0.05$) and lysosomal activity of neutrophils (median 482 AU vs. 435.5 AU; $p = 0.03$) compared to patients with no MTs. Assessment of the dose–response relationship in exposed people, who subsequently developed cancer, revealed a significant increase in the phagocytosis rate of monocytes as a function of the accumulated dose to thymus and peripheral lymphoid organs ($p = 0.45$; $p = 0.009$), and the increase in phagocytic activity of neutrophils with the increase in the accumulated dose to red bone marrow ($p = 0.44$; $p = 0.01$).

Keywords: chronic radiation exposure, carcinogenesis, neutrophils, monocytes, natural killers

Funding: the study was carried out with financial support from the Federal Medical Biological Agency of Russia within the framework of the Federal Target Program “Nuclear and Radiation Safety in 2016–2020 and until 2030” (State Contract № 11.313.21.2 of 15 June 2021).

Author contribution: Blinova EA — synthesis of primary data, analysis and discussion of the results, manuscript writing; Kotikova AI — statistical processing of primary data; Akleyev AA, Akleyev AV — study planning, manuscript editing, preparation of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Urals Research Center for Radiation Medicine (protocol № 4 of 23 August 2022). All patients submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Eugenia A. Blinova
Vorovsky, 68-A, Chelyabinsk, 454141, Russia; blinova@urcrm.ru

Received: 26.08.2022 **Accepted:** 14.09.2022 **Published online:** 29.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.034

Принято считать, что происходящие под влиянием ионизирующего излучения генетические и эпигенетические нарушения могут способствовать развитию злокачественных новообразований (ЗНО). Несомненно, важную роль в онкотрансформации клеток играет функциональное состояние защитных систем организма — репарации ДНК, остановки клеточного цикла, антиоксидантной системы и противоопухолевого иммунитета. В случае эффективной работы протективных механизмов облучение может не вызвать патологических изменений, однако при неэффективности той или иной системы защиты возникает риск развития онкопатологии.

Системный иммунитет играет важную роль в противоопухолевой защите организма [1]. В частности, нейтрофилы, моноциты и НК-клетки способны не только распознавать, лизировать и элиминировать из организма опухолевые и мутантные клетки, но и оказывать регуляторное воздействие на другие иммунокомпетентные клетки (макрофаги, Т- и В-лимфоциты, эозинофилы, базофилы) за счет выработки хемокинов, про- и противовоспалительных цитокинов, простагландинов, лейкотриенов [2, 3]. Кроме того, активированные макрофаги могут проявлять свою противоопухолевую активность благодаря лизирующим ферментам и свободным радикалам, повреждающим опухолевые клетки, а также продуцировать противоопухолевый цитокин ФНО α [4].

У жителей прибрежных сел р. Течи (Южный Урал), подвергшихся длительному низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов производственным объединением «Маяк» в р. Течу, в отдаленном периоде регистрировали изменения в иммунной системе, выражавшиеся в снижении количества лейкоцитов (главным образом за счет нейтрофилов и лимфоцитов) в крови, повышении лизосомальной активности нейтрофилов, некоторой супрессии внутриклеточного кислородозависимого метаболизма моноцитов и смещении баланса системы цитокинов в сторону провоспалительного ответа [5, 6]. Кроме того, у облученных лиц с облигатными формами предраковых заболеваний наблюдалось повышение абсолютного и относительного количества натуральных киллеров (CD16⁺/CD56⁺-клетки) в крови относительно группы облученных пациентов без предраковой патологии [7]. По результатам эпидемиологических исследований в когорте облученных на р. Тече лиц выявлены повышенные

риски заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей и лейкозов [8, 9].

Целью исследования было провести количественную и функциональную оценку системы нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и натуральных киллеров у лиц, которые подверглись хроническому радиационному воздействию и у которых впоследствии были диагностированы онкозаболевания.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено исследование систем нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и натуральных киллеров у 104 человек, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов в р. Течу производственным объединением «Маяк» в 50–60-х гг. XX века. Характер облучения подробно описан в книге [10].

Критериями включения в группы обследуемых были: постоянное проживание в одном из 41 села, расположенного на побережье р. Течи, в период с 1 января 1950 г. по 31 декабря 1960 г.; наличие рассчитанных на основе дозиметрической системы Techa River Dosimetry System-2016 (TRDS-2016) [11] индивидуальных кумулятивных доз облучения красного костного мозга (ККМ), тимуса и периферических лимфоидных органов. Критерии исключения: отсутствие информации об истории проживания на радиоактивно загрязненных территориях; диагностированные на момент обследования аутоиммунные, острые или хронические (период обострения) воспалительные заболевания, гемобласты, почечная или печеночная недостаточность, острое нарушение мозгового кровообращения в течение последних 3-х месяцев, онкозаболевания (для группы сравнения); прием препаратов, влияющих на изучаемые показатели (антибиотики, глюкокортикоиды, цитостатики).

Все обследованные лица были разделены на две группы: основная группа — 34 облученных лица, у которых впоследствии были диагностированы опухолевые заболевания (иммунологическое исследование проводили однократно за 1–7 лет до манифестации заболевания в период с 2007 по 2014 г.), группа сравнения — облученные лица без онкологических заболеваний (70 человек). В основной группе облученных лиц в период с 2009 по 2017 г. были диагностированы рак тонкого и толстого кишечника (пять случаев), желудка (два случая), мочевого

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Характеристика группы	Основная группа	Группа сравнения	<i>p</i>
	<i>n</i> = 34	<i>n</i> = 70	
Возраст на момент обследования, лет: M \pm SE (min–max)	69,09 \pm 0,78 (60–78)	68,96 \pm 0,53 (58–79)	0,89
Пол, <i>n</i> (%)	Мужчины	24 (34,2)	0,49
	Женщины	20 (58,8)	
Этническая принадлежность, <i>n</i> (%)	Славяне	30 (42,9)	0,87
	Тюрки	40 (57,1)	
Накопленная доза облучения ККМ, мГр: M \pm SE (min–max)	852 \pm 116 (5,37–3507)	826 \pm 72,40 (6,03–3394)	0,92
Накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр: M \pm SE (min–max)	140 \pm 20,7 (2,45–466)	127 \pm 13,70 (0,55–460)	0,58

Примечание: *n* — число исследуемых лиц; M \pm SE — среднее \pm ошибка среднего; *p* — уровень статистической значимости различий показателей между исследуемыми группами.

Таблица 2. Количество клеток врожденного иммунитета в крови у обследованных лиц

Показатель	Основная группа Me (Q ₁ -Q ₂)	Группа сравнения Me (Q ₁ -Q ₂)	Уровень значимости
Базофилы, %	0,85 (0-1)	0,60 (0-1)	0,9
Эозинофилы, %	2,00 (1-4)	2,25 (1-3,75)	0,78
Палочкоядерные нейтрофилы, %	5 (2,50-6,50)	3 (2-5,50)	0,08
Сегментоядерные нейтрофилы, %	53 (43,25-61)	52 (43,20-57)	0,95
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,36 (5,26-7,38)	6,58 (5,29-7,76)	0,66
Лимфоциты, %	31 (26,65-39,25)	34 (29,10-40,75)	0,71
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	1,83 (1,60-2,57)	2,14 (1,83-2,74)	0,22
Нейтрофилы, %	57,50 (52-63,50)	54 (48,25-59,95)	0,29
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	3,62 (2,81-4,76)	3,53 (2,76-4,37)	0,64
Моноциты, %	6 (3-7,25)	6,9 (4-9,15)	0,21
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,35 (0,20-0,51)	0,38 (0,27-0,61)	0,35
Натуральные киллеры (CD16 ⁺ /CD56 ⁺ -лимфоциты), %	16,25 (12,08-23,90)	14,40 (9,20-19,70)	0,09
Натуральные киллеры (CD16 ⁺ /CD56 ⁺ -лимфоциты), 10 ⁹ /л	0,30 (0,23-0,53)	0,31 (0,17-0,46)	0,24

Примечание: Me (Q₁-Q₂) — медиана (25–75-й процентиля).

пузыря (три случая), кожи (семь случаев), соединительной ткани глазницы и позадиглазного пространства (один случай), губы (один случай), молочной железы (два случая), женских половых органов, в том числе рак шейки матки (три случая), мужских половых органов (три случая), бронхов и легкого (четыре случая), а также остеосаркома черепа (один случай) и ЗНО неуточненных локализаций (два случая).

Исследуемые группы были сопоставимы по половому и этническому составу, а также возрасту на момент обследования и дозам облучения. Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Для исследования у лиц изучаемых групп забирали венозную кровь из локтевой вены в шприц с гепарином в объеме 10 мл. Количество лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, базофилов и моноцитов в периферической крови определяли с использованием автоматического гематологического анализатора Pentra 120 DX (HORIBA ABX S.A.S.; Франция). Для подсчета НК-клеток (CD16⁺/CD56⁺ лимфоциты) использовали моноклональные антитела к

соответствующим CD-рецепторам, меченные флуорохромами (конъюгированное антитело CD3-FITC/CD16⁺CD56-PE, Beckman Coulter; США). Анализ численности клеток проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter; США).

Фагоцитарную, лизосомную активность и интенсивность внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов определяли стандартными методами [12, 13]. Оценивали следующие показатели: активность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов (АФН, АФМ), интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов (ИФН, ИФМ), фагоцитарное число нейтрофилов и моноцитов (ФЧН, ФЧМ), интенсивность внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов в спонтанном и индуцированном вариантах (НСТН, НСТМ), лизосомную и суммарную лизосомную активность нейтрофилов и моноцитов (ЛАН, ЛАМ, СЛАН, СЛАМ). Подробное описание методик исследования приведено в ранее опубликованных статьях [7].

Таблица 3. Показатели функциональных характеристик клеток врожденного иммунитета у обследованных лиц

Показатель	Основная группа Me (Q ₁ -Q ₂)	Группа сравнения Me (Q ₁ -Q ₂)	Уровень значимости
АФМ, %	4,50 (2,25-10)	4 (2-5,50)	0,27
ИФМ, усл. ед.	10,50 (3,25-21,75)	6 (3-12)	0,05**
ФЧМ, усл. ед.	1,88 (1,04-2,95)	1,50 (1-2)	0,11
НСТМ спонтанный, %	53 (39,25-60,75)	52 (42-58,50)	0,66
НСТМ индуцированный, %	55,50 (42,25-63,75)	52 (42,50-58)	0,53
ЛАМ, усл. ед.	292 (214,50-373)	306,50 (254,50-370,25)	0,45
СЛАМ, усл. ед.	1,06 (0,44-1,53)	1,19 (0,62-1,94)	0,11
АФН, %	5 (3-7)	4 (2-6,50)	0,42
ИФН, усл. ед.	9 (5,25-18)	8 (4-11)	0,14
ФЧН, усл. ед.	1,78 (1,34-2,65)	1,80 (1,16-2,26)	0,48
НСТН спонтанный, %	56 (40,25-62)	50 (40,50-55)	0,61
НСТН индуцированный, %	56 (40,25-62)	50 (40,50-55)	0,61
ЛАН, усл. ед.	482 (408,50-613,50)	435,50 (362-491)	0,03**
СЛАН, усл. ед.	15,96 (11,27-25,28)	15,88 (11,19-19,51)	0,45

Примечание: Me (Q₁-Q₂) — медиана (25–75-й процентиля); ** — значимые различия между исследуемыми группами.

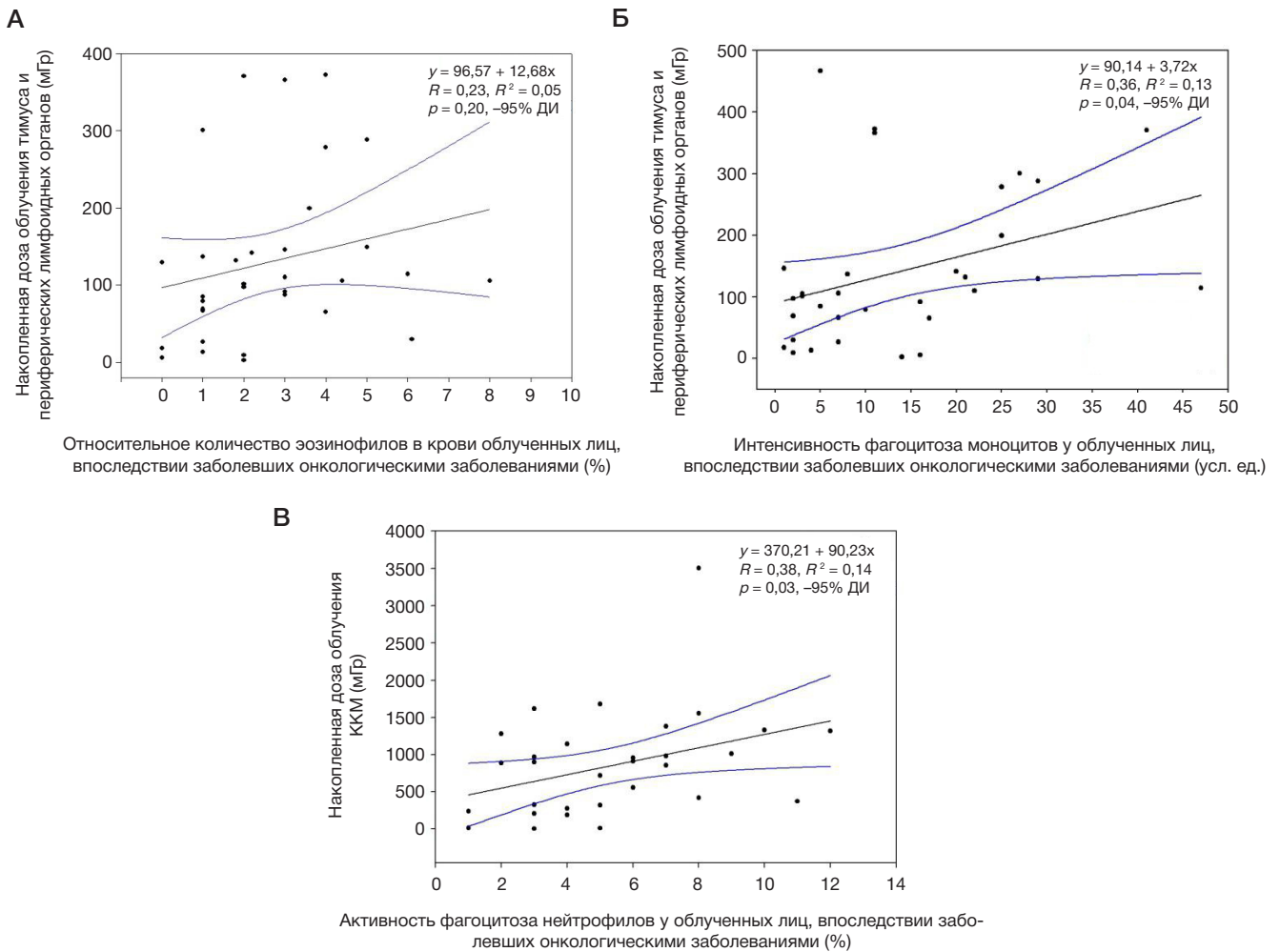


Рис. 1. Линейный регрессионный анализ дозовых зависимостей в группе облученных лиц, впоследствии заболевших онкологическими заболеваниями, для показателей: **А** — относительное количество эозинофилов, **Б** — интенсивность фагоцитоза моноцитов, **В** — активность фагоцитоза нейтрофилов

Во всех случаях для учета реакций применяли метод световой микроскопии с использованием микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss; Германия).

Статистическую обработку первичных данных проводили в программе SigmaPlot, версия 12.5 (SYSTAT Software; США) с использованием U-критерия Манна-Уитни для сравнения двух массивов данных. Выполнили корреляционный анализ по методам Спирмена и Пирсона, а также линейный регрессионный анализ. Статистически значимыми считали результаты, уровень значимости которых был ниже 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено сравнение количества форменных элементов в периферической крови, а также показателей функциональной активности нейтрофилов и моноцитов в исследуемых группах. Результаты представлены в виде медианы (Me) и 25–75-х перцентилей (Q_1-Q_2) (табл. 2, 3).

В результате исследования не выявлено значимых различий по показателям клеточного иммунитета у облученных лиц, впоследствии заболевших онкологическими

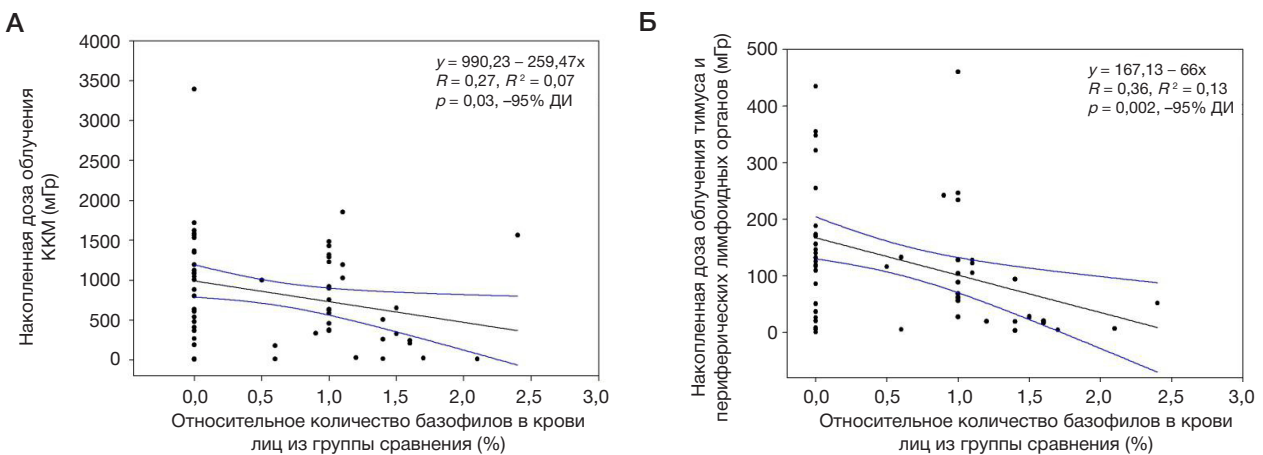


Рис. 2. Линейный регрессионный анализ дозозависимого снижения базофилов у лиц из группы сравнения для **А** — накопленной дозы облучения ККМ, **Б** — накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов

заболеваниями, по сравнению с облученными лицами без онкопатологии.

При анализе функциональных характеристик систем нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов обнаружено значимое увеличение интенсивности фагоцитоза моноцитов и лизосомальной активности нейтрофилов у лиц, впоследствии заболевших онкологическими заболеваниями, по сравнению с группой лиц без ЗНО.

При анализе дозовых зависимостей у облученных лиц, впоследствии заболевших онкологическими заболеваниями, обнаружено значимое увеличение процентного содержания эозинофилов в крови в зависимости от дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (по методу Спирмена — $\rho = 0,38$, $p = 0,03$). Однако анализ линейной регрессии не показал достоверных результатов (рис. 1А). Также отмечено дозозависимое увеличение интенсивности фагоцитоза моноцитов с увеличением накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (по методу Спирмена — $\rho = 0,45$, $p = 0,009$, по методу Пирсона — $r = 0,36$, $p = 0,04$) и активности фагоцитоза нейтрофилов с увеличением накопленной дозы облучения ККМ (по методу Спирмена — $\rho = 0,44$, $p = 0,01$, по методу Пирсона — $r = 0,38$, $p = 0,03$). Результаты линейного регрессионного анализа для этих показателей представлены на рис. 1Б, В.

В группе сравнения имели место иные зависимости: показано значимое снижение относительного количества базофилов в крови с увеличением накопленной дозы облучения ККМ (по методу Спирмена — $\rho = -0,26$, $p = 0,03$, по методу Пирсона — $r = -0,27$, $p = 0,03$), и накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (по методу Спирмена — $\rho = -0,42$, $p = 0,0005$, по методу Пирсона — $r = -0,32$, $p = 0,009$). Результаты линейного регрессионного анализа для этих показателей представлены на рис. 2.

Также обнаружено значимое увеличение активности фагоцитоза моноцитов с увеличением накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (по методу Спирмена — $\rho = 0,27$, $p = 0,03$). Однако анализ линейной регрессии не показал достоверных результатов (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что спустя более 60-ти лет после начала хронического радиационного воздействия за несколько лет до диагностирования онкологического заболевания у облученных лиц наблюдается значимое повышение интенсивности фагоцитоза моноцитов и лизосомальной активности нейтрофилов по сравнению с пациентами, не заболевшими ЗНО. Кроме того, установлено дозозависимое увеличение интенсивности фагоцитоза моноцитов с увеличением накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов и активности фагоцитоза нейтрофилов с увеличением накопленной дозы облучения ККМ.

Ряд исследований свидетельствует о важной роли нейтрофилов в противоопухолевом иммунитете. Так, в экспериментах на мышах линии SR/CR показано, что нейтрофильные гранулоциты первыми из иммунных клеток мигрируют в опухолевую ткань и принимают участие в реализации феномена спонтанной регрессии опухолей разных гистологических типов [14]. Механизм цитолитического действия нейтрофилов на опухолевые клетки связан с выработкой этими клетками активных

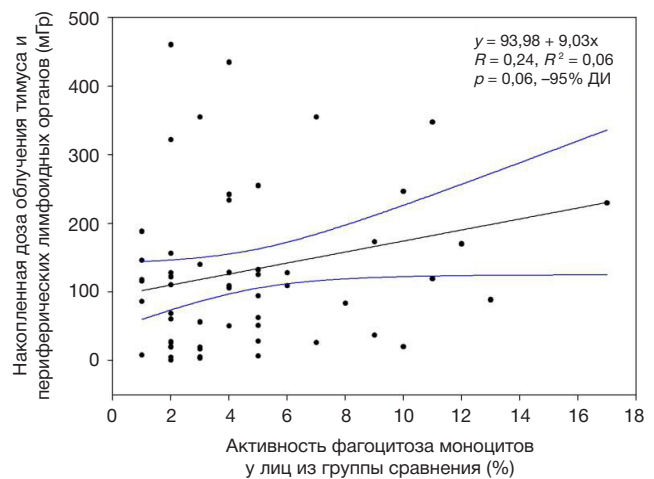


Рис. 3. Линейный регрессионный анализ дозозависимого увеличения индекса активности фагоцитоза моноцитов у лиц из группы сравнения

форм кислорода и азота, причем главенствующую роль в процессе гибели опухолевых клеток играет некроз [14].

Вместе с тем, нейтрофилы и моноциты могут способствовать инвазивному росту опухоли, ее васкуляризации и метастазированию [15, 16], а селективно опосредованная адгезия атипичных клеток к мембране нейтрофильных гранулоцитов может приводить к их гематогенной диссеминации [17]. Кроме того, избыток в строме опухоли инфильтрирующих клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги, тучные клетки и нейтрофилы, соотносится не только с повышением уровня ангиогенеза, но и неблагоприятным прогнозом [18].

Стоит заметить, что в ранее проведенных ретроспективных динамических исследованиях клеточного состава периферической крови у лиц, облученных на р. Тече, впоследствии заболевших хроническим миелоидным лейкозом и острым лейкозом, было установлено, что количество нейтрофилов и их состав являются предикторами, позволяющими прогнозировать повышенную вероятность развития радиационно-индуцированных лейкозов в ранние сроки после начала облучения [19]. Вероятно, наблюдаемые нами за несколько лет до манифестации клинически диагностируемых раков изменения в функциональной активности нейтрофилов и моноцитов у хронически облученных людей могут быть ответом на увеличение количества онкотрансформированных клеток. Однако стоит отметить, что на интенсивность фагоцитоза моноцитов и лизосомальной активности нейтрофилов также могут влиять факторы нерадиационной природы, в том числе вредные привычки и образ жизни.

В связи с этим на данном этапе работы невозможно сделать окончательные выводы о рассмотрении выявленных показателей в качестве кандидатных биологических маркеров развития ЗНО в отдаленные сроки после начала облучения. Для формирования заключения об отнесении данных показателей к предикторам развития ЗНО необходимы дополнительные исследования, направленные на изучение чувствительности и специфичности.

ВЫВОДЫ

В результате исследования у лиц, облученных в широком диапазоне доз, в отдаленном периоде после хронического радиационного воздействия за несколько лет до развития ЗНО (ЗНО диагностированы с 2009 по 2017 г.) выявлено значимое повышение интенсивности фагоцитоза

моноцитов и лизосомальной активности нейтрофилов по сравнению с облученными в сопоставимых дозах людьми без ЗНО. В отдаленном периоде выявлены дозозависимые

изменения интенсивности фагоцитоза моноцитов и активности фагоцитоза нейтрофилов у хронически облученных лиц.

Литература

- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*. 2013; 14 (10): 1014–22. DOI: 10.1038/ni.2703.
- Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН, 2009; 207 с.
- Петров Р. В., Хаитов Р. М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011; 608 с.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*. 2010; 22 (2): 231–37. DOI: 10.1016/j.coi.2010.01.009.
- Аклеев А. А. Иммунный статус человека в отдаленном периоде хронического радиационного воздействия. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2020; 65 (4): 29–35. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35.
- Кодинцева Е. А., Аклеев А. А., Блинова Е. А. Цитокиновый профиль лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки после облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021; 61 (5): 495–503. DOI: 10.31857/S0869803121050076.
- Блинова Е. А., Аклеев А. А., Кодинцева Е. А., Аклеев А. В. Исследование функционального состояния системы нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и натуральных киллеров у лиц, с облигатными формами предраковых заболеваний, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Южно-Уральский медицинский журнал*. 2021; 2: 5–17.
- Schonfeld S, Krestinina LY, Epifanova S, et al. Solid cancer mortality in the Techa River Cohort (1950–2007). *Radiation Research*. 2013; 179: 183–9.
- Крестинина, Л. Ю., Силкин С. С., Дегтева М. О. и др. Риск смерти от болезней системы кровообращения в Уральской когорте аварийно-облученного населения за 1950–2015 годы. *Радиационная гигиена*. 2019; 12 (1): 52–61. DOI: 10.21514/1998-426X-2019-12-1-52-61.
- Аклеев А. В., редактор. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Челябинск: Книга, 2016; 390 с.
- Дегтева М. О., Напье Б. А., Толстых Е. И. и др. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475.
- Маянский А. Н., Виксман М. К. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: методические рекомендации. Казань, 1979; 11 с.
- Фрейдлин И. С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Ленинград, 1986; 37 с.
- Koch J, Hau J, Pravsgaard CJ, et al. Immune cells from SR/CR mice induce the regression of established tumors in BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2013; 8 (5). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059995>.
- Нестерова И. В., Ковалева С. В., Чудилова Г. А. и др. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты. *Иммунология*. 2012; 33 (5): 281–7.
- Queen MM, Ryan RE, Holser RG, et al. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Research*. 2005; 65: 8896–904. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1734.
- Thomas SN, Zhu F, Schnaar RL, et al. Carcinoembryonic antigen and CD44 variant isoforms cooperate to mediate colon carcinoma cell adhesion to E- and L-selectin in shear flow. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283 (23): 15647–55. DOI: 10.1074/jbc.M800543200.
- De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6 (1): 24–37. DOI: 10.1038/nrc1782.
- Аклеев А. А., Долгушин И. И., Блинова Е. А. Исследование динамики числа нейтрофилов в крови у облученных лиц до развития острых лейкозов. *Российский иммунологический журнал*. 2019; 13 (4, 22): 1423–5.

References

- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*. 2013; 14 (10): 1014–22. DOI: 10.1038/ni.2703.
- Dolgushin II, Andreeva YuS, Savochkina AYU. Neutrophil traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. М.: Izdatelstvo RAMN, 2009; 207 p. Russian.
- Petrov RV, Khaïtov RM. Immunogens and vaccines of a new generation. М.: GEOTAR-Media, 2011; 608 p. Russian.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*. 2010; 22 (2): 231–37. DOI: 10.1016/j.coi.2010.01.009.
- Akleyev AA. Immune status of a man long after chronic radiation exposure. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020; 65 (4): 29–35. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35. Russian.
- Kodintseva EA, Akleyev AA, Blinova EA. The cytokine profile of chronically irradiated people in long terms after the beginning of irradiation. *Radiation biology Radioecology*. 2021; 61 (5): 495–503. DOI: 10.31857/S0869803121050076. Russian.
- Blinova EA, Akleyev AA, Kodintseva EA, Akleyev AV. The study of the functional status of the system of neutrophilic granulocytes, monocytes and natural killers in chronically exposed individuals with obligate forms of pre-malignant conditions. *South Ural Medical Journal*. 2021; 2: 5–17. Russian.
- Schonfeld S, Krestinina LY, Epifanova S, et al. Solid cancer mortality in the Techa River Cohort (1950–2007). *Radiation Research*. 2013; 179: 183–9.
- Krestinina LYU, Silkin SS, Degteva MO, Akleyev AV. Risk analysis of the mortality from the diseases of the circulatory system in the Ural cohort of emergency-irradiated population for the years 1950–2015. *Radiation Hygiene*. 2019; 12 (1): 52–61. DOI: 10.21514/1998-426X-2019-12-1-52-61. Russian.
- Akleyev AV, editor. Consequences of radioactive contamination of the river Techa. Chelyabinsk: Book, 2016; 400 p. Russian.
- Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa river. *Medical radiology and radiation safety*. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475. Russian.
- Mayanskii AN, Viksman MK. A method for assessing the functional activity of human neutrophils by the reduction reaction of nitroblue tetrazolium: guidelines. Kazan, 1979; 11 p. Russian.
- Freidlin IS. Methods for studying phagocytic cells in assessing the immune status of a person: a textbook. Leningrad, 1986; 37 p. Russian.

14. Koch J, Hau J, Pravsgaard CJ, et al. Immune cells from SR/CR mice induce the regression of established tumors in BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2013; 8 (5). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059995>.
15. Nesterova IV, Kovaleva SV, Chudilova GA, et al. The dual role of neutrophils in the antitumor protection. *Immunology*. 2012; 33 (5): 281–7. Russian.
16. Queen MM, Ryan RE, Holser RG, et al. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Research*. 2005; 65: 8896–904. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1734.
17. Thomas SN, Zhu F, Schnaar RL, et al. Carcinoembryonic antigen and CD44 variant isoforms cooperate to mediate colon carcinoma cell adhesion to E- and L-selectin in shear flow. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283 (23): 15647–55. DOI: 10.1074/jbc.M800543200.
18. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6 (1): 24–37. DOI: 10.1038/nrc1782.
19. Akleyev AA, Dolgushin II, Blinova EA. Study of neutrophil count dynamics in exposed persons during the period prior to acute leukemias development. *Russian journal of immunology*. 2019; 13 (4, 22): 1423–5.

ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ ГИБКИХ НАВЫКОВ ЗАВЕДУЮЩИМИ ОТДЕЛЕНИЯМИ

А. В. Кочубей¹ ✉, С. Ю. Яроцкий¹, В. В. Кочубей², О. А. Евдошенко¹¹ Академия постдипломного образования федерального государственного бюджетного учреждения Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия

Успешное управление невозможно в отсутствии гибких навыков. Целью работы было оценить частоту применения гибких навыков заведующими отделениями на основании обратной связи от врачей отделений. Для этого провели заочный опрос 433 врачей по анкете из руководства «360 Sample Competencies». В анкете 20 утверждений, разбитых на пять блоков: самоконтроль и критичность к своим действиям, достижение результата, лидерство, общение, командная работа. Все утверждения имеют пять вариантов ответа от «всегда» до «никогда». Ключ расшифровки относит оцениваемого в зависимости от частоты использования гибких навыков к одной из пяти групп: лидеры, ведущие, типичные, отстающие, аутсайдеры. Для обработки результатов применили непараметрические методы анализа. В результате опроса в группу лидеров вошли 8,6% оцениваемых, в группу ведущих — 15,8%, в группу типичных — 23,4%, в группу отстающих — 30,3%, в группу аутсайдеров — 21,9%. Обнаружена корреляция оценок по блокам ($0,973 \leq R \geq 0,967$; $p < 0,001$). Возраст, стаж и пол респондентов ($p > 0,05$), а также пол оцениваемого ($p > 0,05$) не дают значимой разницы оценок. Оценки «общения», «командной работы», контроля эмоций, постановки сложных целей, расстановки приоритетов ниже у врачей стационаров, чем врачей поликлиник ($p < 0,05$). Опросник можно рекомендовать как инструмент обратной связи; гибкие навыки заведующих отделениями нуждаются в развитии и сильнее страдают гибкие навыки в сферах «достижение результата», «лидерство» и «самоконтроль и критичность к своим действиям».

Ключевые слова: заведующие отделениями, гибкие навыки, обратная связь, оценка персонала**Вклад авторов:** А. В. Кочубей — идея, дизайн, координация исследования, формулирование выводов, подготовка рукописи; С. Ю. Яроцкий — анализ, планирование исследования, интерпретация данных, обсуждение результатов; В. В. Кочубей — работа с литературой, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; О. А. Евдошенко — статистический анализ и интерпретация результатов.✉ **Для корреспонденции:** Аделина Владимировна Кочубей
Волоколамское шоссе, д. 91, г. Москва, 125371, Россия; kochoubeya@gmail.com**Статья получена:** 02.07.2022 **Статья принята к печати:** 28.07.2022 **Опубликована онлайн:** 23.08.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.029

EVALUATION OF THE USE OF SOFT SKILLS BY DEPARTMENT HEADS

Kochubey AV¹ ✉, Yarotsky SYu¹, Kochubey VV², Evdoshenko OA¹¹ Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia² Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Successful management cannot take place without soft skills. The study was aimed to assess the frequency of using soft skills by heads of clinical departments based on feedback from physicians working at the departments. For that an online survey of 433 physicians was conducted with the use of the questionnaire taken from the 360 Sample Competencies Guide. The questionnaire included 20 statements divided into five items: self-awareness, drive for results, leadership, communication, teamwork. The respondents were given five response options per statement: from “always” to “never”. The clue referred the assessed individual to one of five groups based on the frequency of using soft skills: leaders, key management, typical management, underachievers, outsiders. Nonparametric methods of analysis were used for data processing. Based on the survey data, 8.6% of assessed individuals joined the group of leaders, while 15.8% were referred to the group of key management, 23.4% to the group of typical management, 30.3% to the group of underachievers, and 21.9% to the group of outsiders. The scores of items correlated with each other ($0.973 \leq R \geq 0.967$; $p < 0.001$). The respondents' age, years of service and gender ($p > 0.05$), as well as the assessed individuals' gender ($p > 0.05$) provided no significant differences between the scores. The scores obtained for “communication”, “teamwork”, emotional control, setting challenging goals, and prioritizing work were lower in the hospital-based physicians than in those who worked in outpatient settings ($p < 0.05$). The questionnaire can be recommended as a feedback tool. Soft skills of the department heads require further development. Soft skills that belong to the items “drive for results”, “leadership”, and “self-awareness” are worst affected.

Keywords: heads of clinical departments, soft skills, feedback, staff evaluation**Author contribution:** Kochubey AV — concept, design, research coordination, conclusions, manuscript writing; Yarotsky SYu — analysis, research planning, data interpretation, discussion; Kochubey VV — literature review, data analysis and interpretation, manuscript writing; Evdoshenko OA — statistical analysis and data interpretation.✉ **Correspondence should be addressed:** Adelina V. Kochubey
Volokolamskoye shosse, 91, Moscow, 125371, Russia; kochoubeya@gmail.com**Received:** 02.07.2022 **Accepted:** 28.07.2022 **Published online:** 23.08.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.029

Управление структурным подразделением — трудовая функция заведующего отделением [1]. Успешное управление невозможно при отсутствии гибких навыков, к которым относят коммуникативные навыки, навыки межличностного общения, организаторские способности, а также лидерские качества [2]. Понятно, что все медицинские работники должны, например, управлять эмоциями при взаимодействии с пациентами, но заведующие отделениями не только взаимодействуют с пациентами и

их близкими, коллегами, подчиненными, руководителями, контролерами и экспертами, но зачастую обязаны играть роль демпфера в конфликтах между сторонами.

В последние годы использовать термин «гибкие навыки» стали шире, чтобы охватить различные качества, черты, ценности и признаки [3].

Гибкие навыки дополняют жесткие навыки, повышают производительность работника любой сферы, в том числе здравоохранения [4], и необходимы для личностного роста

[5]. Гибкие навыки повышают уверенность, социальные компетентность и участие, оптимизм, дают людям энергию для личного и профессионального успеха [6].

Медицинские работники, прошедшие обучение навыкам эмпатии, демонстрируют лучшее взаимодействие с пациентами [7–10], совершенствовались коммуникативные навыки — в большей степени помогают пациентам преодолеть страх перед лечением [11]. Выявление и расстановка приоритетов межличностных навыков улучшают качество работы врача и организатора здравоохранения [2, 12].

Гибкие или социальные навыки связаны с особенностями личности [13], образом жизни, их можно укрепить с помощью соответствующей подготовки [14–16]. К сожалению, гибкие навыки плохо преподаются в традиционной системе медицинского образования [17–19] и они формируются методом проб и ошибок [20].

Российская научная электронная библиотека *elibrary.ru* находит по ключевым словам «гибкие навыки» 279 научных работ, опубликованных в 2017–2022 гг. Из них две посвящены формированию гибких навыков у врачей и студентов медицинских вузов [21, 22]. Исследований по изучению состояния гибких навыков у заведующих отделений или у руководителей медицинских организаций на *elibrary* не обнаружено.

Важность гибких навыков для заведующих отделений и отсутствие подобных исследований в отечественной базе данных определили цель исследования: оценить использование гибких навыков заведующими отделениями на основании обратной связи от врачей отделений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было основано на заочном (по электронной почте) опросе врачей, получивших дополнительное профессиональное образование в Академии постдипломного образования ФНКЦ ФМБА. Для опроса использовали анкету из руководства по проведению опросов обратной связи «360-Sample-Competencies-Quickstart-Guide» [23]. Анкета содержит пять блоков: самоконтроль и критичность к своим действиям (№ 1–4), достижение результата (№ 5–8), лидерство (№ 9–12), общение (№ 13–16), командная работа (№ 17–20). Общее число утверждений 20. Варианты ответов на все утверждения одинаковы: всегда / часто / в половине случаев / редко / никогда.

Анкета была переведена на русский язык двумя независимыми профессиональными переводчиками с согласованием прямых переводов и обратным переводом. Базовую версию анкеты проверили на фокус-группе в 14 человек. В ходе очного устного интервью удостоверились, что переведенные элементы сохранили исходное значение. Внутренняя согласованность анкеты удовлетворяет существующим требованиям, коэффициент α -Кронбаха —

0,947. Ретестовая надежность проверена через 74 дня, значимость внутриклассового коэффициента корреляции $< 0,001$. Внутреннюю согласованность анкеты и ретестовую надежность проверяли на группе 107 человек, в которую входили врачи (возраст (медиана) — 48, из них мужчин 39 (36,4%)). Среди респондентов работали в стационаре 68 человек (63,6%).

Согласно имеющемуся ключу к анкете, оцениваемые лица могут быть разделены на пять групп: лидеры (демонстрирующие навык «всегда»), ведущие (демонстрирующие навык «часто»), типичные (демонстрирующие навык «в половине случаев»), отстающие (демонстрирующие навык «редко»), аутсайдеры (не демонстрирующие навык «никогда»).

Характеристика респондентов

Общее число валидных для оценки анкет составило 433, что соответствует выборке для исследования повышенной точности по методу К. А. Отдельновой [24]. Характеристика респондентов представлена в табл. 1.

Респондентов просили также указать пол оцениваемого заведующего. Среди оцениваемых было 250 (57,7%) мужчин и 183 (42,3%) женщин. Выделение указанных характеристик продиктовано результатами сторонних и собственных исследований о влиянии на результаты обратной связи возраста, стажа, пола, трудовой нагрузки респондента, а также пола оцениваемого [25–27].

Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS, версия 23 (IBM Company; США). В связи со значительным отклонением цифрового ряда возраста, стажа, оценок по блокам и утверждениям от нормального распределения использовали медианы и применяли методы непараметрического анализа. Разницу медиан оценивали по медианному тесту для двух независимых выборок и тесту Уилкоксона для зависимых выборок. Корреляционный анализ по Спирмену применяли для определения связей оценок с возрастом и стажем. Выполнен также частотный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опрос врачей показал, что большинство заведующих отделениями не во всех случаях применяют гибкие навыки в областях «самоконтроль и критичность к своим действиям», «достижение результатов», «лидерство», «общение», «командная работа». На рисунке представлено общее число заведующих в пяти группах, выделенных по частоте использования гибких навыков, по перечню утверждений из расчета 8 660 оценок = 20 утверждений, умноженные на 433 оцененных заведующих отделениями.

Группа лидеров, всегда использующих отдельные гибкие навыки, составит 8,6% в структуре оценок, ведущих — 15,8%, типичных — 23,4%, отстающих — 30,3%, аутсайдеров, никогда не использующих гибкие навыки, — 21,9%.

Таблица 1. Характеристика респондентов

Признаки	Число, абс. (%)	Возраст, медиана (лет)	Стаж, медиана (лет)
Все респонденты	433	48	23
Женщины	294 (67,9)	48	22,5
Мужчины	139 (32,1)	48	23
Работали в стационарных условиях	276 (63,7)	49	24
Работали в амбулаторных условиях	157 (36,3)	45	20

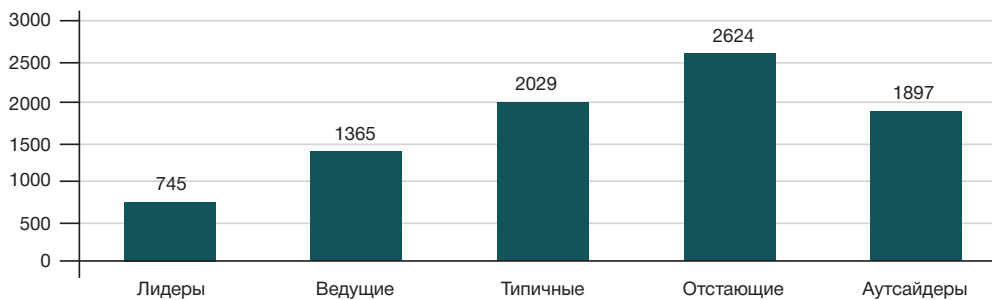


Рис. Размер групп по всему перечню утверждений

Доля заведующих, которые всегда демонстрируют отдельные гибкие навыки, составляет не более 10% (табл. 2). До 20% заведующих используют различные гибкие навыки часто, до 33,9% — в половине случаев, до 38,3% — редко. Никогда не применяли отдельные социальные навыки до 35,8% оцениваемых.

Максимально положительный балл для каждого утверждения — 5.

Медиана по блоку «самоконтроль и критичность к своим действиям» составила 3,50 балла, по отдельным утверждениям блока не превышала 3,68. Наименьший балл в первом блоке получило утверждение о контроле заведующими своих эмоций. Медианы по блоку ($p = 307$) и отдельным утверждениям одинаковы у респондентов разного пола ($0,929 \leq p \leq 0,211$) и по блоку ($p = 0,256$) и отдельным утверждениям одинаковы для оцениваемых разного пола ($0,928 \leq p \leq 0,150$). Медианы по блоку ($p = 0,051$) и утверждениям под номерами 2 (об осознании влияния действий) и 4 (поиски обратной связи) одинаковы у респондентов, работающих в стационарных и амбулаторных условиях ($0,425 \leq p \leq 0,258$). Медианы по утверждениям под номерами 1 (о контроле эмоций) и 3 (об обучении на ошибках) выше у респондентов, работающих в амбулаторных условиях ($p = 0,029$; $p = 0,047$). Корреляции оценок по блоку «самоконтроль и критичность к своим действиям» и отдельным его утверждениям с возрастом и стажем не обнаружено ($0,355 \leq p \leq 0,098$).

По блоку «достижение результатов» медиана равна 3,75, по отдельным утверждениям не превышает 3,66. Наименьший балл в блоке получило утверждение под номером 6 (о помощи другим в достижении их целей). На оценку по блоку ($p = 0,408$; $p = 0,897$) и по утверждениям пол респондентов ($0,408 \leq p \leq 0,083$) и пол оцениваемого ($1,000 \leq p \leq 0,216$) не влияют. Работающие в стационарах оценили заведующих ниже, чем работающие в поликлиниках, по утверждениям под номерами 5 (о постановке сложных целей; $p = 0,001$) и 7 (о расстановке приоритетов; $p = 0,009$). По блоку в целом ($p = 0,230$) и утверждениям под номерами 6 (о помощи другим в достижении целей; $p = 0,230$) и 8 (о преодолении препятствий при достижении целей; $p = 0,075$) значимой разницы оценок среди врачей стационаров и поликлиник не обнаружено. Возраст и стаж респондентов не влияли на их оценку ($0,364 \leq p \leq 0,083$) в этом блоке.

Медиана по блоку «лидерство» равна 3,50 балла. Худшую оценку в блоке получило утверждение под номером 10 (о внимании к идеям и мнению членов команды). Оценка по блоку ($p = 0,574$) и отдельным утверждениям блока у респондентов разного пола ($0,630 \leq p \leq 0,400$) одинакова. На оценку тоже не влиял пол оцениваемого (блок, $p = 0,908$; утверждения, $0,908 \leq p \leq 0,598$). Респонденты, работающие в стационарных условиях, дали худшие оценки по утверждению под

номером 9 (о воплощении стратегии; $p = 0,009$), чем врачи, работающие в амбулаторных условиях. По блоку ($p = 0,309$) и другим утверждениям разницы среди респондентов, работающих в стационарах и поликлиниках, не обнаружено ($0,309 \leq p \leq 0,127$). Возраст и стаж не отразились на оценке ($0,270 \leq p \leq 0,180$).

Медиана по блоку «общение» — 4,0 балла. По утверждению под номером 14 (об адаптации общения заведующих к потребностям аудитории) был выставлен наименьший балл в блоке. Мужчины и женщины дали разные оценки по утверждению 14 ($p = 0,035$), но одинаковые по блоку ($p = 0,124$) и остальным утверждениям ($0,452 \leq p \leq 0,082$). Заведующие мужского и женского пола были оценены одинаково по блоку ($p = 0,111$) и отдельным утверждениям ($0,752 \leq p \leq 0,106$). Врачи стационаров ниже, чем врачи поликлиник, оценили заведующих по блоку ($p = 0,003$) и отдельным утверждениям блока ($0,033 \leq p \leq 0,002$). Не было обнаружено разницы в оценках «общения» среди респондентов разного возраста и стажа ($0,174 \leq p \leq 0,064$).

Блок «работа в команде» имеет медиану 4,0 балла. Минимально в блоке была оценена эффективность работы заведующих в команде. Респонденты разного пола дали одинаковые оценки по блоку ($p = 0,556$) и отдельным утверждениям ($0,556 \leq p \leq 0,167$). «Работа в команде» заведующих разного пола оценена респондентами одинаково по блоку ($p = 0,556$) и отдельным утверждениям ($0,556 \leq p \leq 0,167$). Женщины-заведующие получили такую же оценку, что и заведующие мужского пола по блоку ($p = 0,224$) и отдельным утверждениям ($0,559 \leq p \leq 0,106$). По блоку ($p = 0,018$) и отдельным утверждениям блока «работа в команде» ($0,018 \leq p \leq 0,002$) врачи стационаров дали своим заведующим худшую оценку, чем врачи поликлиник. Возраст и стаж не оказали влияния на оценку ($0,167 \leq p \leq 0,059$) работы в команде заведующих отделениями.

Блок «самоконтроль и критичность к своим действиям» получил одинаковую оценку респондентов с блоком «лидерство» ($p = 0,884$), но разную по сравнению с блоками «достижение результата» ($p < 0,001$), «общение» ($p < 0,001$) и «командная работа» ($p < 0,001$). Блок «достижение результата» получил значимо иную оценку по сравнению со всеми другими блоками ($p < 0,001$). Оценки блока «лидерство» отличаются от оценок блоков «общение и «командная работа» ($p < 0,001$). Оценка блока «общение» отлична от оценки блока «командная работа» ($p < 0,001$). Обнаружена сильная прямая достоверная корреляционная связь между всеми блоками ($0,973 \leq R \leq 0,967$; $p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опрос показал, что большинство оцениваемых заведующих отделениями имеют и демонстрируют в работе гибкие

Таблица 2. Результаты опроса врачей о заведующих отделениями

Утверждения	Ответы $\pm m_p$ (%)					Медиана (лет)
	Всегда	Часто	В половине случаев	Редко	Никогда	
Блок 1. Самоконтроль и критичность к своим действиям						3,5
Контролирует свои эмоции, даже в сложных стрессовых ситуациях	9,0 \pm 0,458	18,7 \pm 0,433	27,9 \pm 0,408	24,9 \pm 0,416	19,4 \pm 0,431	3,31
Демонстрирует осознание того, как его/ее действия и решения влияют на других	2,8 \pm 0,474	17,6 \pm 0,436	33,9 \pm 0,391	25,9 \pm 0,414	19,9 \pm 0,430	3,42
Рассматривает ошибки и неудачи как возможности для обучения	6,7 \pm 0,464	14,8 \pm 0,444	26,8 \pm 0,411	30,5 \pm 0,401	21,2 \pm 0,427	3,53
Активно ищет обратную связь от других о своей работе	6,5 \pm 0,465	17,8 \pm 0,436	15,2 \pm 0,443	38,1 \pm 0,378	22,4 \pm 0,423	3,68
Блок 2. Достижение результата						3,75
Ставит перед собой сложные цели	7,4 \pm 0,462	12,7 \pm 0,449	22,6 \pm 0,423	33,7 \pm 0,391	23,6 \pm 0,420	3,66
Помогает другим достигать поставленных перед ними целей	9,9 \pm 0,456	20,6 \pm 0,428	30,3 \pm 0,401	19,4 \pm 0,431	19,9 \pm 0,430	3,18
Расставляет приоритеты в своей работе, исходя из потребностей организации и ее клиентов	8,8 \pm 0,459	15,7 \pm 0,441	22,6 \pm 0,423	30,3 \pm 0,401	22,6 \pm 0,423	3,54
Идет к достижению поставленных целей, даже сталкиваясь с препятствиями и проблемами	9,5 \pm 0,457	16,9 \pm 0,438	21,2 \pm 0,427	33,0 \pm 0,393	19,4 \pm 0,431	3,48
Блок 3. Лидерство						3,5
Воплощает стратегию организации в конкретные действия/планы	8,8 \pm 0,459	16,4 \pm 0,439	24,0 \pm 0,419	29,3 \pm 0,404	21,5 \pm 0,426	3,48
Принимает во внимание идеи и мнения членов команды при принятии решений	8,1 \pm 0,461	13,2 \pm 0,448	31,9 \pm 0,397	26,6 \pm 0,412	20,3 \pm 0,429	3,44
Помогает членам команды решать проблемы, связанные с работой	8,1 \pm 0,461	12,5 \pm 0,450	30,9 \pm 0,399	26,3 \pm 0,413	22,2 \pm 0,424	3,49
Возлагает на членов команды ответственность за достижение поставленных перед ними целей	7,4 \pm 0,462	11,8 \pm 0,451	27,0 \pm 0,411	34,4 \pm 0,389	19,4 \pm 0,431	3,56
Блок 4. Общение						4
Активно слушает других	8,5 \pm 0,460	14,1 \pm 0,445	21,5 \pm 0,426	33,9 \pm 0,391	21,9 \pm 0,425	3,6
Адаптирует общение к потребностям аудитории	9,5 \pm 0,457	15,0 \pm 0,443	18,7 \pm 0,433	36,5 \pm 0,383	20,3 \pm 0,429	3,59
Общается четко и лаконично	7,9 \pm 0,461	12,9 \pm 0,449	16,4 \pm 0,439	38,1 \pm 0,378	24,7 \pm 0,417	3,77
Делится опытом при общении с сотрудниками	8,1 \pm 0,461	11,8 \pm 0,451	23,8 \pm 0,420	32,1 \pm 0,396	24,2 \pm 0,418	3,65
Блок 5. Командная работа						4
Эффективно работает в команде	9,5 \pm 0,457	14,3 \pm 0,445	18,7 \pm 0,433	35,1 \pm 0,387	22,4 \pm 0,423	3,63
Дает конструктивную и полезную другим обратную связь	7,9 \pm 0,461	13,6 \pm 0,447	14,5 \pm 0,444	38,3 \pm 0,377	25,6 \pm 0,415	3,8
Относится к другим с уважением	9,7 \pm 0,457	14,8 \pm 0,444	18,0 \pm 0,435	33,3 \pm 0,392	24,2 \pm 0,418	3,64
Ценит и уважает различия между членами команды	5,3 \pm 0,468	9,5 \pm 0,457	22,4 \pm 0,423	27,0 \pm 0,411	35,8 \pm 0,385	3,97

навыки в областях «самоконтроль и критичность к своим действиям», «достижение результатов», «лидерство», «общение», «командная работа». Но основная масса заведующих, 53,7% (30,3 \pm 23,4%), применяют их в половине случаев и реже, и поэтому могут быть отнесены к группе типичных и отстающих. Только 24,4% (15,8% \pm 8,6%) используют гибкие навыки в работе часто и всегда и относятся к группе лидеров и ведущих. Кроме того, аутсайдеры занимают второе место (21,9%). Напомним, что в группу аутсайдеров входят заведующие, «никогда» не использующие отдельные гибкие навыки.

Важной находкой, на наш взгляд, является прямая сильная достоверная корреляция баллов по отдельным блокам между собой. Учитывая, что гибкие навыки в различных областях развиты неравномерно [5], выявленная корреляция доказывает, что каждую группу составляют в основном одни и те же оцениваемые заведующие, т. е.

«всегда демонстрирующие самоконтроль и критичность к своим действиям», всегда или часто использующие гибкие навыки в областях достижения результата, лидерства, общения, командной работы. Напротив, заведующие, которых респонденты оценили как «никогда не использующие навыки самоконтроля», войдут в группу отстающих или аутсайдеров по другим блокам.

Отсутствие связи оценок с возрастом и стажем респондентов, полом респондентов и оцениваемых — хороший признак, свидетельствующий об объективности анкеты в опросах обратной связи.

По ряду утверждений и блоков имелась разница в оценках врачей, работающих в стационарах, и врачей, работающих в амбулаторных условиях. Врачи стационаров оценивали заведующих значительно хуже в отношении контроля эмоций, постановки сложных целей, расстановки приоритетов, воплощении стратегии, активного слушания

других, адаптации общения к потребностям аудитории, четкого лаконичного общения и передачи опыта при общении, эффективной работы в команде, конструктивной и полезной обратной связи, уважения к другим и к различиям между членами команды.

Принимая во внимание собственные результаты об отсутствии корреляции уровня психологического благополучия заведующих отделениями с работой в разных условиях оказания помощи и даже с разной трудовой нагрузкой, указать причины разных оценок гибких навыков в рамках данного исследования нельзя [27]. Можно предположить, что врачи стационаров более тесно взаимодействуют с заведующим отделением, достижение результата зависит от командных усилий и роли заведующего в большей степени, чем в поликлинике. Вот почему требования к навыкам общения и ведения командной работы, к контролю эмоций, расстановке приоритетов и воплощению стратегии выше у врачей стационаров. Однако данное предположение нуждается в доказательствах и может стать гипотезой следующих исследований.

Следует обратить внимание на разность медиан по блокам. Эта разница позволяет говорить, что гибкие навыки в разных сферах развиты у заведующих отделениями неодинаково.

Напомним, что медианы по блокам и утверждениям не привязаны к нормативным значениям. Поэтому ошибочно считать, что медиана выше 3 баллов говорит о развитии гибких навыков у оцениваемых выше удовлетворительного уровня. Истинное состояние гибких навыков показывает разделение оцениваемых по пяти группам.

ВЫВОДЫ

Опросник может быть рекомендован для использования в системе оценки персонала в отношении заведующих клиническими отделениями врачами; гибкие навыки заведующих отделениями нуждаются в развитии; в наибольшей степени у заведующих отделениями страдают гибкие навыки в сферах «самоконтроль и критичность к своим действиям», «лидерство», «достижение результата». Полученные результаты имеют ценность для медицинских организаций при построении системы оценки персонала, в том числе в рамках внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности, для образовательных организаций при разработке программ дополнительного профессионального образования, и для заведующих отделениями при формировании персональной траектории профессионального развития.

Литература

1. Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 7 ноября 2017 г. № 768н «Об утверждении профессионального стандарта "Специалист в области организации здравоохранения и общественного здоровья"».
2. Abraham TH, Stewart GL, Solimeo SL. The importance of soft skills development in a hard data world: learning from interviews with healthcare leaders. *BMC Med Educ.* 2021; 21 (1): 147. DOI: 10.1186/s12909-021-02567-1.
3. Touloumakos AK. Expanded Yet Restricted: A Mini Review of the Soft Skills Literature. *Front Psychol.* 2020; 11: 2207. DOI: 10.3389/fpsyg.2020.02207.
4. Continisio GI, Serra N, Guillari A, Lucchese R, Simeone S, Gargiulo G, et al. Evaluation of soft skills among Italian Healthcare Rehabilitators: A cross sectional study. *J Public Health Res.* 2021; 10 (3): 2002. DOI: 10.4081/jphr.2021.2002.
5. Robles MM. Executive perceptions of the top 10 soft skills needed in today's workplace. *Bus Communication Q.* 2012; 75: 453–65.
6. Dalaya M, Ishaquddin S, Ghadage M, Hatte G. An interesting review on soft skills and dental practice. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9: 19–21.
7. Sanders T, Foster NE, Bishop A, Ong BN. Biopsychosocial care and the physiotherapy encounter: physiotherapists' accounts of back pain consultations. *BMC Musculoskelet Disor.* 2013; 14: 65.
8. Ratka A. Empathy and the Development of Affective Skills. *Am J Pharm Educ.* 2018; 82 (10): 7192. DOI: 10.5688/ajpe7192.
9. Ishii T. Skills important for professional orthopedic doctors treating bone and soft tissue tumors. *J Orthop Sci.* 2020; 25 (3): 369–70. DOI: 10.1016/j.jos.2020.03.001.
10. Lamiani G, Mistraletti G, Moreschi C, Andriani E, Vegni E. Cultivating Empathy and Soft Skills Among Intensive Care Residents: Effects of a Mandatory, Simulation-Based, Experiential Training. *Ann Transplant.* 2021; 26: e931147. DOI: 10.12659/AOT.931147.
11. Peddle M, Bearman M, Radomski N, et al. What non-technical skills competencies are addressed by Australian standards documents for health professionals who work in secondary and tertiary clinical settings? A qualitative comparative analysis. *BMJ Open.* 2018; 8: e020799.
12. Khajeghyasi RV, Liaghatdar MJ, Nili MR, Shirazi M. Ranking the soft skills of the dental profession based on the importance in job performance: A mixed method study in Isfahan and Mazandaran Universities of Medical Sciences. *Dent Res J (Isfahan).* 2021; 18: 24. PMID: 34249250; PMCID: PMC8248254.
13. Hendarman AF, Tjakraatmadja JH. Relationship among soft skills, hard skills, and innovativeness of knowledge workers in the knowledge economy era. *Procd Soc Behav.* 2012; 52: 35–44.
14. Gordon M, Darbyshire D, Baker P. Non technical skills training to enhance patient safety: a systematic review. *Med Educ.* 2012; 46: 1042–54.
15. Rea T, Simeone S, Annunziata M, et al.. Effectiveness of the Situation-Background- Assessment-Recommendation (SBAR) methodology in patient handovers between nurses, Italy. *Ig Sanità Pubblica.* 2018; 74: 279–93.
16. Arat M. Acquiring soft skills at university. *J Educ Instruct Stud World.* 2014; 4: 46–51.
17. Kataoka H, Iwase T, Ogawa H, et al.. Can communication skills training improve empathy? A six-year longitudinal study of medical students in Japan. *Med Teacher.* 2019; 41: 195–200.
18. Александрова О. А., Ярашева А. В., Аксенова Е. И., Аликперова Н. В., Ненахова Ю. С. Управленческие кадры в московском здравоохранении: поиск ответов на актуальные вопросы. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2019; 27 (S): 522–8. DOI: 10.32687/0869-866X-2019-27-si1-522-528.
19. Sawleshwarkar S, Negin J. A review of global health competencies for postgraduate public health education. *Front Public Health.* 2017; 5: 46.
20. Hutagalung D, Sopa A, Asbari M, et al. Influence soft skills, hard skills and organization learning on teachers performance through innovation capabilities mediator. *J Crit Rev.* 2020; 7: 54–66.
21. Моторина И. В., Моторин И. В. Формирование гибких навыков студентов медицинского вуза — перспективное направление повышения качества профессионального образования в высшей школе. Личность в меняющемся мире: здоровье, адаптация, развитие. 2018; 2 (21): 305–21. DOI: 10.23888/humJ20182305-321.
22. Царанов К., Комолова О. Как снизить стресс у пациентов на приеме. Тренинг для врачей. Заместитель главного врача. 2018; 8: 48–55. eLIBRARY ID: 36716121.
23. Sample Competencies Quickstart Guide. Available from: <https://www.qualtrics.com/m/assets/support/wp-content/>

- uploads/2018/06/EX-Whitepaper_-_360-Sample-Competencies-Quickstart-Guide.pdf
24. Отдельнова К. А. Определение необходимого числа наблюдений в социально-гигиенических исследованиях. Сб. трудов 2-го ММИ. 1980; 150 (6): 18–22.
 25. Manturova NE, Kochubey VV, Kochubey AV. The competence of plastic surgeons. *Bulletin of RSMU*. 2018; (2): 63–7. DOI: 10.24075/brsmu.2018.023.
 26. Dunivin Z, Zadunayski L, Baskota U, Siek K, Mankoff J. Gender, soft skills, and patient experience in online physician reviews: a large-scale text analysis. *J Med Internet Res*. 2020. 30; 22 (7): e14455. DOI: 10.2196/14455.
 27. Kochubey AV, Yarotsky SYu, Kochubey VV. Психологическое благополучие заведующих отделениями. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2022; (2) 22: 75–80. DOI 10.47183/mes.2022.021.

References

1. Prikaz Ministerstva truda i social'noj zashhity RF ot 7 noyabrya 2017 g. # 768n «Ob utverzhenii professional'nogo standarta "Specialist v oblasti organizacii zdravooxraneniya i obshhestvennogo zdorov'ya"». Russian.
2. Abraham TH, Stewart GL, Solimeo SL. The importance of soft skills development in a hard data world: learning from interviews with healthcare leaders. *BMC Med Educ*. 2021; 21 (1): 147. DOI: 10.1186/s12909-021-02567-1.
3. Touloumakos AK. Expanded Yet Restricted: A Mini Review of the Soft Skills Literature. *Front Psychol*. 2020; 11: 2207. DOI: 10.3389/fpsyg.2020.02207.
4. Continisio GI, Serra N, Guillari A, Lucchese R, Simeone S, Gargiulo G, et al. Evaluation of soft skills among Italian Healthcare Rehabilitators: A cross sectional study. *J Public Health Res*. 2021; 10 (3): 2002. DOI: 10.4081/jphr.2021.2002.
5. Robles MM. Executive perceptions of the top 10 soft skills needed in today's workplace. *Bus Communication Q*. 2012; 75: 453–65.
6. Dalaya M, Ishaquddin S, Ghadage M, Hatte G. An interesting review on soft skills and dental practice. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9: 19–21.
7. Sanders T, Foster NE, Bishop A, Ong BN. Biopsychosocial care and the physiotherapy encounter: physiotherapists' accounts of back pain consultations. *BMC Musculoskelet Disor*. 2013; 14: 65.
8. Ratka A. Empathy and the Development of Affective Skills. *Am J Pharm Educ*. 2018; 82 (10): 7192. DOI: 10.5688/ajpe7192.
9. Ishii T. Skills important for professional orthopedic doctors treating bone and soft tissue tumors. *J Orthop Sci*. 2020; 25 (3): 369–70. DOI: 10.1016/j.jos.2020.03.001.
10. Lamiani G, Mistraletti G, Moreschi C, Andrichi E, Vegni E. Cultivating Empathy and Soft Skills Among Intensive Care Residents: Effects of a Mandatory, Simulation-Based, Experiential Training. *Ann Transplant*. 2021; 26: e931147. DOI: 10.12659/AOT.931147.
11. Peddle M, Bearman M, Radomski N, et al. What non-technical skills competencies are addressed by Australian standards documents for health professionals who work in secondary and tertiary clinical settings? A qualitative comparative analysis. *BMJ Open*. 2018; 8: e020799.
12. Khajeghyasi RV, Liaghatdar MJ, Nili MR, Shirazi M. Ranking the soft skills of the dental profession based on the importance in job performance: A mixed method study in Isfahan and Mazandaran Universities of Medical Sciences. *Dent Res J (Isfahan)*. 2021; 18: 24. PMID: 34249250; PMCID: PMC8248254.
13. Hendarman AF, Tjakraatmadja JH. Relationship among soft skills, hard skills, and innovativeness of knowledge workers in the knowledge economy era. *Procd Soc Behav*. 2012; 52: 35–44.
14. Gordon M, Darbyshire D, Baker P. Non technical skills training to enhance patient safety: a systematic review. *Med Educ*. 2012; 46: 1042–54.
15. Rea T, Simeone S, Annunziata M, et al. Effectiveness of the Situation-Background- Assessment-Recommendation (SBAR) methodology in patient handovers between nurses, Italy. *Ig Sanità Pubblica*. 2018; 74: 279–93.
16. Arat M. Acquiring soft skills at university. *J Educ Instruct Stud World*. 2014; 4: 46–51.
17. Kataoka H, Iwase T, Ogawa H, et al. Can communication skills training improve empathy? A six-year longitudinal study of medical students in Japan. *Med Teacher*. 2019; 41: 195–200.
18. Aleksandrova OA, Yarasheva AV, Aksenova EI, Alikperova NV, Nenaxova YuS. Upravlencheskie kadry v moskovskom zdravooxranenii: poisk otvetov na aktual'nye voprosy. *Problemy social'noj gigieny, zdravooxraneniya i istorii mediciny*. 2019; 27 (S): 522–8. DOI: 10.32687/0869-866X-2019-27-si1-522-528. Russian.
19. Sawleshwarkar S, Negin J. A review of global health competencies for postgraduate public health education. *Front Public Health*. 2017; 5: 46.
20. Hutagalung D, Sopa A, Asbari M, et al. Influence soft skills, hard skills and organization learning on teachers performance through inovation capabilityas mediator. *J Crit Rev*. 2020; 7: 54–66.
21. Motorina IV, Motorin IV. Formirovanie gibkix navykov studentov medicinskogo vuza — perspektivnoe napravlenie povysheniya kachestva professional'nogo obrazovaniya v vyshej shkole. *Lichnost' v menyayushhemsya mire: zdorov'e, adaptaciya, razvitiye*. 2018; 2 (21): 305–21. DOI: 10.23888/humJ20182305-321. Russian.
22. Caranov K, Komolova O. Kak snizit' stress u pacientov na prieme. *Trening dlya vrachej. Zamestitel' glavnogo vracha*. 2018; 8: 48–55. eLIBRARY ID: 36716121. Russian.
23. Sample Competencies Quickstart Guide. Available from: https://www.qualtrics.com/m/assets/support/wp-content/uploads/2018/06/EX-Whitepaper_-_360-Sample-Competencies-Quickstart-Guide.pdf
24. Otdelnova KA. Opređenje neobxodimogo chisla nablyudenij v social'no-gigienicheskix issledovaniyax. *Sb. trudov 2-go MMI*. 1980; 150 (6): 18–22. Russian.
25. Manturova NE, Kochubey VV, Kochubey AV. The competence of plastic surgeons. *Bulletin of RSMU*. 2018; (2): 63–7. DOI: 10.24075/brsmu.2018.023.
26. Dunivin Z, Zadunayski L, Baskota U, Siek K, Mankoff J. Gender, soft skills, and patient experience in online physician reviews: a large-scale text analysis. *J Med Internet Res*. 2020. 30; 22 (7): e14455. DOI: 10.2196/14455.
27. Kochubey AV, Yarotsky SYu, Kochubey VV. Psychological well-being of the department heads at healthcare organizations. *Extreme medicine*. (2) 22: 79–85 DOI 10.47183/mes.2022.021.

ПНЕВМОЛАБИРИНТ КАК ОСЛОЖНЕНИЕ ПОСЛЕ СТАПЕДОПЛАСТИКИ

X. M. A. Диаб^{1,2}✉, Н. А. Дайхес¹, О. А. Пашчина¹, А. Г. Зухба¹, С. В. Коханюк¹, Н. Е. Пирогова²¹ Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Пневмолабиринт характеризуется наличием воздуха во внутреннем ухе вследствие его проникновения из барабанной полости. Он является редким осложнением стапедопластики. В настоящее время нет четкого алгоритма лечения этого состояния. В статье рассмотрены два случая пневмолабиринта, возникшего как раннее и позднее осложнения после операции. В первом случае у пациентки, перенесшей стапедопластику на левом ухе, через три недели после физической нагрузки внезапно развились резкое снижение слуха на левом ухе, шум в левом ухе и головокружение. При физикальном осмотре не было обнаружено никаких признаков дефекта барабанной перепонки. На аудиометрии диагностирована левосторонняя сенсоневральная тугоухость IV степени. По данным компьютерной томографии (КТ) височной кости выявлен пневмолабиринт. Во втором случае развитие вестибулокохлеарной симптоматики имело место спустя три дня после стапедопластики на правом ухе. На аудиометрии обнаружена правосторонняя смешанная тугоухость IV степени. Данные КТ височной кости подтвердили диагноз пневмолабиринта. В обоих случаях во время ревизионной тимпанотомии был обнаружен стапедидальный протез, установленный проксимальным концом в преддверие и дистальным концом закрепленный на длинном отростке наковальни, а также перилимфатический свищ. В ходе операции протез удалили, в преддверие ввели раствор дексаметазона, выполнили стапедопластику по методике «аутохрящ на надхрящницу». После операции вестибулярные симптомы исчезли, слух несколько улучшился.

Ключевые слова: пневмолабиринт, стапедопластика, перилимфатический свищ, вестибулокохлеарные симптомы, пневматизация, сенсоневральная тугоухость

Вклад авторов: X. M. A. Диаб — разработка дизайна исследования, выполнение хирургического лечения пациента, редактирование текста статьи; Н. А. Дайхес — редактирование текста статьи; О. А. Пашчина, А. Г. Зухба — написание текста рукописи; С. В. Коханюк, Н. Е. Пирогова — обзор литературы.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ НМИЦО ФМБА (протокол № 03/22 от 20 июня 2022 г.). Пациенты подписали добровольное информированное согласие на хирургическое лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Хассан Мохамад Али Диаб
Волоколамское шоссе, д. 30, стр. 2, г. Москва, 123182; hasandiab@mail.ru

Статья получена: 14.06.2022 **Статья принята к печати:** 05.07.2022 **Опубликована онлайн:** 16.08.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.028

PNEUMOLABYRINTH AS A POSTOPERATIVE COMPLICATION OF STAPEDOPLASTY

Diab KhMA^{1,2}✉, Daikhes NA¹, Pashchinina OA¹, Zukhba AG¹, Kokhanyuk SV¹, Pirogova NE²¹ National Medical Research Center for Otorhinolaryngology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Pneumolabyrinth is characterized by the presence of air in the inner ear due to intrusion from the tympanic cavity. It is a rare complication of stapedoplasty. Currently, there is no clear algorithm for treatment of this complication. The paper reports two cases of pneumolabyrinth being the short-term and long-term postoperative complications. In the first case, the patient, who had undergone stapedoplasty in the left ear, suddenly developed rapid hearing loss and tinnitus in the left ear with dizziness three weeks after physical activity. Physical examination revealed no evidence of the tympanic membrane defect. Audiometry revealed left-sided IV degree of sensorineural hearing loss. Pneumolabyrinth was detected on the temporal bone CT scans. In the second case, vestibulocochlear symptoms developed three days after stapedoplasty in the right ear. Pure tone audiometry revealed right-sided IV degree of mixed hearing loss. CT scan of the temporal bone confirmed the diagnosis of pneumolabyrinth. In both cases the correct position of the stapedia prostheses, "empty" vestibule and perilymphatic fistula were found during revision tympanotomy. The prostheses were removed during surgery, Dexamethasone solution was introduced into the vestibule; stapedoplasty with autocartilage on the perichondrium was performed. After surgery, vestibular symptoms disappeared, and hearing improved.

Keywords: pneumolabyrinth, stapedoplasty, perilymphatic fistula, vestibulocochlear symptoms, pneumatization, sensorineural hearing loss

Author contribution: Diab KhMA — research design, surgical treatment of patients, manuscript editing; Daikhes NA — manuscript editing; Pashchinina OA, Zukhba AG — manuscript writing; Kokhanyuk SV, Pirogova NE — literature review.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Otorhinolaryngology of FMBA (protocol № 03/22 dated June 20, 2022). The patients submitted the informed consent to surgery and personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Khassan M. A. Diab
Volokolamskoe shosse, 30, str. 2, Moscow, 123182, Russia; hasandiab@mail.ru

Received: 14.06.2022 **Accepted:** 05.07.2022 **Published online:** 16.08.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.028

Пневмолабиринт — это редкое патологическое состояние, характеризующееся замещением перелимфы лабиринта на воздух, которое возникает из-за аномальной связи между средним и внутренним ухом. Иными словами, пневмолабиринт — это присутствие воздуха во внутреннем ухе из-за сообщения между внутренним ухом и заполненным воздухом средним ухом. Клинические проявления данного состояния связаны с кохлеовестибулярными нарушениями, среди которых сенсоневральная тугоухость, шум в ушах и/или голове, чувство распирания в ушах, а

также головокружение и тошнота [1, 2]. Окончательный клинический диагноз заболевания устанавливаются на основании данных компьютерной томографии (КТ) височных костей высокого разрешения по наличию воздуха во внутреннем ухе.

Термин «пневмолабиринт» был введен в научную литературу М. Ф. Мафее с соавторами [3]. Этиологические факторы, приводящие к возникновению пневмолабиринта, условно можно подразделить на травматические, ятрогенные и воспалительные (инфекционные).

Согласно статистическому анализу данных, взятых из электронных баз данных (PubMed, MEDLINE, EMBASE, Cochrane Library, Scopus), наиболее частыми причинами пневмолабиринта являются переломы височных костей (31,8%), хирургия стремени (18,2%), проникающая травма (15,9%) и баротравмы (11,4%). По данным КТ височных костей пневмолабиринт, как в виде самостоятельного патологического состояния, так и в составе комбинаций, чаще всего выявляют в преддверии (95,3%), за ним следуют улитка (40,2%) и полукружные каналы (23,4%) [4].

Отсроченный пневмолабиринт — это редкое осложнение стапедэктомии, связанное со смещением или вывихом протеза. Его следует учитывать у пациентов с вестибулокохлеарными симптомами даже спустя много лет после операции. Следует отметить, что пневмолабиринт, развившийся в течение первой недели после стапедопластики, позволяет предположить наличие перилимфатического свища. Большинство описанных в научной литературе случаев возникновения пневмолабиринта после операции на стремени в основном имели место в течение нескольких недель или месяцев после хирургического лечения.

В статье представлены два клинических случая пневмолабиринта.

Описание клинических случаев

Пневмолабиринт как отсроченное осложнение стапедопластики

Пациентка К., 32 года, госпитализирована в отдел патологии уха и основания черепа ФГБУ «Национальный исследовательский центр оториноларингологии ФМБА России» с жалобами на головокружение вращательного характера при изменении положения тела и ходьбе, шум в левом ухе, снижение слуха на левое ухо. Из анамнеза заболевания известно, что 2 сентября 2020 г. ей была выполнена стапедопластика по поршневого методике на левом ухе с использованием протеза SPL 03.44S (Audio Technologies; Италия) (длина протеза — 4,5 мм), диаметр перфорации — 0,6 мм. Пациентка была выписана из стационара с улучшением слуха на оперированном ухе 7 сентября 2020 г. В отсроченном послеоперационном

периоде (октябрь 2020 г.) после физической нагрузки отметила резкое ухудшение слуха слева, шум в левом ухе, головокружение вращательного характера при перемене положения тела и ходьбе. Пациентке была назначена консервативная терапия по месту жительства. В связи с сохранением жалоб ее направили в поликлинику НМИЦО ФМБА, откуда она была госпитализирована в отделение патологии уха и основания черепа.

При физикальном осмотре обе барабанные перепонки были жемчужно-серыми, полупрозрачными, с четкими контурами, подвижными, без дефектов. На момент осмотра спонтанного нистагма не было. Камертоновые пробы показали отрицательный опыт Ринне слева и латерализацию звука в правое ухо в тесте Вебера. При проведении тональной пороговой аудиометрии (ТПА) выявлена правосторонняя смешанная тугоухость I степени, левосторонняя сенсоневральная тугоухость IV степени (рис. 1).

По данным КТ височных костей, выполненной при поступлении, выявлены КТ-признаки отосклероза, фенестральной формы с обеих сторон, состояние после стапедопластики на левом ухе. Антрум, клетки сосцевидного отростка, а также барабанная полость пневматизированы. В улитковом канале и преддверии левого лабиринта определялось наличие воздуха (рис. 2).

На основании предъявляемых жалоб, анамнеза заболевания, а также данных ТПА и КТ височных костей был поставлен следующий клинический диагноз: отосклероз, фенестральная форма; состояние после хирургического лечения (стапедопластики) на левом ухе, выполненного 2 сентября 2020 г.; пневмолабиринт; левосторонняя сенсоневральная тугоухость IV степени.

Консилиумом врачей принято решение о ревизионной тимпанотомии на левом ухе в условиях местной анестезии (sol. Lidocaini 2% — 12 мл). Под контролем операционного микроскопа с помощью микрохирургической техники выполнен интрамеатальный разрез по Rosen, меатотимпанальный лоскут отсепарован до уровня фиброзного кольца, выполнена тимпанотомия. При ревизии барабанной полости определялись длинный отросток наковальни и молоточек, структуры стремени отсутствовали. Протез Audio Technologies SPL 03.44S (4,5 мм) установлен проксимальным концом в преддверии,

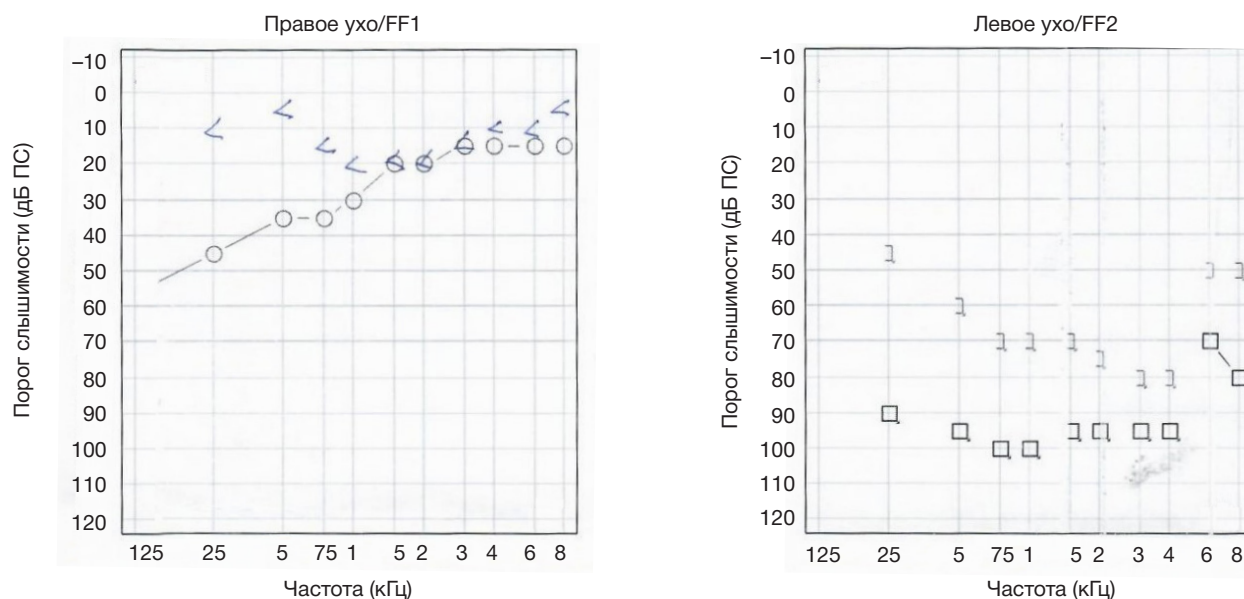


Рис. 1. Данные ТПА пациентки К., 32 года, при поступлении (до ревизионной тимпанотомии)

дистальным концом закреплен на длинном отростке наковальни. Выявлен перилимфатический свищ окна преддверия. Протез удален; выполнен забор аутохряща с надхрящницей из чаши ушной раковины. В преддверие введен раствор дексаметазона с физиологическим раствором. На область преддверия на уровне рамы окна преддверия уложен фрагмент надхрящницы, на последний проксимальным концом установлена колумелла из аутохряща; дистальным концом она установлена под лентикулярный отросток наковальни длиной 3,5 мм. Меатотимпанальный лоскут уложен на место. Выполнена тампонада наружного слухового прохода гемостатической губкой с антибиотиком цефтриаксон.

Пациентке был назначен и проведен курс консервативной терапии: глюкокортикостероид (дексаметазон 24–20–16–8–4 мг + NaCl 0,9% 200,0 мл в/в капельно один раз в сутки); бетастерин (Бетасерк) 24 мг три раза в день; витаминотерапия (витамины В1, В6 1,0 мл в/м через день); сосудистая терапия (актовегин 10,0 мл + NaCl 0,9% 10,0 мл в/в капельно); холина альфосцерат (Ноохолин Ромфарм) 4,0 мл (250 мг/мл) + NaCl 0,9% 100,0 мл в/в капельно).

Проведенная в раннем послеоперационном периоде контрольная тональная аудиометрия выявила правостороннюю смешанную тугоухость I степени, левостороннюю сенсоневральную тугоухость IV степени (рис. 3).

Пациентке выполнено повторное КТ-исследование височных костей (4 декабря 2020 г.), выявившее КТ-признаки, характерные для состояния после стапедопластики на левом ухе (рис. 4).

Через четыре дня после повторной операции пациентка отметила отсутствие головокружения и улучшение слуха на левом ухе. Признаков пареза мимической мускулатуры, спонтанного нистагма не выявлено. Латерализация в опыте Вебера в левое ухо. Было решено выписать пациентку из стационара для дальнейшего динамического наблюдения ЛОР-врача по месту жительства.

Пневмолабиринт как раннее осложнение стапедопластики

Пациентка С., 37 лет, госпитализирована в отдел патологии уха и основания черепа ФГБУ «Национальный исследовательский центр оториноларингологии ФМБА

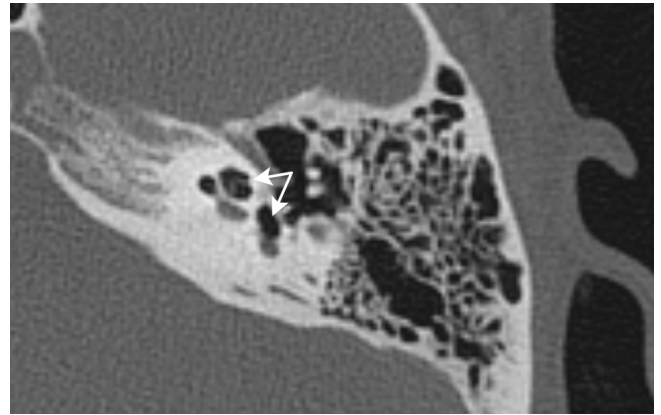


Рис. 2. КТ левой височной кости пациентки К., 32 года, при поступлении: стрелками показано наличие воздуха в улитке и преддверии

России» с жалобами на снижение слуха на правом ухе, шум в правом ухе, головокружение вращательного характера. При физикальном обследовании обе барабанные перепонки были жемчужно-серыми, полупрозрачными, с четкими контурами, подвижными, без дефектов. Спонтанного нистагма не было. Камертональные пробы показали отрицательный опыт Ринне справа и латерализацию звука в правое ухо в тесте Вебера. ТПА выявила правостороннюю смешанную тугоухость III степени (рис. 5).

КТ височных костей от 17 августа 2020 г. выявила КТ-признаки отосклероза фенестральной формы.

На основании жалоб, анамнеза заболевания, а также данных ТПА и КТ височных костей был установлен следующий диагноз: отосклероз, фенестрально-кохлеарная форма, правосторонняя смешанная тугоухость III степени.

Пациентке 17 ноября 2020 г. под местной анестезией была выполнена стапедопластика по поршневой методике с использованием протеза Audio Technologies SPL 03.44S (длина протеза — 4,5 мм) на правом ухе. Интраоперационно пациентка отметила улучшение слуха на правом ухе. Через три дня после операции в связи с нарушением режима (выполнение физической нагрузки) больная отметила резкое ухудшение слуха и шум в правом ухе, головокружение при смене положения тела, тошноту, горизонтальный, крупноразмашистый нистагм вправо.

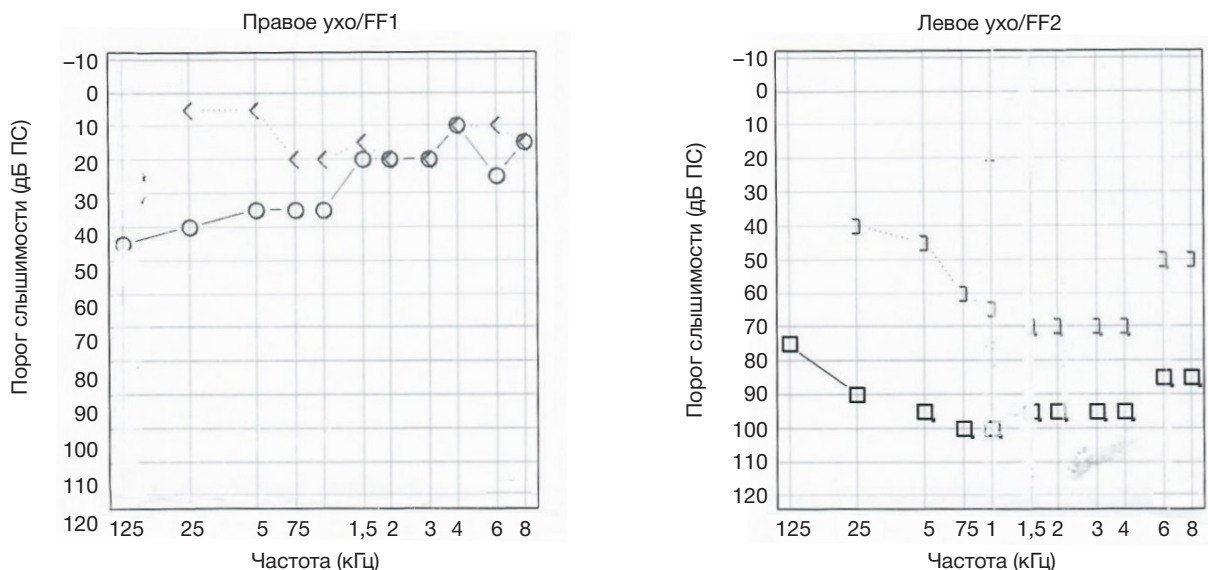


Рис. 3. Данные ТПА пациентки К., 32 года, в раннем послеоперационном периоде

Пациентка получила консультацию отоневролога. Ей была проведена ТПА в раннем послеоперационном периоде, которая выявила правостороннюю смешанную тугоухость IV степени. Проведена КТ височных костей. Заключение: КТ-признаки отосклероза фенестральной формы с обеих сторон, состояние после стапедопластики справа (в улитковом канале, в преддверии лабиринта, в латеральном полукружном канале определяются пузырьки воздуха) (рис. 6).

Консилиумом врачей принято решение о проведении ревизионной тимпанотомии. В условиях местной анестезии (sol. Lidocaini 2% — 12 мл) под контролем операционного микроскопа с использованием микрохирургической техники выполнен интрамеатальный разрез по Rosen, меатотимпальный лоскут отсепарован до уровня фиброзного кольца, выполнена тимпанотомия. При ревизии барабанной полости структуры стремени отсутствовали. Протез Audio Technologies SPL 03.44S (4,5 мм) установлен проксимальным концом в преддверие, дистальным — закреплен на длинном отростке наковальни. Протез удален. Выполнен забор аутохряща с надхрящницей из чаши ушной раковины. В преддверие введен раствор дексаметазона с физиологическим раствором до уровня рамы окна преддверия. На область ниши окна преддверия разложен фрагмент надхрящницы, установлена колумелла из аутохряща длиной 3,5 мм (рис. 7). Меатотимпальный лоскут уложен на место. Произведена тампонада наружного слухового прохода гемостатической губкой с антибиотиком Цефтриаксон. На ушную раковину наложена сухая асептическая повязка. По окончании операции головокружения и спонтанного нистагма не было.

Проведен курс консервативной терапии: дексаметазон 20–16–12–8–8–4 мг + NaCl 0,9% 200,0 мл в/в капельно; бетагистин (Бетасерк) 16 мг три раза в день; витамин В12 250 мг в/м один раз в день; холина альфосцерат (Ноохолин Ромфарм) 4,0 мл (250 мг) + NaCl 0,9% 100,0 мл в/в капельно; актовегин 10,0 мл + NaCl 0,9% 100,0 мл в/в капельно.

На шестые сутки после операции пациентка отметила улучшение слуха на правом ухе, уменьшение головокружения, шума в правом ухе (рис. 8).

Повторная КТ височных костей выявила КТ-признаки отосклероза фенестральной формы с обеих сторон, состояние после стапедопластики справа (рис. 9).



Рис. 4. КТ левой височной кости пациентки К., 32 года, в раннем послеоперационном периоде: стрелками отмечены улитка и преддверие, заполненные жидкостным содержимым

Решено было выписать пациентку с признаками явного улучшения из стационара под наблюдение ЛОР-врача по месту жительства с последующими консультациями в Центре.

Обсуждение клинических случаев

Пневмолабиринт — это патологическое состояние, связанное с присутствием воздуха во внутреннем ухе, обычно спровоцированное травмой височной кости или сформировавшееся после стапедопластики. В некоторых случаях оно осложняется возникновением фистулы (свища) окна преддверия [5]. В литературе опубликованы несколько случаев пневмолабиринта: большинство из них диагностировано у пациентов, перенесших первичную стапедопластику. Другие причины — перелом или вывих подножной пластинки стремени, проникающая травма, переломы височной кости, баротравма и кохлеарная имплантация [6].

В большинстве известных случаев пневмолабиринт возник через несколько недель или месяцев после стапедэктомии. Как правило, это осложнение проявляется сочетанием жалоб на вестибулярные (головокружение, приступы тошноты) и кохлеарные нарушения (внезапное снижение слуха по сенсоневральному типу, а также чувство распирания и шума в ухе).

КТ с высоким разрешением (КТВР) обязательна для диагностики данного состояния. При этом на развитие

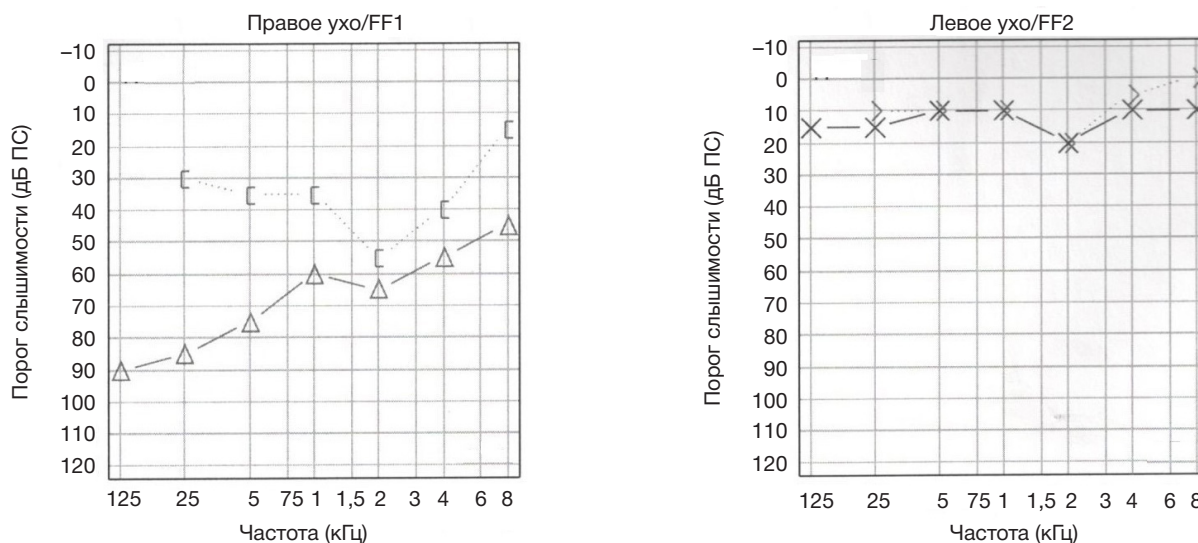


Рис. 5. Данные ТПА пациентки С., 37 лет, при поступлении

пневмолабиринта указывают наличие воздуха в структурах внутреннего уха, а также возможное смещение стапедального протеза [7].

Из-за небольшого количества описанных в литературе случаев пневмолабиринта в настоящее время нет четкого алгоритма лечения этого состояния. Пациентам, у которых развились внезапная потеря слуха и вестибулярные симптомы в раннем послеоперационном периоде (от нескольких дней до трех месяцев) после операции на стремени, тактику лечения (консервативная терапия или ревизионная тимпанотомия с обязательным устранением причины) выбирают в зависимости от диагностированного типа и характера повреждения [8]. В случаях, когда пневмолабиринт возникает как позднее осложнение стапедопластики (спустя несколько месяцев или даже лет после операции), решение о выборе тактики лечения не так однозначно [9, 10]. В опубликованных случаях, которые связаны с осложнением стапедопластики, преимущественно используется ревизионная тимпанотомия с герметизацией дефекта аутоканями — надхрящницей аутохряща ушной раковины (как в представленных нами клинических случаях), жировой клетчаткой, взятой из мочки уха, аутофасцией височной мышцы [11]. Рассмотренные в статье клинические случаи подтверждают эффективность данной техники хирургического лечения пневмолабиринта с пластикой дефекта (фистулы преддверия) аутоканями (аутонадхрящницей). Почти во всех представленных случаях после хирургического лечения вестибулярные симптомы исчезали — предположительно, из-за возникающей вестибулярной компенсации.

Таким образом, результат хирургической коррекции вестибулярных симптомов является однозначно положительным — независимо от характера поражения, его тяжести или проведенного ранее вмешательства. В отличие от вестибулярных симптомов, результаты, связанные с восстановлением слуха, не так однозначны. Так, в первом случае, демонстрирующем отсроченный пневмолабиринт, восстановить слух до социально значимого уровня так и не удалось, несмотря на то, что в результате лечения было отмечено улучшение слуха на оперированном ухе (на одну степень). Во втором случае, описывающем развитие раннего пневмолабиринта, восстановление слуха прошло более успешно.

В недавно представленном обзоре [11] были предложены три прогностических фактора улучшения слуха после

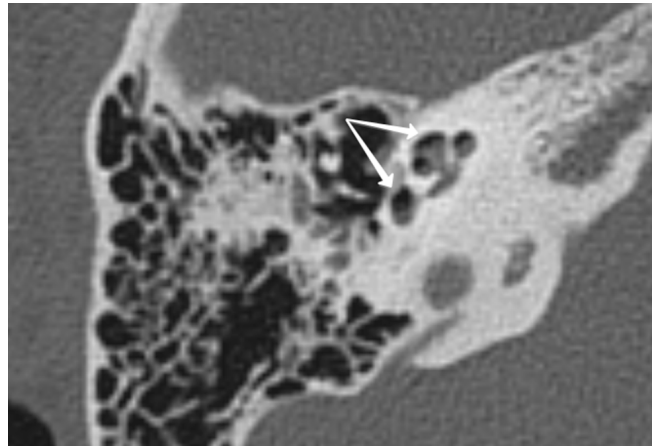


Рис. 6. КТ правой височной кости пациентки С., 37 лет, в раннем послеоперационном периоде: стрелками отмечены содержащий воздух преддверие и улитка

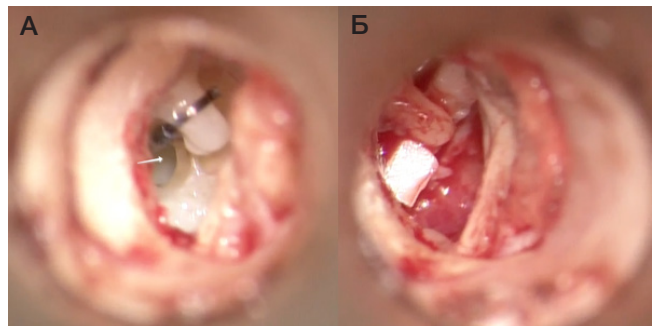


Рис. 7. А. На микрофотографии из операционной визуализируется протез стремени в правильном положении, закрепленный на длинной ножке наковальни, стрелкой отмечена «открытая» фистула окна преддверия, преддверие не полностью заполнено перилимфой. Б. Микрофотография демонстрирует правильное положение аутохрящевой колумеллы (сесамовидная косточка располагается в вырезке дистального конца аутохряща) на завершающем этапе операции

коррекции пневмолабиринта: оценка уровня слуха по костной проводимости в начале заболевания, временной интервал между травмой и хирургическим вмешательством и наличие поражения стремени при травме.

В рассмотренных случаях решение о проведении хирургического лечения пациенткам К. и С. было принято из-за наличия пневмолабиринта (подтвержденного КТ височных костей), а также резкого снижения слуха и

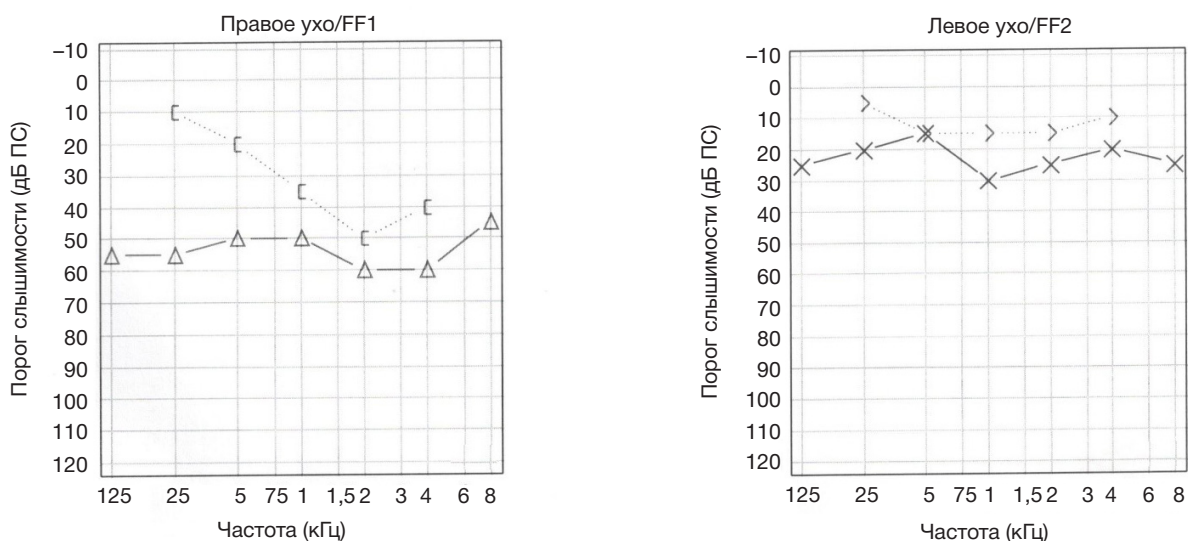


Рис. 8. Данные ТПА пациентки С., 37 лет, в раннем послеоперационном периоде

выраженных вестибулярных нарушений. Во время проведения ревизионных операций был выявлен перилимфатический свищ, за счет чего сообщение между средним и внутренним ухом позволяло воздуху проникать в преддверие.

Поступление воздуха в перилимфатическое пространство вследствие наличия перилимфатического свища является одним из механизмов, приводящих к потере слуха, так как переход сложной гидродинамической системы внутреннего уха из «закрытого» состояния в «открытое», к тому же с заменой части перелимфы на воздух, резко изменяет нормальные физиологические и физические показатели, присущие «закрытой» системе лабиринта, при переходе к патологическому («открытому») состоянию, что вызывает снижение улитковой микрофонии, комплексного потенциала действия и эндокохлеарного потенциала [12]. Удаление воздуха из лабиринта путем замены на жидкость с герметизацией дефекта возвращает систему внутреннего уха к нормальным физиологическим отношениям, что в некоторых случаях вызывает улучшение (или даже восстановление) амплитуды кохлеарной микрофонии и потенциала действия, а следовательно и слуха [6].

Представленные в данной статье клинические случаи подтверждают теорию авторов, ранее затрагивавших проблему развития и тактики лечения пневмолабиринта. У обеих пациенток действительно были вестибулярные нарушения, а также выраженная потеря слуха, который значительно улучшился после операции у пациентки С., и улучшился, хотя и не вернулся к исходному уровню у пациентки К. Следует помнить, что в случае возникновения пневмолабиринта в результате подвывиха стремени протеза пациент должен быть осведомлен о том, что удаление и дальнейшая установка протеза в правильное положение могут не улучшить слух, но значительно облегчить или полностью устранить вестибулярные симптомы [13, 14].

По нашему мнению, в представленных случаях целесообразно аккуратное удаление остатков подножной пластинки, удаление протеза для введения раствора дексаметазона и выполнение стапедопластики по методике «аутохрящ на вену». При том что в течение года в отделе проводят 400 операций (стапедопластика), в течение трех лет были

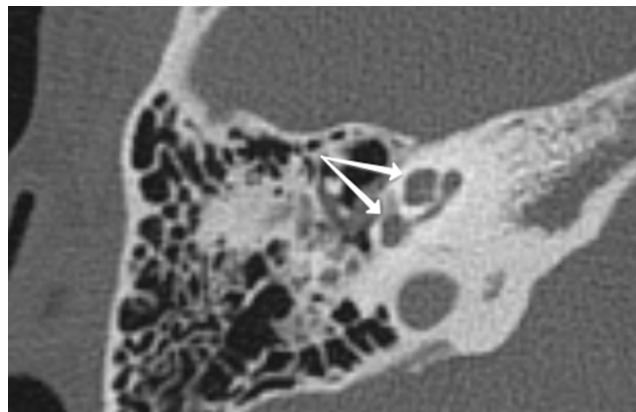


Рис. 9. КТ правой височной кости пациентки С., 37 лет: стрелками отмечены заполненные жидкостным содержимым улитка и преддверие

выявлены только два случая пневмолабиринта. В обоих случаях причиной пневмолабиринта послужило нарушение режима в послеоперационном периоде; смещения протеза не было, что можно увидеть на интраоперационной фотографии. По нашим наблюдениям, рассмотренные осложнения не связаны с типом протеза.

Представленные в статье случаи подчеркивают важность хирургического вмешательства при ведении пациентов с пневмолабиринтом и сенсоневральной тугоухостью, задокументированной на аудиограмме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пневмолабиринт является редким осложнением операции на стремени. Его следует заподозрить у пациентов с вестибулокохлеарными симптомами, возникшими как через короткий промежуток времени, так и спустя много лет после перенесенной стапедопластики. При подозрении на пневмолабиринт необходимо провести обследование для уточнения наличия и распространения воздуха в пораженных структурах внутреннего уха. Компьютерная томография височных костей — лучший инструмент визуализации, применяемый для подтверждения диагноза. Ревизионную тимпанотомию рекомендуют пациентам с диагнозом «пневмолабиринт», сенсоневральной тугоухостью и/или постоянным головокружением.

Литература

- Mandalà M, Colletti L, Carner M, Barillari M, Cerini R, Mucelli RP, Colletti V. Pneumolabyrinth and positional vertigo after stapedectomy. *Auris Nasus Larynx*. 2011; 38 (4): 547–50. DOI: 10.1016/j.anl.2010.12.010.
- Scheid SC, Feehery JM, Willcox TO, Lowry LD. Pneumolabyrinth: a late complication of stapes surgery. *Ear Nose Throat J*. 2001 Oct; 80 (10): 750–3.
- Mafee MF, Valvassori GE, Kumar A, Yannias DA, Marcus RE. Pneumolabyrinth: a new radiologic sign for fracture of the stapes footplate. *Am J Otol*. 1984; 5 (5): 374–5.
- Botti C, Castellucci A, Crocetta FM, Fornaciari M, Giordano D, Bassi C, Ghidini A. Pneumolabyrinth: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021; 278 (12): 4619–32. DOI: 10.1007/s00405-021-06827-0.
- Ziade G, Barake R, El Natout T, El Natout MA. Late pneumolabyrinth after stapedectomy. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2016; 133 (5): 361–3. DOI: 10.1016/j.anorl.2015.10.005.
- Gomes PS, Caselhos S, Vide AT, Fonseca R. Pneumolabyrinth: a rare complication of stapes surgery. *BMJ Case Rep*. 2019; 12 (11): e232190. DOI: 10.1136/bcr-2019-232190.
- Kösling S, Woldag K, Meister EF, Reschke I, Heywang-Köbrunner SH. Value of computed tomography in patients with persistent vertigo after stapes surgery. *Invest Radiol*. 1995; 30 (12): 712–5. DOI: 10.1097/00004424-199512000-00004.
- Comacchio F, Guidetti G, Guidetti R, Mion M. Pneumolabyrinth and recurrent paroxysmal positional vertigo after traumatic stapes fracture. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2019; 128 (4): 352–6. DOI: 10.1177/0003489418819553.
- Bajin MD, Mocan BÖ, Saraç S, Sennaroğlu L. Early computed tomography findings of the inner ear after stapes surgery and its clinical correlations. *Otol Neurotol*. 2013; 34 (4): 639–43. DOI: 10.1097/MAO.0b013e31828be1ab.
- Covelli E, Attanasio G, Cagnoni L, Viccaro M, Filippo R. Pneumolabyrinth after intratympanic steroid injection in patient with prosthesis of the stapes: a case report. *Am J Otolaryngol*. 2013; 34 (6): 759–61. DOI: 10.1016/j.amjoto.2013.06.002.
- Hidaka H, Miyazaki M, Kawase T, Kobayashi T. Traumatic pneumolabyrinth: air location and hearing outcome. *Otol Neurotol*.

- 2012; 33 (2): 123–31. DOI: 10.1097/MAO.0b013e318241bc91.
12. Kobayashi T, Sakurada T, Ohyama K, Takasaka M. Inner ear injury caused by air intrusion to the scala vestibuli of the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1993; 113 (6): 725–30. DOI: 10.3109/00016489309135892.
 13. Scheid SC, Feehery JM, Willcox TO, Lowry LD. Pneumolabyrinth: a late complication of stapes surgery. *Ear Nose Throat J.* 2001; 80 (10): 750–3.
 14. Ederies A, Yuen HW, Chen JM, Aviv RI, Symons SP. Traumatic stapes fracture with rotation and subluxation into the vestibule and pneumolabyrinth. *Laryngoscope.* 2009; 119 (6): 1195–7. DOI: 10.1002/lary.20234.

References

1. Mandalà M, Colletti L, Carner M, Barillari M, Cerini R, Mucelli RP, Colletti V. Pneumolabyrinth and positional vertigo after stapedectomy. *Auris Nasus Larynx.* 2011; 38 (4): 547–50. DOI: 10.1016/j.anl.2010.12.010.
2. Scheid SC, Feehery JM, Willcox TO, Lowry LD. Pneumolabyrinth: a late complication of stapes surgery. *Ear Nose Throat J.* 2001 Oct; 80 (10): 750–3.
3. Mafee MF, Valvassori GE, Kumar A, Yannias DA, Marcus RE. Pneumolabyrinth: a new radiologic sign for fracture of the stapes footplate. *Am J Otol.* 1984; 5 (5): 374–5.
4. Botti C, Castellucci A, Crocetta FM, Fornaciari M, Giordano D, Bassi C, Ghidini A. Pneumolabyrinth: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2021; 278 (12): 4619–32. DOI: 10.1007/s00405-021-06827-0.
5. Ziade G, Barake R, El Natout T, El Natout MA. Late pneumolabyrinth after stapedectomy. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2016; 133 (5): 361–3. DOI: 10.1016/j.anorl.2015.10.005.
6. Gomes PS, Caselhos S, Vide AT, Fonseca R. Pneumolabyrinth: a rare complication of stapes surgery. *BMJ Case Rep.* 2019; 12 (11): e232190. DOI: 10.1136/bcr-2019-232190.
7. Kösling S, Woldag K, Meister EF, Reschke I, Heywang-Köbrunner SH. Value of computed tomography in patients with persistent vertigo after stapes surgery. *Invest Radiol.* 1995; 30 (12): 712–5. DOI: 10.1097/00004424-199512000-00004.
8. Comacchio F, Guidetti G, Guidetti R, Mion M. Pneumolabyrinth and recurrent paroxysmal positional vertigo after traumatic stapes fracture. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2019; 128 (4): 352–6. DOI: 10.1177/0003489418819553.
9. Bajin MD, Mocan BÖ, Saraç S, Sennaroğlu L. Early computed tomography findings of the inner ear after stapes surgery and its clinical correlations. *Otol Neurotol.* 2013; 34 (4): 639–43. DOI: 10.1097/MAO.0b013e31828be1ab.
10. Covelli E, Attanasio G, Cagnoni L, Viccaro M, Filipo R. Pneumolabyrinth after intratympanic steroid injection in patient with prosthesis of the stapes: a case report. *Am J Otolaryngol.* 2013; 34 (6): 759–61. DOI: 10.1016/j.amjoto.2013.06.002.
11. Hidaka H, Miyazaki M, Kawase T, Kobayashi T. Traumatic pneumolabyrinth: air location and hearing outcome. *Otol Neurotol.* 2012; 33 (2): 123–31. DOI: 10.1097/MAO.0b013e318241bc91.
12. Kobayashi T, Sakurada T, Ohyama K, Takasaka M. Inner ear injury caused by air intrusion to the scala vestibuli of the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1993; 113 (6): 725–30. DOI: 10.3109/00016489309135892.
13. Scheid SC, Feehery JM, Willcox TO, Lowry LD. Pneumolabyrinth: a late complication of stapes surgery. *Ear Nose Throat J.* 2001; 80 (10): 750–3.
14. Ederies A, Yuen HW, Chen JM, Aviv RI, Symons SP. Traumatic stapes fracture with rotation and subluxation into the vestibule and pneumolabyrinth. *Laryngoscope.* 2009; 119 (6): 1195–7. DOI: 10.1002/lary.20234.

СЛУЧАЙ ВЫДЕЛЕНИЯ *STREPTOCOCCUS MASSILIENSIS* ИЗ КРОВИ У ПАЦИЕНТА С МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТОМ

О. В. Лянг^{1,2} ✉, А. В. Пахилова-Попова¹, А. Р. Кабаева¹, О. В. Бойко¹, Н. А. Шамалов¹

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

На сегодняшний день *Str. massiliensis*, представитель нормобиоты полости рта человека, был обнаружен в крови пациентов всего дважды (что подтверждают публикации 2004 и 2015 гг.). В неврологическое отделение для проведения дообследования и лечения в плановом порядке поступил пациент с демиелинизирующим заболеванием нервной системы. По результатам лабораторных и инструментальных исследований был выставлен диагноз «менингоэнцефалит», позднее осложненный двусторонней полисегментарной пневмонией, синдромом системной воспалительной реакции и полиорганной недостаточностью. После резкого ухудшения состояния пациента в виде угнетения сознания, нарастания стволовой симптоматики было проведено исследование ликвора на маркеры вирусных и бактериальных инфекций методом ПЦР и выполнен микробиологический посев крови. В крови обнаружен рост и затем методом времяпролетной масс-спектрометрии идентифицирован *Streptococcus massiliensis*, чувствительный к бензилпенициллину, ванкомицину, левофлоксацину, линезолиду, сульфаметоксазолу / триметоприму, эритромицину. Таким образом, ввиду практически полного отсутствия данных о биологической роли *Str. massiliensis*, а также в связи с повышением частоты выделения бактерий рода *Streptococcus* из стерильных жидкостей человека представляется необходимым заострить внимание на данном случае выделения *Str. massiliensis* из крови.

Ключевые слова: менингоэнцефалит, *Streptococcus massiliensis*, MALDI-TOF масс-спектрометрия

Вклад авторов: О. В. Лянг — анализ литературы, написание текста статьи; А. В. Пахилова-Попова — выполнение бактериологических исследований, написание текста статьи; А. Р. Кабаева — написание клинической части текста статьи; О. В. Бойко — написание клинической части текста статьи; Н. А. Шамалов — идея написания и редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Викторовна Лянг
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, 117997, г. Москва, Россия; lyang@fccps.ru

Статья получена: 15.07.2022 **Статья принята к печати:** 07.08.2022 **Опубликована онлайн:** 08.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.030

CASE OF *STREPTOCOCCUS MASSILIENSIS* ISOLATION FROM BLOOD OF PATIENT WITH MENINGOENCEPHALITIS

Lyang OV^{1,2} ✉, Pakhilova-Popova AV¹, Kabaeva AR¹, Boyko OV¹, Shamalov NA¹

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

To date, *Streptococcus massiliensis*, the representative of human oral normobiota, was detected in the patients' blood only twice (which was confirmed by the reports published in 2004 and 2015). The patient with the demyelinating disease of the nervous system was routinely admitted to the neurological department for further examination and treatment. The diagnosis of meningoencephalitis was established based on the laboratory and instrumental tests. Meningoencephalitis was later complicated by bilateral multilobar pneumonia, systemic inflammatory response syndrome, and multisystem organ failure. After sharp deterioration of patient's health in the form of the decreased level of consciousness and brainstem symptoms, cerebrospinal fluid was tested by PCR for markers of viral and bacterial infections, and blood was cultured. Bacterial growth was detected in blood culture, and then *Streptococcus massiliensis*, susceptible to benzylpenicillin, vancomycin, levofloxacin, linezolid, sulfamethoxazole/trimethoprim, and erythromycin, was identified by time-of-flight mass spectrometry. Thus, it seems necessary to focus attention on this case of the *Str. massiliensis* isolation from blood due to the near total lack of data on the *Str. massiliensis* biological role and the more frequent isolation of bacteria of the genus *Streptococcus* from sterile human body fluids.

Keywords: meningoencephalitis, *Streptococcus massiliensis*, MALDI-TOF mass spectrometry

Author contribution: Lyang OV — literature review, manuscript writing; Pakhilova-Popova AV — bacteriological testing, manuscript writing; Kabaeva AR — writing clinical parts of the manuscript; Boyko OV — writing clinical parts of the manuscript; Shamalov NA — concept, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Lyang
Ostrovitianov, 1, str. 10, 117997, Moscow, Russia; lyang@fccps.ru

Received: 15.07.2022 **Accepted:** 07.08.2022 **Published online:** 08.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.030

Одной из самых распространенных групп микроорганизмов, колонизирующих различные локусы человеческого организма, являются бактерии, относящиеся к роду *Streptococcus*. Помимо широко известных и изученных видов *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* в последнее десятилетие все больше уделяют внимание и другим представителям данного рода. Важное влияние оказало появление современных и высокотехнологичных методов идентификации микроорганизмов, таких как

метод времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии. Все они во многом облегчили задачу идентификации бактерий, однако возникли дополнительные трудности при интерпретации результатов микробиологического исследования и оценке клинической значимости различных бактериальных патогенов, как со стороны медицинского микробиолога, так и со стороны врачей других специальностей. Представленный клинический случай посвящен одному из таких патогенов — *Streptococcus massiliensis*. В связи с небольшим числом публикаций,

посвященных данной теме, необходимо обращать внимание на данный патоген, в особенности в случае его выделения из стерильных в норме локусов.

Описание клинического случая

Пациент Д., 41 год, планово поступил 08.07.2021 в ФГБУ ФЦМН ФМБА России с диагнозом «Демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы» для проведения дообследования и лечения. Из анамнеза известно, что заболел остро, 29.05.2021 появилась сильная головная боль. В течение недели развилась гипертермия до 39 °С, при этом результат ПЦР на COVID-19 отрицателен, КТ легких — без патологии, пациент стал отмечать ухудшение памяти на текущие события. Госпитализирован в стационар 08.06.2021 в связи с развившимися грубыми речевыми нарушениями с диагнозом «острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу». Через 10 дней после улучшения пациент был выписан, однако дома в течение двух недель нарасла слабость в руках и ногах, появились и нарастали общемозговая симптоматика, дезориентация. При повторной госпитализации после проведения МРТ-исследования головного мозга был выставлен диагноз «Некротизирующий геморрагический энцефалит», пациент снова был выписан, после чего планово поступил в ФГБУ ФЦМН ФМБА России в неврологическое отделение. При уточнении анамнеза установлено, что хронические инфекционные заболевания, в том числе придаточных пазух носа, рото- и носоглотки у пациента отсутствуют.

При поступлении состояние пациента было оценено как средней тяжести, сознание ясное, присутствовали выраженные когнитивные, речевые, бульбарные нарушения. Результаты рутинных лабораторных исследований (общий анализ крови и мочи, биохимический профиль, коагулограмма) без существенных отклонений. В ликворе выявлены цитоз до 19 кл./мкл, умеренное повышение концентрации белка до 0,95 г/л и глюкозы до 4,1 ммоль/л. Проведена МРТ. МР-картина была характерна течению энцефалита в медио-базальных отделах обеих височных долей, слева с постгеморрагическим компонентом и формированием участков поствоспалительной энцефаломалиции. Был поставлен диагноз «Менингоэнцефалит».

Ухудшение состояния наступило 12.07.2021: появились менингеальная симптоматика, глазодвигательные нарушения. На следующий день, 13.07.2021, произошли нарушение сознания до уровня сопора, нарастание стволовой симптоматики. В крови и ликворе, взятых 13.07.2021 с целью бактериологического исследования, роста выявлено не было. Пациент был переведен в отделение анестезиологии и реанимации, где через два дня произошло угнетение сознания до умеренной комы, снизилась сатурация, развилась брадикардия. Пациента интубировали и подключили к аппарату искусственной вентиляции легких. По результатам лабораторных анализов выявлены гипергликемия до 9,8 ммоль/л, урикемия до 10,5 ммоль/л, лейкоцитоз до $13,4 \times 10^9/\text{л}$ с дальнейшим нарастанием до $20,4 \times 10^9/\text{л}$, укорочение АЧТВ до 19 с, повышение D-димера до 2925 нг/мл, уровень С-реактивного белка — до 56 мг/л. Несмотря на нарастание маркеров воспаления, температура тела пациента была в диапазоне 36,1–36,8 °С. Результаты ПЦР-исследований ликвора на вирус герпеса 1-, 2-, 6-го типов, микобактерии туберкулеза, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус от 15.07.2021

были отрицательными; бактериальный рост также не обнаружен. В качестве осложнений основного заболевания были выявлены двусторонняя полисегментарная пневмония (в бронхоальвеолярном лаваже обнаружены *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium striatum*, *Klebsiella pneumoniae*), синдром системной воспалительной реакции и полиорганная недостаточность, назначена комплексная антимикробная терапия.

В связи с тяжелым состоянием пациента и сохраняющимся угнетением сознания 19.07.2021 повторно была взята кровь и ликвор для проведения бактериологического культурального исследования, во флаконы «BactAlert Aerobic» и «BactAlert Anaerobic», кровь в объеме 10 мл в каждый флакон, ликвор — в объеме 2 мл в каждый флакон. Флаконы были доставлены в бактериологическую лабораторию в течение 1 ч, инкубация флаконов проводилась в автоматическом гемокультиваторе BactAlert 3D. Через 72 ч в крови во флаконе «BactAlert Anaerobic» был получен рост.

Первичный посев гемокультуры проводили на готовые плотные питательные среды (Биомедиа; Россия): колумбийский агар с бараньей кровью, шоколадный агар с факторами роста, хромогенный агар для обнаружения и подсчета уропатогенных бактерий, агар Макконки, агар Сабуро; инкубировали в анаэробных условиях. Первичный рост получен через 48 ч инкубации при 37 °С на колумбийском кровяном и шоколадном агаре; обнаружены мелкие серые матовые колонии.

Идентификацию микроорганизмов проводили на масс-спектрометре Microflex (Bruker; Германия), работающем по принципу времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией ионизацией MALDI-TOF. Применяли метод прямого нанесения чистой культуры на мишень [1]. Данным методом был идентифицирован микроорганизм *Streptococcus massiliensis*. *S. massiliensis* впервые за 2,5 года работы был выделен в биоматериале пациентов ФГБУ ФЦМН ФМБА России.

Обсуждение клинического случая

Стрептококки — это группа аэробных грамположительных сферических микроорганизмов, включающая множество факультативных анаэробов. Стрептококки обитают в самых разнообразных средах человеческого организма, причем не только в качестве патогенов, но и как часть нормального микробиома. По способности вызывать гемолиз при культивировании на кровяном агаре стрептококки подразделяют на альфа-, бета- и гамма-гемолитические. Альфа-гемолитические стрептококки (обычно называемые стрептококками *viridans*) дают зону зеленоватой окраски, образующуюся в результате частичного гемолиза [2]. Стрептококки *viridans* составляют часть нормальной флоры полости рта человека, а также дыхательных, половых и пищеварительных путей [3].

S. massiliensis, относящийся в настоящее время к группе *viridans*, впервые был выделен из крови пациента, поступившего в июне 2004 г. в марсельскую больницу Ла Тимон в Марселе с пулевым ранением в голову. В 2006 г. авторы, выявившие этот новый микроорганизм, опубликовали статью с подробным описанием идентификации [3]. Штамм был назван *massiliensis*, от *Massilia* — древнегреческое и древнеримское название города Марселя, где он был выделен. Колонии, полученные на кровяном агаре, были описаны как поверхностные,

округлые, от белого до сероватого цвета, блестящие, выпуклые, негемолитические, диаметром 1–2 мм через 48 ч при 37 °С в CO₂-обогащенной атмосфере.

Вторая имеющаяся на сегодняшний день публикация в научной литературе, посвященная *S. massiliensis*, вышла в 2015 г. Группа авторов проводила филогенетический анализ 17 видов стрептококков, в том числе *S. massiliensis*, с целью определения мест их обитания. Было продемонстрировано, что *S. massiliensis*, обнаруженный в крови человека, является обычным обитателем полости рта человека [4].

Для определения антибиотикочувствительности было проведено исследование *S. massiliensis* на микробиологическом анализаторе Vitek 2 compact (bioMérieux SA; Франция) с использованием карты Vitek 2 AST-ST03. На картах AST турбидиметрическим методом детекции можно определить минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика и проанализировать при помощи специализированного программного обеспечения AES. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с критериями EUCAST-2021. Была получена чувствительность к следующим антибактериальным препаратам: бензилпенициллин, ванкомицин, левофлоксацин, линезолид, сульфаметоксазол/триметоприм, эритромицин. Этиологическая роль данного микроорганизма сомнительна, при этом риск возможной контаминации минимизирован за счет использования при взятии венозной крови на посев

стандартной операционной процедуры, разработанной на основе Российских практических рекомендаций по преаналитическому этапу микробиологических исследований [5].

Результаты контрольных бактериологических исследований крови и ликвора от 28.07.2021 и 02.08.2021 были отрицательными. Пациент в удовлетворительном состоянии был переведен 16.08.21 в неврологическое отделение, а затем в отделение медицинской реабилитации, выписан 10.09.21 со значительным регрессом неврологической симптоматики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в отечественной и зарубежной литературе участились сообщения о случаях выделения бактерий рода *Streptococcus* из крови человека и других стерильных жидкостей. Возможно, это связано с увеличением количества иммунокомпрометированных пациентов с первичными и вторичными иммунодефицитными состояниями. Отмечены также случаи выделения стрептококков из крови пациентов с различными неврологическими заболеваниями и заболеваниями сердечно-сосудистой системы [6–8]. По этой причине случаи выделения «редких» видов бактерий рода *Streptococcus* требуют пристального внимания, как со стороны медицинских микробиологов, так и со стороны врачей других специальностей.

Литература

1. Чеботарь И. В., Поликарпова С. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III–IV групп патогенности. *Лабораторная служба*. 2018; 7 (2): 78–86.
2. Bush LM, Vazquez-Pertejo MT. MSD Manual for the Professional. Streptococcal Infections. 2021. Available from: <https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/streptococcal-infections>.
3. Glazunova OO, Raoult D, Roux V. *Streptococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a patient blood culture. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56 (Pt 5): 1127–31.
4. Póntigo F, Silva C, Moraga M, Flores SV. *Streptococcus massiliensis* in the human mouth: a phylogenetic approach for the inference of bacterial habitats *Genetics and Molecular Research*. 2015; 14 (4): 19184–90.
5. Алиева Е. В., Кафтырева Л. А., Макарова М. А., Тартаковский И. С. Практические рекомендации по преаналитическому

- этапу микробиологических исследований. Часть I. Бактериологические исследования. *Лабораторная служба*. 2020; 9 (2): 45–66.
6. Hachiya Y, Miyata R, Tanuma N, Hongou K, Tanaka K, Shimoda K, et al. Autoimmune neurological disorders associated with group-A beta-hemolytic streptococcal infection. *Brain Dev*. 2013; 35 (7): 670–4. DOI: 10.1016/j.braindev.2012.10.003. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23142103.
7. Madathil S, Matsumoto S, Mathews KD, Glykys J. Central Nervous System Infections Due to *Streptococcus anginosus* Group: A Single-Center Case Series. *J Child Neurol*. 2022; 37 (3): 210–7. DOI: 10.1177/08830738211052132. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34851209.
8. Bhatia NS, Farell JJ, Sampath R, Ranken R, Rounds MA, Ecker DJ, et al. Identification of *Streptococcus intermedius* central nervous system infection by use of PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (12): 4160–2. DOI: 10.1128/JCM.01296-12. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23035188; PMCID: PMC3502992.

References

1. Chebotar IV, Polikarpova SV, Bocharova YuA, Mayanskij NA. Ispol'zovanie vremyaproletnoj mass-spektrometrii s matrichno-aktivirovannoj lazernoj desorbciiej/ionizaciej (MALDI-TOF MS) dlya identifikacii bakterial'nyx i gribkovyx vozбудitelej III–IV grupp patogennosti. *Laboratornaya sluzhba*. 2018; 7 (2): 78–86. Russian.
2. Bush LM, Vazquez-Pertejo MT. MSD Manual for the Professional. Streptococcal Infections. 2021. Available from: <https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/streptococcal-infections>.
3. Glazunova OO, Raoult D, Roux V. *Streptococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a patient blood culture. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56 (Pt 5): 1127–31.
4. Póntigo F, Silva C, Moraga M, Flores SV. *Streptococcus*

- massiliensis* in the human mouth: a phylogenetic approach for the inference of bacterial habitats *Genetics and Molecular Research*. 2015; 14 (4): 19184–90.
5. Alieva EV, Kaftyreva LA, Makarova MA, Tartakovskij IS. Prakticheskie rekomendacii po preanaliticheskomu ehtapu mikrobiologicheskix issledovanij. Chast' I. Bakteriologicheskije issledovaniya. *Laboratornaya sluzhba*. 2020; 9 (2): 45–66. Russian.
6. Hachiya Y, Miyata R, Tanuma N, Hongou K, Tanaka K, Shimoda K, et al. Autoimmune neurological disorders associated with group-A beta-hemolytic streptococcal infection. *Brain Dev*. 2013; 35 (7): 670–4. DOI: 10.1016/j.braindev.2012.10.003. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23142103.
7. Madathil S, Matsumoto S, Mathews KD, Glykys J. Central

Nervous System Infections Due to *Streptococcus anginosus* Group: A Single-Center Case Series. *J Child Neurol*. 2022; 37 (3): 210–7. DOI: 10.1177/08830738211052132. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34851209.

8. Bhatia NS, Farrell JJ, Sampath R, Ranken R, Rounds MA, Ecker DJ,

et al. Identification of *Streptococcus intermedius* central nervous system infection by use of PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (12): 4160–2. DOI: 10.1128/JCM.01296-12. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23035188; PMCID: PMC3502992.

ЗВЕНО ПАТОГЕНЕЗА НОЧНОЙ ВНЕЗАПНОЙ СМЕРТИ ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Л. М. Макаров ✉

Федеральный научно-клинический центр детей и подростков Федерального медико-биологического агентства России, Центр синкопальных состояний и сердечных аритмий, Москва, Россия

Основную часть группы с наибольшим риском внезапной смерти (ВС) составляют больные с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). В большинстве случаев ВС происходит в ночное время. При этом степень ХСН и фракция выброса не всегда определяет риск именно ВС в исходе заболевания. Основываясь на анализе исследований по теме и описанных механизмов ВС, высказано мнение о возможной роли нарушенной адаптации («гиперадаптации»: $QT/RR \text{ slope} > 0,24$) интервала QT к ЧСС у больных с ХСН, с максимальным удлинением интервала QT именно в ночное время, что может приводить к запуску жизнеугрожающих желудочковых тахикардий, запускающих механизм ВС при ХСН. Возможно, что выявление «гиперадаптации» QT у больных с ХСН может формировать группу повышенного риска по ВС при СН и быть дополнительным показанием в имплантации кардиовертера дефибриллятора.

Ключевые слова: внезапная смерть, сердечная недостаточность, ночь, QT-динамика, холтеровское мониторирование

✉ **Для корреспонденции:** Леонид Михайлович Макаров
ул. Москворечье, д. 20, г. Москва, 115409, Россия; dr.leonidmakarov@mail.ru

Статья получена: 06.07.2022 **Статья принята к печати:** 23.07.2022 **Опубликована онлайн:** 09.08.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.026

THE COMPONENT OF PATHOGENESIS OF SUDDEN NOCTURNAL DEATH IN PATIENTS WITH HEART FAILURE

Makarov LM ✉

Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents of the Federal Medical and Biological Agency, Center for Syncope and Cardiac Arrhythmias, Moscow, Russia

Patients with chronic heart failure (CHF) constitute the bulk of the group at the highest risk of sudden death (SD). The majority of SDs occur at night. However, CHF grade and ejection fraction do not always determine the risk of SD in the outcome of the disease. The following view has been expressed based on the research on the topic and the described mechanisms underlying SD: impaired QT interval adaptation ("hyperadaptation": $QT/RR \text{ slope} > 0.24$) to HR in patients with CHF who show maximum QT interval prolongation during the night, capable of triggering life-threatening ventricular tachyarrhythmias that trigger the mechanism of SD associated with CHF, can play some role. It is possible that identification of QT interval hyperadaptation in patients with CHF makes it possible to form the group at high risk of SD associated with HF and can become an additional indication for implantation of cardioverter-defibrillator.

Keywords: sudden death, heart failure, night, QT dynamics, Holter monitoring

✉ **Correspondence should be addressed:** Leonid M. Makarov
Moskvorechye, 20, Moscow, 115409, Russia; dr.leonidmakarov@mail.ru

Received: 06.07.2022 **Accepted:** 23.07.2022 **Published online:** 09.08.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.026

Внезапная смерть (ВС) является одним из главных вызовов современной кардиологии. Наибольший риск ВС отмечается у лиц с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) на фоне ишемической болезни сердца (ИБС). До 20% больных в этой группе умирают внезапно [1]. Анализ результатов исследования PRAISE (Prospective randomized amlodipine survival evaluation) показал, что достоверно чаще (44%) больные с ишемическим генезом СН умирали во сне с 04 до 08 ч, по сравнению с другими четырехчасовыми интервалами суток [2].

Общеизвестным и независимым фактором риска ВС является удлинение интервала QT. При изучении циркадианной динамики интервала QT у больных с ХСН был выявлен более продолжительный интервал QT по сравнению как со здоровыми, так и с больными ИБС без ХСН [3]. Однако достоверных различий в значениях интервала QT в дневное и ночное время в данной работе не отмечено. Относительно недавно в широкую клиническую практику вошел метод оценки частотного взаимодействия интервала QT и уровня частоты сердечных сокращений (ЧСС), по данным холтеровского мониторирования, получивший название «QT-динамика» [4]. При его использовании считается, что основной показателем QT-динамики коэффициент линейной регрессии (slope) между QT- и RR-интервалами определяет степень изменчивости

интервала QT в зависимости от изменений ЧСС (рис. 1). В принятой интерпретации QT-динамики выделяют «крутой» (step) или «плоский» (flat) slope QT/RR с высокими или низкими значениями коэффициента линейной регрессии [4].

Ранее были определены критерии физиологической нормы QT-динамики (slope QT/RR = 0,13–0,24) и предложен подход к ее клинической интерпретации, с выделением понятий «гиперадаптации» и «гипоадаптации» интервала QT [5–7]. Гиперадаптация QT определяется при значениях slope QT/RR > 0,24 и характеризуется избыточным удлинением интервала QT при брадикардии и укорочением при тахикардии. Гипоадаптация QT (slope QT/RR < 0,13) характеризуется недостаточным «подстраиванием» интервала QT под ЧСС при любых ее изменениях. Данные критерии интерпретации QT-динамики вошли в «Национальные российские рекомендации по применению методики холтеровского мониторирования в клинической практике» [8]. Впервые этот подход был применен у здоровых новорожденных детей с возрастной физиологической синусовой тахикардией [5], но, оценивая предложенную интерпретацию QT-динамики, один из ведущих мировых экспертов в электрокардиологии M. Malik отметил ее перспективность: «...концепция гипо- и гиперадаптации интервала QT к ЧСС заслуживает дальнейшего изучения в различных популяциях» [9]. Нам

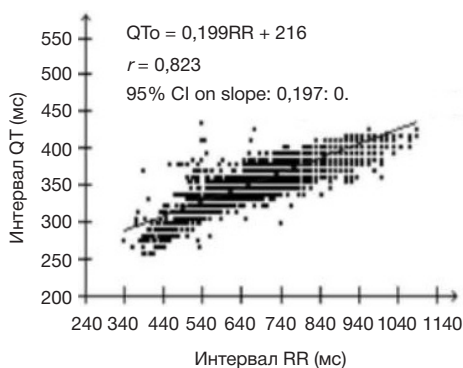


Рис. 1. Представление результатов оценки 24-часовой QT-динамики у здорового мужчины 22 лет в современных системах холтеровского мониторинга. Показатель slope QT/RR (QT0) = 0,199

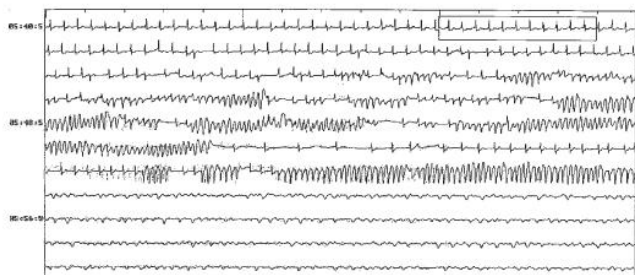


Рис. 2. Развитие желудочковой тахикардии в 05:44, фибрилляции желудочков и внезапной смерти в 05:56 у больной 77 лет с ишемической кардиомиопатией и фракцией выброса 38%. Опции оценки QT-динамики в используемой системе не было установлено

тоже показалось перспективным применить данный подход в оценке возможных механизмов ВС при ХСН. Мы не обследовали группы больных с ХСН, хотя отдельные случаи наблюдения ВС в ночное время больных с ХСН у нас были (рис. 2 и 3). Российских работ с применением метода QT-динамики у больных с ХСН мы не нашли, но некоторые мировые исследования показали, на наш взгляд, интересные результаты. Так, при прогнозировании риска ВС у больных с ишемической кардиомиопатией, по результатам исследования EMIAT, было показано, что внезапно умершие больные с ХСН имели достоверно высокие значения slope QT/RR по сравнению с выжившими (0,26 против 0,16 соответственно) [10]. По данным других авторов, у больных с ХСН увеличение slope QT/RR выше 0,28 оказалось строгим независимым предиктором ВС (относительный риск — 3,47; 95%-й доверительный интервал — 1,43–8,40; $p = 0,006$) [11]. Результаты этих исследований показали, что гипердаптация QT к ЧСС с непропорциональным удлинением QT при брадикардии в ночное время характерна для внезапно умерших больных с ХСН.

По результатам записей имплантируемых кардиовертеров-дефибрилляторов у больных ХСН отмечено, что при снижении ФВ ниже 30% возрастает частота возникновения желудочковых тахикардий во вторую половину ночи, по сравнению с первой [12]. Этот период сна характеризуется минимальной ЧСС за сутки [13], а следовательно, максимальным удлинением интервала QT при его «гипердаптации». Для второй половины ночи характерна бо́льшая представленность фазы быстрого сна [13], в которой у больных ХСН чаще регистрируют желудочковые экстрасистолы (163,0 против 118,4) [14], при том, что быстрая фаза занимает всего около 20% времени всего сна. Такое сочетание факторов (удлинение QT и повышение

аритмогенной электрической нестабильности миокарда), возможно, делают именно этот период наиболее уязвимым для развития фатальных аритмий у больных с ХСН.

Во вступительной лекции Всемирного веб-симпозиума по внезапной сердечной смерти Международного холтеровского общества (ISHNE Sudden Cardiac Death World Wide Internet Symposium) было отмечено: «... несмотря на то, что первичный синдром удлиненного интервала QT относительно нечасто встречается по сравнению со многими другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, изучив механизмы развития аритмий при нем, мы сможем понять всю проблему внезапной сердечной смерти». В подтверждение этого тезиса можно отметить, что гипердаптация интервала QT характерна для больных с третьим молекулярно-генетическим вариантом синдрома удлиненного интервала QT (рис. 4), смерть которых происходит также преимущественно во сне [15]. Это может свидетельствовать об общих механизмах патогенеза ВС при различных основных причинах заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из вышесказанного, мы сформулировали следующую гипотезу:

- Гипердаптация интервала QT у больных ХСН, с непропорциональным удлинением интервала QT и учащением желудочковых тахикардий ночью, делает эту группу наиболее предрасположенной к развитию жизнеугрожающих аритмий и ВС в ночное время.
 - Выявление гипердаптации QT у больных ХСН позволяет формировать группу риска по развитию ВС и может служить дополнительным показанием к имплантации кардиовертера дефибриллятора.
- Подтверждение или опровержение этой гипотезы возможно при проведении целенаправленных исследований, что, очевидно, не представляет практических трудностей, так как уже накоплен достаточный объем холтеровских записей у больных с ХСН в многочисленных исследованиях.

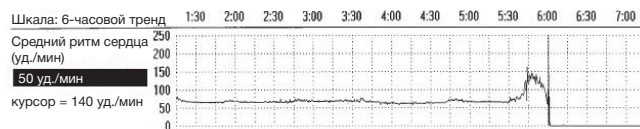


Рис. 3. Тренд ночной ЧСС с развитием внезапной смерти в 05:56 (см. рис. 1) в период повышенной дисперсии ЧСС, соответствующей фазе быстрого сна при классической сомнографии [8, 13] у больной 77 лет с ишемической кардиомиопатией

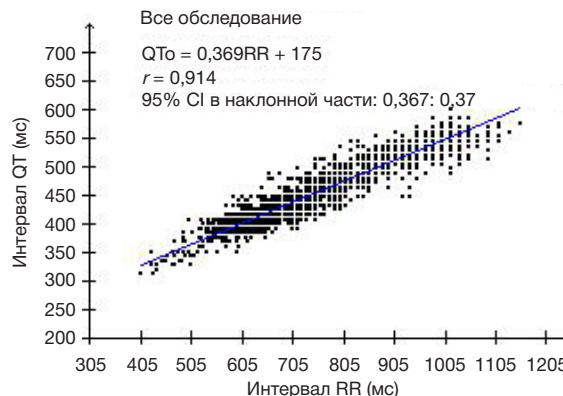


Рис. 4. Гипердаптация QT у больного с третьим молекулярно-генетическим вариантом синдрома удлиненного интервала QT. Slope QT/RR (QT0) = 0,369 при норме 0,13–0,24

Литература

1. Marijon E, Garcia R, Narayanan K, Karam N, Jouven X. Fighting against sudden cardiac death: need for a paradigm shift — Adding near-term prevention and pre-emptive action to long-term prevention. *Eur Heart J.* 2022; 43 (15): 1457–64. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab903.
2. Carson P, O'Connor C, Miller A, Anderson S, Belkin R, Neuberg G, et al. Circadian rhythm and sudden death in heart failure: results from Prospective Randomized Amlodipine Survival Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36 (2): 541–6. DOI: 10.1016/s0735-1097(00)00728-2.
3. Hansen S, Rasmussen V, Torp-Pedersen C, Jensen G. QT intervals and QT dispersion determined from a 12-Lead 24-hour Holter recording in patients with coronary artery disease and patients with heart failure. *A.N.E.* 2008; 13 (1): 22–30 DOI: 10.1111/j.1542-474X.2007.00197.x.
4. Locati E. QT interval duration and adaptation to heart rate. In: Zareba W, Maison-Blanche P, Locati E, editors). *Noninvasive Electrocardiology in Clinical Practice.* Armonk, NY: Futura Publ. Co., 2001; p.71–96.
5. Makarov L, Komoliatova V, Zevald N, Schmidt G, Muller A, Serebruany V. QT dynamicity, microvolt T-wave alternans, and heart rate variability during 24-hour ambulatory electrocardiogram monitoring in the healthy newborn of first to fourth day of life. *Journal of Electrocardiology.* 2010; 43: 8–14. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2009.11.001.
6. Makarov L. The QT interval and QT dynamicity during Holter monitoring in children and adolescents. *Turkish Journal of Arrhythmia, Pacing and Electrophysiology (Türk Aritmi, Pacemaker ve Elektrofizyoloji Dergisi).* 2010; 8 (1): 7–14.
7. Макаров Л. М., Комолятова В. Н., Мирошникова Е. Н., Казанцева М. А. Физиологическое значение и нормативные параметры частотной адаптации интервала QT при холтеровском мониторировании у здоровых лиц молодого
8. Макаров Л. М., Комолятова В. Н., Куприянова О. О., Первова Е. В., Рябыкина Г. В., Соболев А. В., и др. Национальные российские рекомендации по применению методики холтеровского мониторирования в клинической практике. *Российский кардиологический журнал.* 2014; (2): 6–71. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-2-6-71>.
9. Malik M. ECG and VT/VF Symposium. *Journal of Electrocardiology.* 2010; 43: 1–3. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2009.11.003.
10. Milliez P, Leenhardt A, Maisonblanche P, Vicaut E, Badiilini F, Silliste C, et al. EMIAT Investigators. Usefulness of ventricular repolarization dynamicity in predicting arrhythmic deaths in patients with ischemic cardiomyopathy (from the European Myocardial Infarct Amiodarone Trial). *Am J Cardiol.* 2005; 95 (7): 821–6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.11.047.
11. Pathak A, Curnier D, Fourcade J, Roncalli J, Stein PK, Hermant P, et al. QT dynamicity: a prognostic factor for sudden cardiac death in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2005; 7 (2): 269–75. DOI: 10.1016/j.ejheart.2004.10.016.
12. Tofler GH, Gebara OC, Mittleman MA, et al. Morning peak in ventricular tachyarrhythmias detected by time of implantable cardioverter/defibrillator therapy. The CPI Investigators. *Circulation* 1995; 92: 1203–8. DOI:10.1161/01.cir.92.5.1203.
13. Макаров Л. М. Холтеровское мониторирование. 4-е издание. М.: Медпрактика, 2017; 504 с.
14. Ryan C, Usui K, Floras J, Bradley T. Effect of continuous positive airway pressure on ventricular ectopy in heart failure patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax.* 2005; 60: 781–5. DOI: 10.1136/thx.2005.040972.
15. Schwartz P, Priori S, Spazzolini C, Moss A, Vincent G, Napolitano C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001; 2; 103 (1): 89–95. DOI: 10.1161/01.cir.103.1.89.

References

1. Marijon E, Garcia R, Narayanan K, Karam N, Jouven X. Fighting against sudden cardiac death: need for a paradigm shift — Adding near-term prevention and pre-emptive action to long-term prevention. *Eur Heart J.* 2022; 43 (15): 1457–64. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab903.
2. Carson P, O'Connor C, Miller A, Anderson S, Belkin R, Neuberg G, et al. Circadian rhythm and sudden death in heart failure: results from Prospective Randomized Amlodipine Survival Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36 (2): 541–6. DOI: 10.1016/s0735-1097(00)00728-2.
3. Hansen S, Rasmussen V, Torp-Pedersen C, Jensen G. QT intervals and QT dispersion determined from a 12-Lead 24-hour Holter recording in patients with coronary artery disease and patients with heart failure. *A.N.E.* 2008; 13 (1): 22–30 DOI: 10.1111/j.1542-474X.2007.00197.x.
4. Locati E. QT interval duration and adaptation to heart rate. In: Zareba W, Maison-Blanche P, Locati E, editors). *Noninvasive Electrocardiology in Clinical Practice.* Armonk, NY: Futura Publ. Co., 2001; p.71–96.
5. Makarov L, Komoliatova V, Zevald N, Schmidt G, Muller A, Serebruany V. QT dynamicity, microvolt T-wave alternans, and heart rate variability during 24-hour ambulatory electrocardiogram monitoring in the healthy newborn of first to fourth day of life. *Journal of Electrocardiology.* 2010; 43: 8–14. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2009.11.001.
6. Makarov L. The QT interval and QT dynamicity during Holter monitoring in children and adolescents. *Turkish Journal of Arrhythmia, Pacing and Electrophysiology (Türk Aritmi, Pacemaker ve Elektrofizyoloji Dergisi).* 2010; 8 (1): 7–14.
7. Makarov LM, Komoliatova VN, Miroshnikova EN, Kazantseva MA. Физиологическое значение и нормативные параметры частотной адаптации интервала QT при холтеровском мониторировании у здоровых лиц молодого возраста. *Kardiologiya.* 2008; 48 (4): 54–58. PMID: 18447842. Russian.
8. Makarov LM, Komolyatova VN, Kupriyanova OA, Pervova EV, Ryabykina GV, Sobolev AV i dr. Nacional'nye rossijskie rekomendacii po primeneniyu metodiki xolterovskogo monitorirovaniya v klinicheskoy praktike. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal.* 2014; (2): 6–71. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-2-6-71>. Russian.
9. Malik M. ECG and VT/VF Symposium. *Journal of Electrocardiology.* 2010; 43: 1–3. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2009.11.003.
10. Milliez P, Leenhardt A, Maisonblanche P, Vicaut E, Badiilini F, Silliste C, et al. EMIAT Investigators. Usefulness of ventricular repolarization dynamicity in predicting arrhythmic deaths in patients with ischemic cardiomyopathy (from the European Myocardial Infarct Amiodarone Trial). *Am J Cardiol.* 2005; 95 (7): 821–6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.11.047.
11. Pathak A, Curnier D, Fourcade J, Roncalli J, Stein PK, Hermant P, et al. QT dynamicity: a prognostic factor for sudden cardiac death in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2005; 7 (2): 269–75. DOI: 10.1016/j.ejheart.2004.10.016.
12. Tofler GH, Gebara OC, Mittleman MA, et al. Morning peak in ventricular tachyarrhythmias detected by time of implantable cardioverter/defibrillator therapy. The CPI Investigators. *Circulation* 1995; 92: 1203–8. DOI:10.1161/01.cir.92.5.1203.
13. Makarov LM. Холтеровское мониторирование. 4-е издание. М.: Медпрактика, 2017; 504 с. Russian.
14. Ryan C, Usui K, Floras J, Bradley T. Effect of continuous positive airway pressure on ventricular ectopy in heart failure patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax.* 2005; 60: 781–5. DOI: 10.1136/thx.2005.040972.
15. Schwartz P, Priori S, Spazzolini C, Moss A, Vincent G, Napolitano C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001; 2; 103 (1): 89–95. DOI: 10.1161/01.cir.103.1.89.