

УДК [611.819.5+616-089.844]-77

**СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БИОСИНТЕЗИРОВАННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ (НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ) ПО РЕЗУЛЬТАТАМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ**

**Петр Михайлович ЛАРИОНОВ<sup>1</sup>, Максим Леонидович ФИЛИППЕНКО<sup>2</sup>, Вячеслав Владимирович СТУПАК<sup>1</sup>, Алексей Валерьевич ХАРЧЕНКО<sup>1</sup>, Василий Николаевич АФОНЮШКИН<sup>2</sup>, Валерий Павлович ТЕРЕЩЕНКО<sup>1</sup>, Андрей Александрович БАРИНОВ<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8

<sup>3</sup> ООО ОПТЭК 630058, г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28

Целью исследования явилось изучение структурных особенностей биосинтезированной целлюлозы по результатам конфокальной микроскопии. **Материал и методы.** Для анализа использована очищенная от бактериальных продуктов биосинтезированная наноцеллюлоза, синтезированная *Glucanacetobacter xylinus* S3 и полученная в виде пленок толщиной от 1 до 2 мм. Путем микроскопии исследовались ее нативные криостатные срезы с использованием прямого и инвертированного конфокальных микроскопов LSM 710, LSM 780 NLO производства Zeiss. **Результаты и их обсуждение.** Структурной основой биосинтезированной целлюлозы являются волокна диаметром от 25 до 220 нм и длиной 100 мкм. На поперечных срезах определяются макроволоконистые структуры диаметром около 100 мкм, сформированные радиально ориентированными микроволокнами.

**Ключевые слова:** бактериальная целлюлоза, конфокальная микроскопия, структурный анализ.

В настоящее время в клинической практике используется ряд коммерческих изделий медицинского назначения, нацеленных на замещение дефектов твердой мозговой оболочки при проведении краниальных нейрохирургических операций. Эти изделия применяются для устранения ликвореи и/или ее профилактики. Исходными материалами являются синтетические полимеры – полиуретан (Neuro-Patch®, B. Braun Melsungen AG, Германия), ксеноматериалы – бычий коллагеновый матрикс (Duradry, Technodry, Belo Horizonte MG, Бразилия) и коллагеновые пластины (TissuDura, Baxter Healthcare SA, Швейцария) [6]. Также используется аллогенный материал – фиксированная альдегидами трупная твердая мозговая оболочка. Кроме того, применяются

различные способы пластики твердой мозговой оболочки собственными тканями пациента [1]. В то же время поиск и адаптация новых материалов непрерывно продолжаются. Так, в недавнем проспективном рандомизированном мультицентровом клиническом испытании показана высокая клиническая эффективность искусственной твердой мозговой оболочки (Synthecel Dura Repair, DePuy Synthes, США) при относительно невысокой стоимости. Ее исходным материалом являлась биосинтезированная целлюлоза (БЦ), или целлюлоза бактериального происхождения (наноцеллюлоза) [9].

В подавляющем большинстве публикаций, затрагивающих структурный анализ биосинтезированной целлюлозы с использованием конфо-

*Ларионов П.М.* – д.м.н., проф., руководитель группы морфологии и молекулярно-генетических исследований, e-mail: ptrl@mail.ru

*Филиппенко М.Л.* – к.б.н., зав. лабораторией фармакогеномики, e-mail: mlfilipenko@gmail.com

*Ступак В.В.* – д.м.н., проф., главный научный сотрудник отделения нейрохирургии, e-mail: VStupak@niito.ru

*Харченко А.В.* – врач-нейрохирург отделения нейрохирургии, e-mail: alexdok2000@rambler.ru

*Афонюшкин В.Н.* – к.с.-х.н. наук, ведущий инженер лаборатории фармакогеномики

*Терещенко В.П.* – ординатор, e-mail: tervp@ngs.ru

*Баринов А.А.* – ведущий эксперт по конфокальной микроскопии, e-mail: Barinov@optecgroup.com

кальной микроскопии, раскрываются детали бактериального синтеза первичных микрофибрилл на основе техник прижизненной микроскопии [8]. Но до настоящего времени нет опубликованных работ, посвященных изучению структурных особенностей биосинтезированной наноцеллюлозы с использованием аутофлуоресценции и конфокальной микроскопии.

Цель исследования – дать структурную характеристику биосинтезированной целлюлозы по результатам конфокальной микроскопии с использованием аутофлуоресценции.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для анализа использовались очищенные от бактериальных продуктов и последовательно отмытые в двух порциях 70%-го спирта и двух сменах дистиллированной воды 6 пленок размером 5×5 см толщиной от 1 до 2 мм биосинтезированной наноцеллюлозы, синтезированной *Glucanacetobacter xylinus* S3 при росте в среде LB, температуре 25 °С в течение 3–6 дней. Исследовались нативные препараты, изготавливались продольные и поперечные криостатные срезы толщиной около 20 мкм, проводилась микроскопия с использованием прямого и инвертированного конфокальных микроскопов LSM 710, LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Германия). Для получения, обработки и анализа изображений использовалась программа ZEN 2012, с модулями 3D-реконструкции, анализа спектральных характеристик материалов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе проанализированы спектральные характеристики нативных препаратов биосинтезированной целлюлозы. Анализ спектральных характеристик выполнялся с шагом 9,2 нм, от 423 до 725 нм при возбуждении УФ-лазера на 405 нм. Установлено, что возбуждение аутофлуоресценции наблюдалось в полосе от 423 до 482 нм (рис. 1) с максимальным пиком интенсивности на 443 нм (рис. 2).

Обзорная микроскопия нативных препаратов с использованием оптимальных параметров аутофлуоресценции показала, что структурной особенностью биосинтезированной целлюлозы является ее волокнистая основа (рис. 3).

Измерение диаметров волокон нативных препаратов, формирующих структурную основу биосинтезированной целлюлозы, выявило, что они распределялись в диапазоне от 25 до 220 нм.

Изучение поперечных срезов с восстановлением 3D-структуры позволило определить следующий уровень структурной организации биосинтезированной целлюлозы – формирование макроволокон размером от 20 до 100 мкм, характеризующихся фестончатыми краями и радиальной ориентацией волокон из центра к периферии (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что БЦ образуется в результате экстрацеллюлярной секреции нановолокон, про-

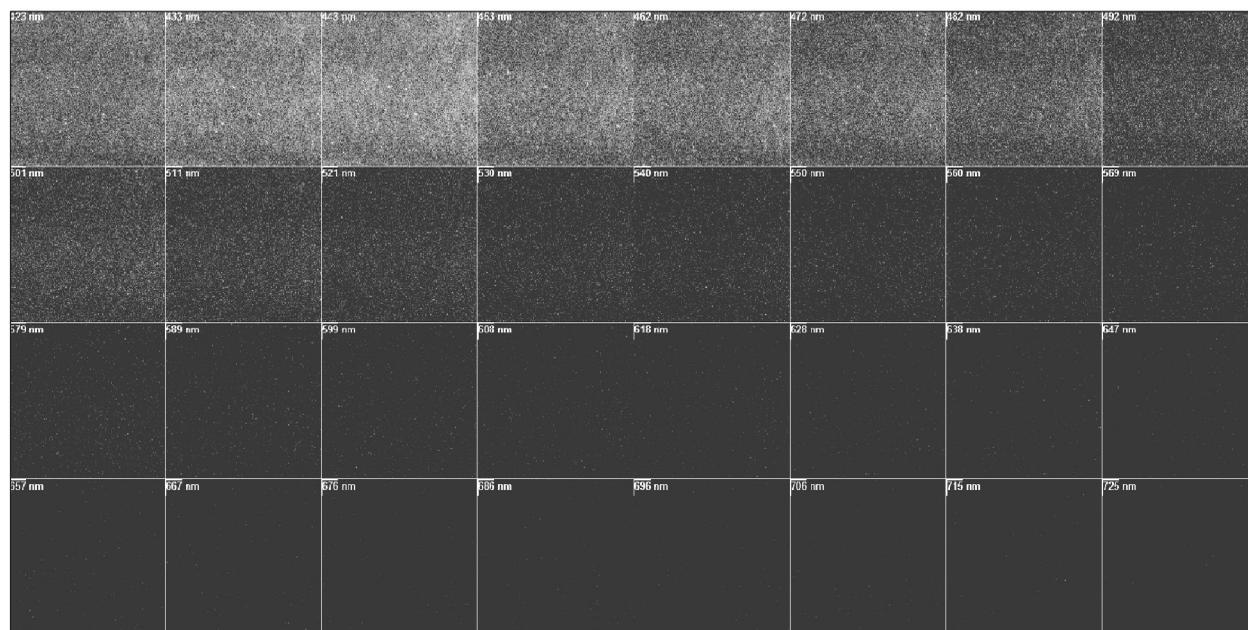


Рис. 1. Визуализация характеристик аутофлуоресценции биосинтезированной целлюлозы, возбуждение на 405 нм

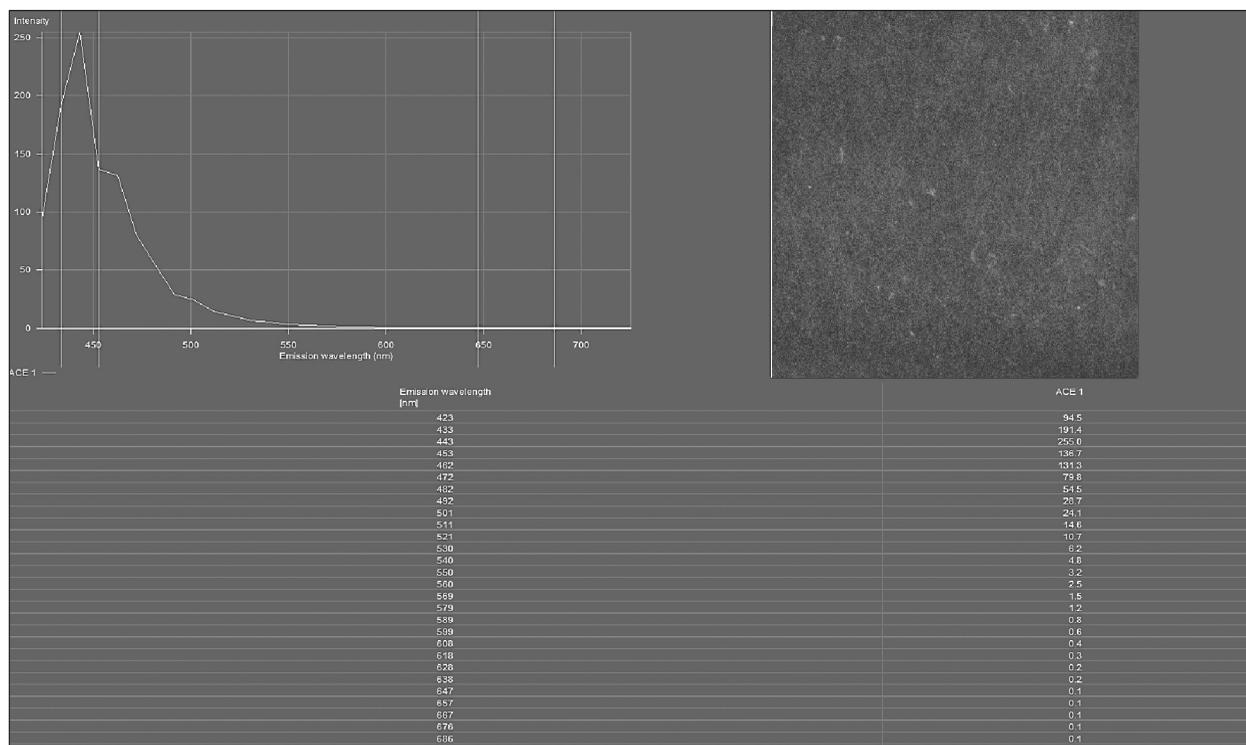


Рис. 2. Аутофлуоресценция биосинтезированной целлюлозы с максимальным пиком интенсивности на 443 нм при возбуждении на 405 нм, объектив  $\times 63$

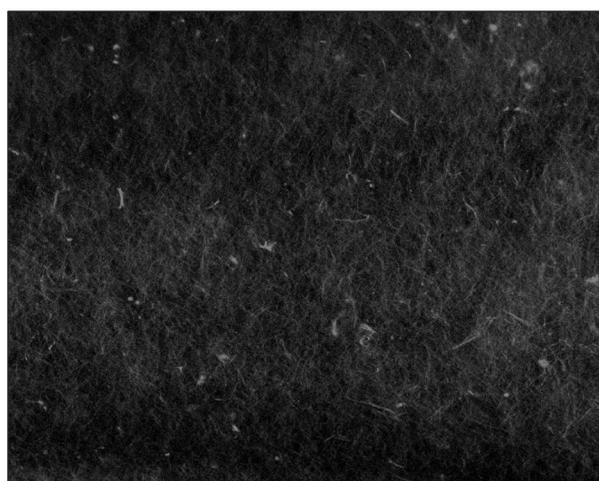


Рис. 3. Двухмерное изображение – волоконная основа биосинтезированной целлюлозы с использованием оптимальных параметров аутофлуоресценции. Нативный препарат, объектив  $\times 63$

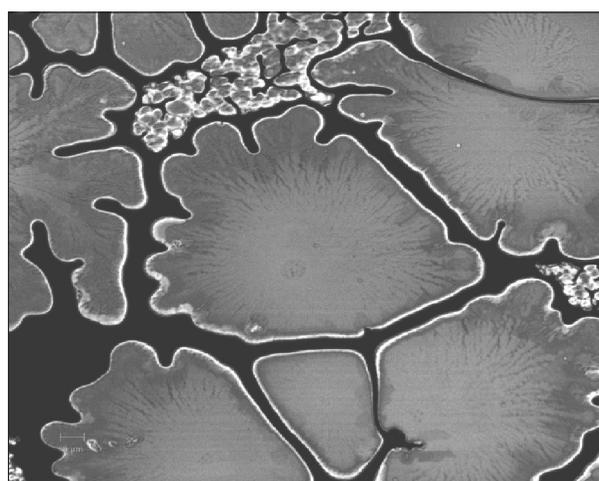


Рис. 4. Трехмерное изображение – поперечный срез, формирование макроволокон биосинтезированной целлюлозы из радиально расходящихся микроволокон с размерами от 20 до 100 мкм. Использовался детектор проходящего света совместно с дифракционным контрастом, объектив  $\times 63$

дуцируемых различными видами бактерий, включая *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* и *Sarcina* [3]. Макроскопические сети БЦ представлены пленкой, которая приобретает имплантируемую форму в месте выращивания биомассы. Размеры микроволокон, формирующие единую трехмерную сеть, составляют около 100 нм в диаметре и длиной около 100 мкм [4, 5, 10].

Наше исследование показывает, что диаметры волокон БЦ распределяются в более широком диапазоне – от 25 до 220 нм. Также известно, что сами микроволокна формируются целлюлозными микрофибриллами с диаметром от 2 до 4 нм. Но в литературе отсутствуют данные, раскрывающие

особенности формирования макроволоконистой структуры БЦ, ясно различимой при изучении поперечных срезов (см. рис. 4) [7]. Известно, что структура целлюлозы растительного происхождения представлена макроволоконистыми структурами, которые формируются группами параллельно ориентированных микроволокон с размерами около 100 мкм в диаметре, выявляемыми на поперечных срезах при изучении с помощью атомно-силовой микроскопии [2]. В отличие от макроволоконистых структур целлюлозы растительного происхождения макроволоконистые структуры БЦ представлены радиально ориентированными микроволоконками.

#### ВЫВОДЫ

1. При возбуждении ультрафиолетового лазера на 405 нм наблюдается аутофлуоресценция целлюлозы бактериального происхождения в полосе от 423 до 482 нм с максимальным пиком интенсивности на 443 нм.

2. Волокна нативных препаратов, формирующих структурную основу биосинтезированной целлюлозы, имеют диаметр от 25 до 220 нм и длину до 100 мкм.

3. На поперечных срезах целлюлозы бактериального происхождения определяются макроволоконистые структуры диаметром около 100 мкм, сформированные радиально ориентированными микроволоконками.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Е.Д., Свистов Д.В. Сравнительный анализ способов пластики твердой мозговой оболочки при открытых операциях на головном мозге

для профилактики послеоперационной ликвореи // Казанский мед. журн. 2014. 95. (1). 45–49.

2. Ding S.-Y., Zhao S., Zeng Y. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls // Cellulose. 2014. 21. (2). 863–871.

3. El-Saied H., Basta A.H., Gobran R.H. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application) // Polym. Plast. Technol. Eng. 2004. 43. (3). 797–820.

4. Hirai A., Tsuji M., Horii F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacterxylinum* // Cellulose. 2002. 9. 105–113.

5. Klemm D., Schumann D., Udhardt U., Marsch S. Bacterial synthesized cellulose: artificial blood vessels for microsurgery // Progr. Polym. Sci. 2001. 26. 1561–1603.

6. Malliti M., Page P., Gury C. et al. Comparison of deep wound infection rates using a synthetic dural substitute (neuron-patch) or pericranium graft for dural closure: a clinical review of 1 year // Neurosurgery. 2004. 54. (3). 599–604.

7. Nakagaito A.N., Iwamoto S., Yano H. Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites // Appl. Phys. A. Mater. Sci. Process. 2005. 80. (1). 93–97.

8. Nair M., Debolt S. Analysing cellulose biosynthesis with confocal microscopy // Methods Mol. Biol. 2011. 715. 141–152.

9. Rosen C.L., Steinberg G.K., DeMonte F. et al. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects // Neurosurgery. 2011. 69. (5). 1093–1103.

10. Torres F.G., Troncoso O.P., Lopez D. et al. Reversible stress softening and stress recovery of cellulose networks // Soft Matter. 2009. 5. 4185–4190.

## **STRUCTURAL ANALYSIS OF BIOSYNTHESIZED CELLULOSE BASED ON THE RESULTS OF CONFOCAL MICROSCOPY**

**Peter Mikhailovich LARIONOV<sup>1</sup>, Maxim Leonidovich FILIPPENKO<sup>2</sup>,  
Vyacheslav Vladimirovich STUPAK<sup>1</sup>, Alexey Valerievich KHARCHENKO<sup>1</sup>,  
Vasily Nikolaevich AFONYUSHKIN<sup>2</sup>, Valeriy Pavlovich TERESHCHENKO<sup>1</sup>,  
Andrey Alexandrovich BARINOV<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n. a. Ya. L. Tsivyan  
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

<sup>2</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine  
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 8*

<sup>3</sup> *ORTEK Ltd.  
630058, Novosibirsk, Ingenernaya str., 28*

---

**Purpose.** To study structural features of biosynthesized cellulose based on the results of the confocal microscopy. **Material and design.** Biosynthesized cellulose, purified from bacterial products, synthesized *Gluconacetobacter xylinus* S3, obtained as films with thickness of 1 to 2 mm was analyzed. Its native frozen sections were investigated using direct and inverted confocal microscopes LSM 710, LSM 780 NLO, produced by Carl Zeiss. **Results and discussion.** Fibers with diameter of 25–220 nm and length of 100 microns are structural base of synthesized cellulose. Macro-fibrous structures with diameter about 100 microns, formed by radially oriented microfibers are to be seen on cross sections.

---

**Key words:** bacterial cellulose, confocal microscopy, structural analysis.

*Larionov P.M. – doctor of medical sciences, professor, head of group of morphology and molecular genetic studies,  
e-mail: ptrl@mail.ru*

*Filippenko M.L. – candidate of biological sciences, head of laboratory of pharmacogenomics,  
e-mail: mlfilipenko@gmail.com*

*Stupak V.V. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher of clinic of neurosurgery,  
e-mail: VStupak@niito.ru*

*Kharchenko A.V. – neurosurgeon of clinic of neurosurgery, e-mail: alexdok2000@rambler.ru*

*Afonyushkin V.N. – candidate of agricultural sciences, leading engineer of laboratory of pharmacogenomics*

*Tereshchenko V.P. – medical resident, e-mail: tervp@ngs.ru*

*Barinov A.A. – leading specialist in confocal microscopy, e-mail: Barinov@optecgroup.com*

## ОТСУТСТВИЕ КОНТЕКСТ-ЗАВИСИМОСТИ ЛАТЕНТНОГО ТОРМОЖЕНИЯ, ФОРМИРУЕМОГО В ЗАДАЧЕ ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ У МОЛОДЫХ КРЫС ЛИНИИ SHR

Лилия Владимировна ЛОСКУТОВА<sup>1</sup>, Надежда Викторовна КОСТЮНИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ физиологии и фундаментальной медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

<sup>2</sup> Медсанчасть № 168  
630117, г. Новосибирск, ул. Арбузова, 6

У молодых крыс линии SHR (модель синдрома дефицита внимания) исследовалась контекст-зависимость латентного торможения при использовании однократного обучения пассивному избеганию. Крысы SHR и контрольные Вистар получали 20 преэкспозиций обстановочного условного стимула перед его обусловливанием. Стадии преэкспозиции условного стимула и тестирования эффекта латентного торможения проводились в одинаковых условиях (контекст А), а стадия обусловливания – в других (контекст Б). Смена контекста во время обусловливания вызывала нарушение латентного торможения у крыс Вистар, но не влияла на его развитие у крыс SHR, что указывает на отсутствие чувствительности к изменению контекста, контролируемого гиппокампом. Полученный результат предполагает, что микроанатомическим изменениям, обнаруживаемым в гиппокампе крыс SHR в возрасте 4–6 месяцев, может предшествовать ранняя нейромедиаторная дезинтеграция, механизм которой пока не установлен.

**Ключевые слова:** латентное торможение, контекст, пассивное избегание, крысы SHR.

Способность мозга к контекстуализации (contexting – восполнению недостающей информации на основе сигналов, подаваемых нервной системой посредством извлечения дополнительных данных из контекста ситуации) обеспечивает широкую когнитивную и поведенческую пластичность [3]. Изучение обусловливания страха и его угашения у грызунов и у людей предполагает, что нейронные цепи, включающие гиппокамп, миндалевидный комплекс и префронтальную кору, вовлечены в процессы обучения и памяти, которые обеспечивают контекст-зависимое поведение [17]. Дисфункция в этой системе может сопровождаться некоторыми формами психопатологий, такими как шизофрения и синдром дефицита внимания и гиперактивности (attention deficit hyperactivity disorder – ADHD). Лучшей моделью ADHD остаются крысы линии SHR с очевидной валидностью поведенческих, биохимических характеристик, а также с повышенной чувствительностью к психостимуляторам [7, 23, 25]. Трудности приобретения условных рефлексов этими животными, первопричиной которых может быть дефицит в системе торможения, многократно демонстрировались в разных

поведенческих задачах [1, 6, 11, 13, 21]. Однако определение типа торможения (моторное или когнитивное), дефект которого препятствует избирательности внимания при обучении крыс SHR, все еще остается предметом дискуссий. В частности, исследователям рекомендуется продолжить изучение сложного взаимодействия между процессами торможения и внимания, так как данное направление представляется особенно перспективным для понимания патологий, лежащих в основе ADHD у человека [3].

При оценке тормозного аспекта селективного внимания наиболее адекватным тестом является феномен латентного торможения (ЛТ), представляющий собой, по сути, пример Павловского внутреннего торможения, а по факту – задержку приобретения условного рефлекса в результате неподкрепляемых предъявлений условного стимула, предшествующих обучению [16]. Недавно у крыс SHR выявлено нарушение ЛТ, формируемого в разных поведенческих задачах: неизбегаемой ситуации эмоциональной реакции страха [5] и реакции активного избегания [2]. В то же время возможность выработки у этих животных ЛТ была показана при однократном обучении пас-

Лоскутова Л.В. – д.б.н., главный научный сотрудник, e-mail: loskutova@physiol.ru

Костюнина Н.В. – к.м.н., зав. терапевтическим отделением, e-mail: nadejda.nsk@yandex

сивному избеганию, где условным стимулом является контекст-камера и ее окружение [1]. Установлено, что ЛТ является контекст-зависимым физиологическим процессом – смена контекста во время выработки ЛТ восстанавливает ориентировочную реакцию и нарушает его экспрессию у здоровых субъектов [9, 10, 14, 17, 22, 26]. Однако этого не происходит при каких-либо дефицитах внимания, особенно связанных с нейродегенеративными изменениями в гиппокампе [12]. У крыс SHR дегенеративные изменения в отдельных регионах гиппокампа развиваются уже к возрасту 6 месяцев [24], что может быть следствием ранних изменений нейрофизиологических и нейрохимических процессов, например, недавно обнаруженной функциональной нестабильности глутаматергической синаптической передачи в поле СА3–СА1 [15], обеспечивающей долговременную потенциацию и обучение. Учитывая все вышесказанное и установленную нами ранее возможность регистрации ЛТ в поведенческой задаче пассивного избегания, целью настоящего исследования явился анализ влияния смены контекста на формирование латентного торможения у молодых крыс линии SHR.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на крысах-самцах линий SHR и Вистар в возрасте 48–55 дней к началу эксперимента (лаборатория разведения животных НИИ цитологии и генетики СО РАН). После доставки крысы содержались в аналогичных условиях (22–23 °С, 12-часовой цикл освещения, свободный доступ к воде и корму) по две особи в пластиковой клетке. Использование животных в эксперименте соответствовало «Правилам проведения работ на животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755) и одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии и фундаментальной медицины.

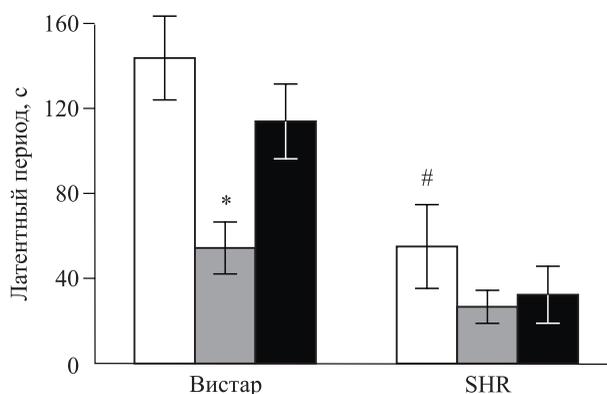
Выработку условной реакции пассивного избегания и формирование ЛТ проводили в двух ситуациях – новизны условного обстановочного стимула и после привыкания к нему в результате многократных помещений в экспериментальную установку без подкрепления в течение 5 последовательных дней (стадия предэкспозиции, ПЭ). На 6-е сутки (стадия обусловливания) переход крысы в темный отсек наказывали электрокожным раздражением (0,75 мА, 2 с) и немедленно переносили в домашнюю клетку. Через 24 ч тестировали условную реакцию, регистрируя латентный период (ЛП) перехода в опасный отсек камеры. Время наблюдения за поведением животных – 180 с при каждой высадке. До начала исследования крыс

обеих линий делили на группы с ПЭ ( $n = 15–19$ ) и без нее ( $n = 10–14$ ). Каждая группа с ПЭ состояла из двух подгрупп: у животных первых подгрупп формировали ЛТ в неизменных экспериментальных условиях (камера А), для крыс вторых подгрупп стадия обусловливания проводилась в аналогичной камере Б и в другой комнате, с последующим тестированием ЛТ в камере А и в прежней комнате, где ранее выполнялась процедура ПЭ условного в будущем стимула.

Полученные результаты анализировали с помощью трехфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Независимыми факторами являлись: линия крыс, ПЭ (0, 20) и контекст (А, Б). Парные групповые сравнения средних величин проводили с помощью апостериорного анализа с применением теста Ньюмана – Кейлса. Результаты представлены в виде средних арифметических значений со средней стандартной ошибкой ( $M \pm SEM$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным, представленным на рисунке, видно, что генотип существенным образом влиял на способность как к обучению на новый стимул, так и к переключению внимания относительно условий, в которых формировалось ЛТ. При тестировании условной реакции, вырабатываемой без стадии ПЭ, получены достоверные межлинейные различия ЛП перехода ( $F_{1,22} = 14,32$ ,  $p = 0,001$ ). Это подтверждает наши прежние данные о снижении способности крыс SHR к приобретению условной реакции пассивного избегания по сравнению с крысами нормотензивных



**Рис.** Величина ЛП перехода в опасный отсек установки при тестировании ЛТ, формируемого у крыс линий Вистар и SHR в контексте А (серые столбики) и в контексте А + Б (темные столбики). Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин ЛП: \* – крыс группы Вистар, обученной в контексте А + Б, # – крыс группы Вистар без ПЭ (белые столбики)

линий Вистар и WAG [1]. Что касается классической задержки обучения в результате введения стадии ПЭ условного стимула перед обучением, то у крыс Вистар регистрировались значительные внутригрупповые различия ( $F_{1,18} = 13,54$ ,  $p = 0,001$  между группами 0 ПЭ и 20 ПЭ), указывающая на развитие нормального ЛТ. В то же время у крыс SHR (20 ПЭ) при аналогичном сравнении с собственным контролем (0 ПЭ) достоверные различия отсутствовали ( $F_{1,20} = 3,28$ ,  $p = 0,061$ ), однако граничили со статистической значимостью. И это может свидетельствовать о наличии ЛТ, хотя и менее выраженного, чем у крыс Вистар. Что касается влияния смены контекста на формирование ЛТ, то у предэкспозированных крыс Вистар внутривнутрилинейные сравнения выявили достоверное увеличение ЛП перехода в опасный отсек камеры А, т.е. нарушение ЛТ по сравнению с собственной контрольной группой, обученной без смены контекста ( $F_{1,18} = 11,47$ ,  $p = 0,002$ ). В то же время аналогичные внутривнутрилинейные сравнения у крыс SHR не выявили влияния смены контекста на величину ЛП перехода ( $p > 0,5$  при сравнении с собственным контролем ЛТ), что указывает на отсутствие чувствительности ЛТ этих крыс к изменению контекста.

В настоящем исследовании впервые установлено отсутствие чувствительности ЛТ к изменению контекста у крыс SHR в период созревания мозговых систем. Полученный нами факт позволяет предполагать присутствие функциональной патологии в вентральном гиппокампе, который вовлечен в контекстуальную пластичность процессов обучения и памяти [12]. Как у взрослых людей с синдромом ADHD [8], так и у 6-месячных крыс SHR [24] именно в этом регионе обнаружены нейродегенеративные изменения. Предполагается, что увеличение объема гиппокампа у детей и подростков с ADHD является компенсаторной гипертрофической реакцией на имеющуюся синаптическую трансформацию [19]. Примечательно, что недавно у крыс SHR были выявлены редукция гиппокампальных синапсов CA1-CA3 и снижение долговременной потенциации [15], важной в обеспечении консолидации памяти [27]. Основу нейронного ансамбля данного региона составляют глутаматергические пирамидные клетки и ГАМКергические вставочные нейроны, взаимодействие которых обеспечивает формирование ЛТ в норме. Так, у взрослых животных оно нарушается при фармакологической активации первых или блокаде вторых локальной инъекцией избирательных агонистов и антагонистов соответственно [18, 20]. Нельзя исключать модулирующее влияние и других нейромедиаторов, например, дофамина, который может подав-

лять глутаматергическую нейротрансмиссию в гиппокампе через активацию пресинаптических D1-рецепторов [4]. Какая из систем при этом нарушается и будет ли она гипер- или гипоактивна, до сих пор неизвестно.

Настоящая работа выполнялась в рамках продолжения поиска доказательств взаимосвязи между процессами торможения и внимания, так как это направление представляется особенно перспективным для понимания различных патологий, лежащих в основе подтипов ADHD. Кроме того, предварительные результаты указывают, насколько важна для детей с синдромом ADHD контекстуальная информация из окружающей среды и как она влияет на уровень внимания [3]. Очевидно, что установление дефектов в работе систем мозга, обеспечивающих функции внимания, возможно только при использовании соответствующих моделей. В результате выполненной работы теперь у нас есть новое знание об отсутствии значимости контекста в обработке как релевантной (обучение без ПЭ), так и нерелевантной информации (ПЭ–ЛТ). Это предполагает логический переход к изучению нейрохимических и молекулярных изменений в вентральном гиппокампе крыс SHR, причастном к обеспечению контекстуальной пластичности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лоскутова Л.В., Дубровина Н.И., Маркель А.Л. Сравнительный анализ условной реакции пассивного избегания у крыс с разными формами наследственной артериальной гипертензии // Рос. физиол. журн. 2006. 92. (4). 440–448.
2. Костюнина Н.В., Лоскутова Л.В. Особенности формирования латентного торможения у крыс SHR в условно-рефлекторных задачах разной сложности // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2012. 153. (1). 4–8.
3. Adams Z.W., Derefinko K.J., Milich R., Fillmore M.T. Inhibitory Functioning across ADHD subtypes: recent findings, clinical implications and future directions // Dev. Disabil. Res. Rev. 2008. 14. (4). 268–275.
4. Behr J., Gloveli T., Schmitz D., Heinemann U. Dopamine depresses excitatory synaptic transmission onto rat subicular neurons via presynaptic D1-like dopamine receptors // J. Neurophysiol. 2000. 84. 112–119.
5. Calzavara M.B., Medrano W.A., Levin R. et al. Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: a potential animal model of emotional context processing in schizophrenia // Schiz. Bull. 2009. 35. (4). 748–759.

6. Clements K.M., Wainwright P.E. Spontaneously hypertensive, Wistar Kyoto and Sprague-Dawley rats differ in performance on a win-stay task and a conditioned cue preference task in the water radial arm maze. // *Behav. Brain Res.* 2007. 183. (2). 169–177.
7. Dela Peña I.C., Kim H.J., Sohn A. et al. Prefrontal cortical and striatal transcriptional responses to the reinforcing effect of repeated methylphenidate treatment in the spontaneously hypertensive rat, animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) // *Behav. Brain Funct.* 2014. 6. 10–17.
8. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus // *Nat. Med.* 1998. 4. 1313–1317.
9. Gershman S.J., Blei D.M., Niv Y. Context, learning, and extinction // *Psychol. Rev.* 2010. 117. (1). 197–209.
10. Gray N.S., Williams J., Fernandez M. et al. Context dependent latent inhibition in adult humans // *Q. J. Exp. Psychol. B.* 2001. 54. (3). 233–245.
11. Green J.T., Chess A.C., Conquest C.J., Yegla B.A. Conditioned inhibition in a rodent model of attention-deficit/hyperactivity disorder // *Behav. Neurosci.* 2011. 125. (6). 979–987.
12. Hemsley D.R. The development of a cognitive model of schizophrenia: placing it in context // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005. 29. 977–988.
13. Hernandez C.M., Hoifodt H., Terry A.V. Spontaneously hypertensive rats: further evaluation of age-related memory performance and cholinergic marker expression // *Psychiatry Neurosci.* 2003. 28. (3). 197–209.
14. Honey R.C., Good M. Selective hippocampal lesions abolish the contextual specificity of latent inhibition and conditioning // *Behav. Neurosci.* 1993. 107. (1). 23–33.
15. Jensen V., Rinholm J.E., Johansen T.J. et al. N-methyl-d-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder // *Neuroscience.* 2009. 158. 353–364.
16. Lubow R.E. Latent inhibition and conditioned attention theory. N.Y.: Cambridge University Press, 1989. 324 p.
17. Maren S., Phan K.L., Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. 14. (6). 417–428.
18. Mitchell S.N., Yee B.K., Feldon J. et al. Activation of the retrohippocampal region in the rat causes dopamine release in the nucleus accumbens: disruption by fornix section // *Eur. Pharmacol.* 2000. 407. (1-2). 131–138.
19. Plessen K.J., Bansal R., Zhu H. et al. Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit hyperactivity disorder // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2006. 63. (7). 795–807.
20. Pouzet B., Zhang W.N., Weiner I. et al. Latent inhibition is spared by N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced ventral hippocampal lesions, but is attenuated following local activation of the ventral hippocampus by intracerebral NMDA infusion // *Neuroscience.* 2004. 124. 183–194.
21. Prediger R.D., Pamplona F.A., Fernandes D., Takahashi R.N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR) // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2005. 8. 1–12.
22. Quintero E., Díaz E., Vargas J.P. et al. Ventral subiculum involvement in latent inhibition context specificity // *Physiol. Behav.* 2011. 102. (3-4). 414–420.
23. Sagvolden T., Russell V.A., Aase H. et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder // *Biol. Psychiatry.* 2005. 57. 1239–1247.
24. Sabbatini M., Strocchi P., Vitaioli L., Amenta F. The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: a quantitative microanatomical study // *Neuroscience.* 2000. 100. 251–258.
25. Thanos P.K., Ivanov I., Robinson J.K. et al. Dissociation between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats in baseline performance and methylphenidate response on measures of attention, impulsivity and hyperactivity in a visual stimulus position discrimination task // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010. 94. (3). 374–379.
26. Westbrook R.F., Jones M.L., Bailey G.K., Harris J.A. Contextual control over conditioned responding in a latent inhibition paradigm // *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 2000. 26. 157–173.
27. Whitlock J.R., Heynen A.J., Shuler M.G., Bear M.F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus // *Science.* 2006. 313. (5790). 1093–1097.

## **LACK OF CONTEXT-DEPENDENT OF LATENT INHIBITION ASSESSED IN PASSIVE AVOIDANCE TASK IN ADOLESCENT SHR RATS**

**Liliya Vladimirovna LOSKUTOVA<sup>1</sup>, Nadezhda Viktorovna KOSTYUNINA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4*

<sup>2</sup> *Health Care Division № 168  
630117, Novosibirsk, Arbuzov str., 6*

---

Context-dependence of latent inhibition was investigated in young SHR rats (ADHD model) with passive avoidance task. SHR and control Wistar rats received 20 pre-expositions of conditioned stimulus before its conditioning. Pre-exposure and testing of latent inhibition were carried out in identical conditions (context A), and conditioning session was done in context B. Change of a context during the conditioning stage disrupted latent inhibition in control rats, but didn't affected on its expression in SHR rats that indicates the lack of sensitivity of latent inhibition to change of a context, controlled by the hippocampus. The obtained result suggests that degenerative changes of hippocampus in SHR rats of 4–6 month old are the consequence of possible early neuro-mediatory disintegration, although exact mechanisms are unknown.

---

**Key words:** latent inhibition, context, passive avoidance, SHR rats.

*Loskutova L.V. – doctor of biological sciences, chief researcher, e-mail: loskutova@physiol.ru*

*Kostyunina N.V. – candidate of medical sciences, manager of therapeutic branch, e-mail: nadejda.nsk@yandex*

## ТАРГЕТНАЯ ФАРМАКОДИНАМИКА СУБТИЛИЗИНОВ

Павел Геннадиевич МАДОНОВ<sup>1,2</sup>, Светлана Владимировна МИШЕНИНА<sup>1</sup>,  
Дмитрий Николаевич КИНСИТ<sup>1,2</sup>, Наталия Владимировна КИХТЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

<sup>2</sup> ООО «Саентифик Фьючер Менеджмент»  
630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 10

Субтилизины – протеолитические ферменты, продуцируемые бактериями рода *Bacillus subtilis*, имеют перспективное значение в фармакотерапии тромбозов. Это обусловлено их прямым тромболитическим действием и отсутствием побочных эффектов, вызываемых широко применяемыми последние 20 лет активаторами плазминогена. Возможность клинического использования субтилизинов в последние годы изучается довольно активно, и исследования показывают их эффективность не только для лечения тромбозов, но и для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и деменции. Однако применение субтилизинов в медицине ограничено их низкой биодоступностью. Новый отечественный препарат Тромбовазим® на основе пегилированного субтилизина, созданный с применением технологии радиационного синтеза, обладает таргетным тромболитическим, кардиопротективным и противовоспалительным действием и на сегодняшний день является единственным зарегистрированным пероральным тромболитиком. Иммуобилизованные субтилизины имеют масштабные перспективы для внедрения в клиническую практику.

**Ключевые слова:** субтилизины, наттокиназа, Тромбовазим®, тромболитическая терапия, антикоагуляционная активность, тромбоз венозный синусов, инфаркт миокарда.

Применение субтилизинов в медицине со времени их углубленного изучения выглядело очень перспективно [15]. В обзоре Н.П. Балабан и М.Р. Шариповой [3] рассматриваются ведущие направления практического использования протеолитических ферментов для лечения ран, ожоговых инфекций, артрита, при заболевании желудочно-кишечного тракта, а также при лечении тромбоземболических и послеоперационных осложнений в качестве противовоспалительных агентов. Дефицит сырья животного происхождения стимулировал в конце XX в. развитие биотехнологического производства медицинских препаратов из микробного сырья. Так, разработанный в 1994 г. препарат протеиназы из *Bacillus subtilis* 316М с эластазолитической активностью успешно заменил препарат животного происхождения для лечения ожогов, гнойных ран, фурункулов, карбункулов и глубоких абсцессов. По мере нарастания объема научно-исследовательской информации о субтилизинах

расширялись и перспективы их применения в клинической практике [1, 10, 22, 24, 31, 32, 35, 37, 38, 41–43, 48–51]. Особенно привлекательным обстоятельством для врачей-клиницистов выглядела перспектива применения субтилизинов в качестве прямого тромболитика. Последние 20 лет тромболитическая терапия проводилась исключительно посредством применения активаторов плазминогена – проурокиназы, альтеплазы, стрептокиназы и др. Активаторы плазминогена по своей химической сущности являются протеолитическими ферментами из группы сериновых протеиназ. Их фармакологическое действие заключается в сайт-специфичном гидролизе плазминогена и превращении его в плазмин. Плазмин также представляет собой сериновую протеиназу, он сайт-специфично гидролизует молекулу фибрина, но при этом вызывает гидролиз и фибриногена, тем самым существенно снижая коагуляционный потенциал плазмы и, соответственно, повышая риск кровотечений во время проведе-

*Мадонов П.Г.* – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: madonov@scrb.ru

*Мишенина С.В.* – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

*Кинсит Д.Н.* – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

*Кихтенко Н.В.* – заместитель начальника научно-исследовательского отдела

ния тромболитической терапии. Таким образом, в каждом случае применения активаторов плазминогена присутствует высокий риск геморрагических осложнений. Именно поэтому разработки прямого фибринолитика всегда привлекали внимание фармакологов и врачей-клиницистов. По мнению E. Kotb [32], фибринолитические ферменты привлекают гораздо больше внимания, чем типичные тромболитические препараты – активаторы плазминогена, из-за высоких цен и побочных эффектов последних.

В работе S. Majumdar [36] показано, что субтилизин бревитромболаза (brevithrombolase) не ингибирует фактор Ха, и механизм его антикоагуляционного действия связан с ферментным расщеплением тромбина. В совокупности свойства бревитромболазы свидетельствуют о терапевтическом потенциале фермента в разработке кардиоваскулярного препарата на ее основе. Тромболитическая активность бревитромболазы превосходит таковую плазмина и стрептокиназы, по антикоагуляционной активности фермент сравним с гепарином / антитромбином III и варфарином. Бревитромболаза *in vitro* не показала цитотоксичность на клетках HeLa и HT29 или гемолитической активности. При тестировании *in vivo* на крысах-альбиносах линии Вистар субтилизин в дозе 10 мг/кг не был летален или токсичен.

Фибринолитические свойства отмечены и у субтилизинов, используемых в приготовлении пищи. Выяснилось, что они обладают хорошим потенциалом для разработки в качестве пищевых добавок и лекарственных препаратов для профилактики или лечения тромбоза и других связанных с ним заболеваний. Особое внимание было привлечено к наттокиназе – мощному фибринолитическому ферменту, экстрагированному из натто (традиционной японской еды, производимой из сброженных соевых бобов). В настоящее время наттокиназа производится как пищевая добавка для человека. В исследованиях *in vitro* субтилизин не только показал сильное фибринолитическое действие, но и способствовал значительно снижению степени агрегации эритроцитов и понижению вязкости крови. В результате применения наттокиназы существенно уменьшается склонность к образованию тромбов. В настоящий момент считается, что наттокиназа имеет большой потенциал в качестве терапевтического средства для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [26, 46, 41], однако для ее терапевтического использования возникли объективные сложности: так, исследование дуоденальной абсорбции *in vivo* у крыс показало, что происходит лишь частичное проникновение нативного фермента.

Действие наттокиназы, расщепляющей фибрин в плазме, было пролонгированным и обнаруживалось в образцах плазмы, взятых через 3–5 ч после приема фермента [28]. Показано, что свойства субтилизина очень схожи со свойствами плазмина. Наттокиназа особенно эффективна, поскольку повышает естественную способность организма справляться с тромбами в крови несколькими различными способами, не только непосредственно растворяя фибрин, но и, по-видимому, повышая естественную выработку организмом как плазмина, так и других ферментов, участвующих в лизисе тромба, например урокиназы. В сравнительных исследованиях *in vivo* на модели индуцированного тромба в сонной артерии крыс показано, что тромболитическое действие наттокиназы выше, чем плазмина или эластазы [27].

При экспериментальном повреждении бедренной артерии у крыс установлено, что добавка к рациону экстракта наттокиназы сдерживает утолщение интимы, возникающее в результате эндотелиального повреждения бедренной артерии крыс. Эти эффекты, хотя бы частично, связаны с воздействием наттокиназы, которая вызвала усиление тромболитического действия около стенки сосуда и инактивировала ингибитор активатора плазминогена 1 типа, что, в свою очередь, повышает фибринолитическую активность [44, 45]. Исследование, проведенное с применением натто на 12 здоровых взрослых добровольцах (6 мужчин и 6 женщин в возрасте от 21 до 55 лет), показало выраженное фибринолитическое действие наттокиназы при пероральном применении. Добровольцы принимали по 200 г наттокиназы в виде пищи до завтрака, затем у них измерялось фибринолитическая активность крови через разные промежутки времени. В результате обнаружено, что наттокиназа повышает способность крови лизировать тромбы. В качестве контроля тем же добровольцам давали позже идентичное количество отваренных соевых бобов, после приема которых у обследованных фибринолитическая активность крови не изменялась [46].

Любопытное исследование проведено с целью измерения эффективности наттокиназы в профилактике тромбоза глубоких и поверхностных вен при продолжительных перелетах, длящихся 7–8 ч, у пациентов группы риска [23]. Из 300 человек было отобрано 204, которых разделили на две группы с использованием процедуры рандомизации. В группе, получавшей наттокиназу (таблетки Flite Tabs, содержащие пинокиназу – комплексный препарат, состоящий из наттокиназы и экстракта коры сосны), не возникло тромбозов. В группе из 94 человек, получавшей плацебо, зарегистрировано пять случаев тромбоза глубо-

ких вен и два случая тромбоза поверхностных вен (7,6 %). После полета степень отечности увеличилась на 12 % в группе плацебо и уменьшилась на 15 % в группе, получавшей наттокиназу. Авторы пришли к выводу, что наттокиназа эффективно снижает уровень тромботических заболеваний, а также эффективна для контроля отеков в группе риска при длительных перелетах.

В статье R.-L. Hsu et al. [30] приведено обоснование использования субтилизина наттокиназы для лечения болезни Альцгеймера. Известно, что в образовании амилоидных фибрилл, являющихся патогенным фактором болезни Альцгеймера, участвуют не менее 20 белков. Основной целью в лечении этого заболевания является улучшение амилоидного клиренса. Понижение количества амилоидных фибрилл может способствовать профилактике, или, по меньшей мере, облегчению болезни Альцгеймера. В работе [30] продемонстрировано, что наттокиназа расщепляет амилоидные фибриллы, при этом плазмин и трипсин не обладают такими свойствами.

Очевидно, что наттокиназа оказывает выраженное положительное воздействие на группу риска пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, способна сократить риск возникновения тромбоза глубоких вен, инфаркта миокарда, тромбоза легочной артерии и инсульта. Кроме того, ее свойство препятствовать утолщению комплекса интима-медиа артериальных стенок может приводить к нормализации артериального давления, а также снизить другие факторы риска, такие как атеросклероз [40]. Продемонстрированное снижение агрегации эритроцитов и общей вязкости крови приводит к выводу, что наттокиназа способствует созданию условий, при которых менее вероятно образование тромбов в сосудах [29, 31, 34].

В декабре 2015 г. опубликованы материалы по проведению нескольких GCP-комплаентных исследований ферментного продукта на основе наттокиназы NSK-SD (Japan Bio Science Laboratory Co., Ltd.) [33]. *In vitro* доказано, что наттокиназа не мутагенна, а при исследовании субхронической токсичности на крысах Sprague-Dawley побочные эффекты не наблюдались на 28-й и 90-й день в дозе 167 и 1000 мг/кг в день соответственно. У мышей, которым вводились  $7,55 \times 10^8$  КОЕ фермент-продуцирующего бактериального штамма, не проявлялось никаких признаков токсичности или остаточных тканевых концентраций живых бактерий. Дополнительное потребление 10 мг/кг в день наттокиназы в течение четырех недель хорошо переносилось здоровыми волонтерами. Эти данные позволяют предположить, что употребление наттокиназы имеет низкую токсикологическую опасность.

Наивысшая тестируемая доза составила 1000 мг/кг в день в течение 90 дней при пероральном введении самкам и самцам крыс Sprague-Dawley.

Первое зарегистрированное клиническое исследование наттокиназы завершено в 2007 г. – Efficacy and Safety of Natto Extract Clinical Trials, идентификационный номер: NCT00447434 [25]. Целью данного исследования было сравнение действия экстракта наттокиназы на фибринолитические факторы и ферменты крови при приеме здоровыми добровольцами, больными на диализе и пациентами с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Для каждой группы отобраны по пятнадцать добровольцев в возрасте от 20 до 70 лет, которые принимали капсулы с экстрактом натто перорально в течение двух месяцев. Через 3, 7 и 28 дней после начала приема и через две недели после окончания приема для определения эффективности оценивались фибринолитические факторы, жизненно важные симптомы и липиды. Однако по неизвестным причинам результаты этого исследования не опубликованы.

В настоящий момент проводится еще одно клиническое исследование по определению эффективности и безопасности наттокиназы – Nattokinase Atherothrombotic Prevention Study (NAPS), идентификатор: NCT02080520, верифицировано в мае 2015 г. Университетом Южной Калифорнии [39]. Потенциальная способность субтилизина снижать свертываемость крови посредством положительного антитромботического и фибринолитического действия представляет уникальную возможность для безопасного исследования такого воздействия на сердечно-сосудистые заболевания и когнитивные способности. К сожалению, подобные исследования антитромботического и фибринолитического путей профилактики ограничены из-за отсутствия безопасных соединений и побочных реакций, вызываемых используемыми в настоящее время препаратами, такими как варфарин. Применяя наттокиназу в целях первичной профилактики, исследователи проводят рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование для анализа возможности замедления развития атеросклероза и когнитивных нарушений посредством уменьшения атеротромботического риска.

Цель исследования J.Y. Kim et al. [31] состояла в изучении влияния добавки наттокиназы на артериальное давление у лиц с пре-гипертонией или гипертонией 1-й стадии. В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании в течение 8 недель 86 человек в возрасте с 20 до 80 лет с начальным нелеченным

систолическим артериальным давлением от 130 до 159 мм рт. ст. получали капсулы с плацебо или наттокиназой (2000 фибринолитических единиц на капсулу). 73 участника прошли исследование полностью. По сравнению с контрольной группой, после 8-недельного курса приема наттокиназы «чистые» изменения систолического, диастолического давления и активности ренина составили соответственно  $-5,55$  мм рт. ст.,  $-2,84$  мм рт. ст. и  $-1,17$  нг/(мл $\times$ ч). Эти наблюдения подтверждают, что прием наттокиназы может играть важную роль в профилактике и лечении гипертонии.

Стартовая идея разработки тромболитического лекарственного препарата на основе субтилизинов заключалась в создании тромболитика, который бы растворял тромбы самостоятельно, без вовлечения в фибринолиз плазмينا. Молекула должна представлять собой фибринолитический и тромболитический фермент, способный быстро и интенсивно растворить фибрин тромба, а также гидролизовать белковый и клеточный детрит тромба. Главная проблема создания такого препарата заключается в том, что при попадании фермента в кровеносную систему он неизбежно вызовет тяжелую аллергическую реакцию, вплоть до анафилактического шока. Таким образом, необходимо было так изменить химическую конфигурацию молекулы, чтобы ферментативная активность сохранилась, а аллергогенное и иммунотоксическое действие утратилось. Интерес к созданию иммобилизованных форм тромболитических препаратов подтверждается научными публикациями. Но зачастую цель разработки заключается в решении узкой фармакологической задачи. Так, например, в исследовании В. Vaidya et al. [47] предпринята попытка модифицировать стрептокиназу посредством ее включения в липосому. Стрептокиназа является одним из наиболее часто используемых тромболитических средств, но короткий период полураспада фермента требует введения более высоких доз, что приводит к различным побочным эффектам, включая системное кровоизлияние из-за активации системного плазмينا. Чтобы повысить селективность стрептокиназы и вместе с тем уменьшить побочные эффекты, разрабатываются разнообразные новые носители. Липосомы появились среди таких носителей как универсальный вариант. В данном исследовании *in vitro* и *in vivo* изучались разработанные высокоселективные «нацеленные» липосомы. Обнаружено, что разработанные липосомы *in vitro* выделяют стрептокиназу после связывания с активированными тромбоцитами. Прижизненные микроскопические исследования на мышинной модели тромба выявили

высокое скопление липосом в области тромба. Результаты исследования тромболитика на крысиной модели инокулированного кровяного сгустка человека показали, что «нацеленные» липосомы растворяют существенно больший объем тромба по сравнению с нелипосомальной стрептокиназой, а также уменьшают время растворения сгустка. Авторы сделали вывод, что разрабатываемые липосомы могут быть перспективными носителями для лечения тромботических заболеваний.

Оригинальный метод иммобилизации предложен в работе Н. Baharifar et al. [21]. Путем самосборки были получены наночастицы, состоящие из стрептокиназы и хитозана. Анализ лизиса сгустка эуглобулина показал, что наночастицы хитозан/стрептокиназа обладают слабым токсическим эффектом в отношении клеток фибробластов легкого плода человека Mrc-5 по сравнению с хитозаном и стрептокиназой по отдельности. При этом тромболитическая активность инкапсулированной стрептокиназы в наночастицах немного уменьшилась по сравнению с чистой стрептокиназой. Однако препарат сохраняет хороший потенциал для использования в качестве тромболитического агента *in vivo*.

В 1990-х годах в НИИ цитологии и генетики и НИИ ядерной физики СО РАН проведены экспериментальные исследования возможности электронно-лучевого пегилирования субтилизина с целью создания лекарственного препарата для введения в кровеносное русло, впервые показавшие возможность радиационной иммобилизации субтилизина на полиэтиленгликоле при использовании пучка ускоренных электронов [2, 19]. В настоящее время в литературе активно используется термин «электронно-лучевое пегилирование белковых молекул» [8, 11]. В работе П.Г. Мадонина [11] представлено, что белково-полимерные препараты, созданные по технологии электронно-лучевого синтеза, обладают специфической фармакологической активностью, свойственной нативным белкам. Изучено и показано, что одноступенчатый электронно-лучевой синтез нативного белка с полиэтиленгликолем модифицирует фармакокинетические характеристики нативного белка и обеспечивает новые, терапевтически значимые пути его введения в организм. Для фармакологического препарата на основе пегилированного посредством электронно-лучевого синтеза субтилизина молекулярной массой 30 кДа в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрирован свойственный нативному белку выраженный фибринолитический эффект. Тромболитический эффект лекарственного средства на основе пегилированного субтилизина подтвержден в клинических исследованиях при лечении венозной

недостаточности и инфаркта миокарда [12]. В настоящее время существует единственный в мире лекарственный препарат на основе иммобилизованных субтилизинов – Тромбовазим® (производитель – ЗАО «СЦФБ», Россия).

Посредством метода ВЭЖХ-масс-спектрометрии в режиме наноэлектроспрея получен белковый сиквенс субтилизина Тромбовазима®. Субтилизин Тромбовазима® имеет молекулярную массу 27,7 кДа, состоит из 275 аминокислотных остатков. При сопоставлении уникальных пептидных фрагментов с базами данных по бактериальным белкам установлена высокая степень идентичности протеиназы Тромбовазима® с субтилизином DFE, выявлено полное совпадение по трем уникальным пептидным фрагментам из 11, 11 и 18 аминокислот. Субтилизин DFE, выделенный в 2003 г. из *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4, представляет собой сериновую протеиназу с высокой фибринолитической активностью. Проведенный ингибиторный анализ показал, что активность субтилизина Тромбовазима® полностью ингибируется фенилметилсульфонилфторидом, специфическим ингибитором сериновых протеиназ, но не ЭДТА. Фермент показал высокую активность в отношении специфического субстрата субтилизинов Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Максимальная активность получена в достаточно широком диапазоне pH – от 7,5 до 10, при этом при значениях pH 6,0 и 11 сохраняется около 50 и 60 % максимальной активности соответственно. Температурный оптимум протеолитической активности при pH 8,0 наблюдался при +47 °С. Субтилизин показал высокую фибринолитическую активность как по формированию зоны лизиса в фибриновом слое (метод Аструпа – Мюллерца), так и по лизису искусственного фибринового сгустка. Продукты деградации фибрина в различных концентрациях (1,56, 3,13 и 6,25 мг/мл в пересчете на фибриноген) не ингибировали активность исследуемого фермента, оцененную по гидролизу специфического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa [1].

На этапе государственной регистрации Тромбовазим® прошел полный курс доклинических исследований. Фибринолитическое и антитромботическое действие препарата исследовано *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* выявлено прямое дозозависимое фибринолитическое действие препарата на сгусток фибрина, полученного из очищенного фибрин-мономера. Механизм действия отличен от действия плазмина, поскольку данный препарат не разрушает лизиновые связи специфического хромогенного субстрата. Препарат не вызывает активацию плазминогена, напротив, концентрация последнего в плаз-

ме крови увеличивается на 40 %. Данное лекарственное средство препятствует полимеризации фибрин-мономеров, эффект связан с действием субтилизинов, так как исчезал при инактивации фермента. Тромбовазим® на 40 % снижал АДФ-индуцированную адгезию тромбоцитов *in vitro* и увеличивал скорость лизиса эуглобулинового сгустка при внутривенном введении [11].

На крысах проведено исследование тромболитической и антитромботической активности Тромбовазима® *in vivo* при внутривенном введении. Профилактическое введение субтилизина эффективно ограничивало процесс тромбообразования в сонной артерии в первые 1,5 ч после воздействия на нее хлоридом двухвалентного железа: доля животных с полной окклюзией сонной артерии к 90-й минуте была в 4 раза меньше, чем в контрольной группе. При терапевтическом введении Тромбовазима® через 24 ч доля животных с полной окклюзией сонной артерии снижалась в 3 раза. При наличии остаточного тромба в сонной артерии масса тромба была в среднем в 3 раза меньше по сравнению с группой контроля [16]. При исследовании тромболитической активности Тромбовазима® при приеме *per os* установлено, что масса тромбов у крыс на фоне терапии препаратом была достоверно меньше (на 25 %) величины показателя в контроле, а кровоток – достоверно выше. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о выраженной тромболитической активности препарата *in vitro*, а также *in vivo* при лечебном и профилактическом применении.

Помимо таргетной тромболитической активности на этапе доклинических исследований доказан противовоспалительный эффект Тромбовазима®. Выявлена антипролиферативная активность исследуемого препарата на фоне развивающихся пролиферативных процессов у крыс с имплантированной «ватной» гранулемой. Противовоспалительное и антиэкссудативное действие наблюдалось при профилактическом и лечебном введении Тромбовазима® крысам с артритом, вызванным адьювантом Фрейнда. Противовоспалительный эффект связан с влиянием Тромбовазима® на окислительную функцию нейтрофилов крови, макрофагов легких и перитонеальной полости. Исследование кардиопротективного действия препарата на адреналиновой модели инфаркта миокарда показало, что после развития адреналинового миокардита внутривенное введение Тромбовазима® достоверно снижало количество некрозов (в 1,5 раза к концу трех суток) и дистрофических изменений в сердечной мышце (в 2,5 раза к концу седьмых суток) по сравнению с контролем.

Препарат не токсичен, относится к 4-й группе токсичности лекарственных средств. При энтеральном введении Тромбовазима® летальность не установлена. Результаты проведенных исследований хронической токсичности показали, что и внутривенное, и внутривенное введение препарата в течение 14 дней не оказывает токсического влияния на показатели периферической крови и костного мозга и не приводит к изменениям средних величин биохимических показателей сыворотки крови при сравнении с исходными данными. Отсутствовало влияние на показатели миелограммы как при внутривенном, так и при энтеральном приеме Тромбовазима®. Препарат не обладает тератогенным, мутагенным и канцерогенным эффектами, хорошо переносится животными, не вызывая аллергии, флебита и местнораздражающего действия.

Детально исследованы фармакокинетические параметры Тромбовазима®. При однократном внутривенном введении общий клиренс  $CL$  составляет 1,2 мл/мин, константа скорости элиминации  $K_{el}$  – 0,057/мин, период полувыведения  $T_{1/2}$  – 0,2 ч. Препарат выводится почками в активном виде с сохранением специфической активности, определяемой по гидролизу хромогенных белковых субстратов. Связывания с белками плазмы и форменными элементами крови не установлено. Тромбовазим® не обладает кумулятивным действием при соблюдении рекомендуемых доз и кратности введения, которые учитывают  $T_{1/2}$  и другие фармакокинетические показатели. Фармакокинетические параметры при энтеральном введении: время достижения максимальной концентрации  $T_{max}$  – 5 ч, максимальная концентрация  $C_{max}$  – 0,044 ЕД/мл, биодоступность  $F$  – 17 %,  $T_{1/2}$  – 0,43 ч, объем распределения  $V_{po}$  – 1,277 л, среднее время удержания  $MRT_{po}$  – 4,832 ч, клиренс  $CL_{po}$  – 6,792 мл/ч,  $K_{el}$  – 5,3191/ч, нулевой момент  $AUC$  – 0,132 (ЕД·ч)/мл, первый момент  $AUMC$  – 0,640 (ЕД·ч<sup>2</sup>)/мл, второй момент  $AUMMC$  – 0,778 (ЕД·ч<sup>2</sup>)/мл.

В результате проведенных клинических исследований установлено, что электронно-лучевое пегилирование субтилизина обеспечивает энтеральную биодоступность, низкую токсичность, выраженное тромболитическое, цитопротективное, противовоспалительное действие в организме человека при энтеральном и парентеральном путях его введения. Фармакологический препарат пегилированного субтилизина создан в двух лекарственных формах. Продемонстрирована его эффективность как прямого тромболитика при остром инфаркте миокарда с более благоприятным соотношением эффективность/безопасность по сравнению с активаторами плазминогена. На

основании этих исследований зарегистрированы лекарственные формы в виде лиофилизата для приготовления раствора для внутривенной инфузии и капсулированная для лечения хронической венозной недостаточности.

Регистрационные клинические исследования пероральной формы Тромбовазима® проводились у больных с хронической венозной недостаточностью. В исследовании приняли участие 119 пациентов мужского и женского пола в возрасте от 40 до 75 лет, прием препарата осуществлялся в течение 20 дней. В группе больных, в которой использовался для лечения Тромбовазим®, отмечено уменьшение площади поражения и заживление трофических язв, уменьшение отека нижних конечностей и болевого синдрома, увеличение скорости и объема венозного и лимфатического оттока, снижение динамического сопротивления лимфотоксическому оттоку. Позитивные изменения, зарегистрированные посредством лазерной флоуметрии, свидетельствовали об улучшении микроциркуляции в пораженных конечностях [9].

У пациенток со сформировавшейся хронической венозной недостаточностью на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных оральных контрацептивов проведено апробационное клиническое исследование, в котором приняло участие 13 женщин, суточная доза препарата составила 1600 ЕД, длительность приема – 14 дней. После проведения курса терапии с применением Тромбовазима® у всех пациенток, включенных в исследование, отмечены положительная динамика по модифицированной шкале СЕАР и повышение толерантности к физическим нагрузкам. После проведения терапии препаратом отмечались нормализация показателей свертывающей системы крови, статистически значимое уменьшение уровня маркеров тромбоза [13].

В клиническом исследовании у пациентов с тромбозом венозной системы головного мозга приняло участие 13 лиц, страдающих цереброваскулярными расстройствами и выявленным при компьютерной томографии тромбозом венозной системы головного мозга. По данным томографического исследования наблюдались сочетанные тромбозы. Локализация тромбов: поперечный, сигмовидный, венозный, прямой синусы. По характеру расположения тромба: пристеночное, внутривенное и субтотальное. После проведения курса комплексной терапии с применением препарата Тромбовазим® в дозе 1600 ЕД/сут в течение 12 дней у девяти пациентов отмечено исчезновение тромба, у четырех тромб визуализировался, но уменьшился в размерах. При оценке динамики кровотока в скомпрометированном

бассейне у шести больных наблюдалось полное восстановление мозгового кровотока, у семи – увеличение по сравнению с исходными значениями. Концентрация фибриногена, а также тромбиновое и протромбиновое время статистически значимо не изменялись [13].

В одном из пострегистрационных клинических исследований [17] выполнена сравнительная оценка результатов графической регистрации процесса свертывания крови с использованием метода низкочастотной вибрационной пьезоэлектрической гемокоагулографии у пациентов с ИБС, комплексная терапия у которых была дополнена курсовым назначением Тромбовазима®. Установлено, что курсовой прием препарата обеспечивает статистически значимое снижение контактной фазы свертывания крови (с  $318 \pm 19$  до  $178 \pm 21$ ) и увеличение времени ее достижения (с  $1,1 \pm 0,3$  до  $3,2 \pm 0,4$  мин). При этом существенно снижается интенсивность контактной фазы коагуляции (с  $141,82 \pm 13,21$  до  $18,13 \pm 6,27$ ) и константа тромбиновой активности (с  $58,82 \pm 4,37$  до  $23,81 \pm 3,36$ ). Эти изменения регистрируются на фоне уменьшения интенсивности коагуляционного драйва (с  $41,89 \pm 2,35$  до  $25,34 \pm 3,12$ ) и возрастания времени свертываемости цельной крови (с  $3,7 \pm 0,1$  до  $10,3 \pm 1,1$  мин). Полученные результаты демонстрируют эффективность Тромбовазима® в отношении не только его фибринолитической активности, но и снижения прокоагулянтной активности в тромбоцитарно-сосудистом и прокоагулянтном звеньях гемостаза. Проведенное исследование позволило установить, что курсовой прием препарата Тромбовазим® в суточной дозе 1600 ЕД обеспечивает выраженную эффективность в отношении повышения резервных возможностей антикоагулянтного звена гемостаза и снижения агрегационной активности тромбоцитов на фоне оптимизации соотношения ряда цитокинов, ответственных за реализацию про- и противовоспалительной активностей.

В статье [18] авторы обсуждают способы лечения окклюзионных заболеваний сосудов системы нижней полой вены и профилактики тромбоэмболии легочной артерии, сравнивают качество жизни пациентов, получающих традиционную комплексную терапию окклюзионных заболеваний сосудов системы нижней полой вены, и терапию с применением Тромбовазима®. На основании полученных результатов даны рекомендации по включению препарата в комплексную терапию венозного тромбоза. Также было проведено несколько пилотных исследований в офтальмологии [4], нейрохирургии [20], кардиологии [5–7].

Таким образом, таргетная фармакодинамика субтилизинов создает объективные предпосылки для создания на их основе пероральных тромболитических препаратов. В настоящий момент такой фармакотерапевтической группы не существует, но вероятность ее появления достаточно высока и зависит от инициативы компании-производителя и, в большей степени, от заинтересованности Министерства здравоохранения Российской Федерации. Совершенно очевидно, что иммобилизованные субтилизины имеют масштабные перспективы для внедрения в клиническую практику. На сегодняшний день они могут применяться в качестве инъекционного тромболитика для лечения острого инфаркта миокарда и тяжелой хронической венозной недостаточности (пероральная форма) с выраженным тромболитическим эффектом. Для субтилизинов однозначно существует несколько показаний к применению: в сосудистой хирургии – острый венозный тромбоз и тромбоэмболия легочной артерии, в офтальмологии – тромбоз сетчатки, в кардиологии – тромбоз ушка предсердия, в неврологии – ишемический инсульт и тромбоз венозных синусов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев А.А., Куценогий П.К., Мирошников П.Н. и др. Выделение и свойства фибринолитической сериновой протеиназы, секретируемой штаммом *Bacillus subtilis* B2805 // Докл. РАН. 2014. 455. (5). 595–598.
2. Ауслендер В.Л., Брызгин А.А., Воронин Л.А. и др. Ускорители электронов серии ИЛУ и их применение в промышленности и медицине // XI Международное совещание по применению ускорителей заряженных частиц в промышленности и медицине: сб. докл. СПб., 2005. 78–81.
3. Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Практическое применение бациллярных протеаз // Учен. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естеств. наук. 2011. 153. (2). 29–40.
4. Белоусова Н.Ю., Мазунин И.Ю., Кольчик О.В. и др. Опыт применения отечественного препарата тромбовазим в комбинированной терапии окклюзии ретинальных вен // Человек и лекарство: сб. матер. XVII Рос. конгр. М., 2010. 47.
5. Бувечич Е.И., Котовщикова Е.Ф., Сьюльжина Е.Н. и др. О состоянии эндотелия при остром инфаркте миокарда до и после приема Тромбовазима® // Тромбоз, гемостаз и реология. 2009. (3). 33–37.
6. Вышков Е.В., Баталов Р.Е., Марков В.А. и др. Сравнительная эффективность ферментного препарата с тромболитическим действием при внутрипредсердном тромбозе и спонтанном эхоконтрастировании у больных с фибрилляцией предсердий // Рос. кардиол. журн. 2015. (9). 71–74.

7. Вышлов Е.В., Марков Е.В., Попов С.В. Первый опыт применения тромбозима для лизиса внутрипредсердных тромбов у больных с фибрилляцией предсердий // Сиб. мед. журн. 2011. (1). 102–105.
8. Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А. и др. Нанотехнологии в фармакологии. М., 2011. 136 с.
9. Кинит Д.Н., Верещагин Е.И., Мадонов П.Г. и др. Эффективность препарата Тромбозим в лечении хронической венозной недостаточности // Человек и лекарство: сб. мат. XVI Рос. конгр. М., 2009. 127–128.
10. Лютова Л.В., Андреев Г.В., Карабасова М.А. и др. Исследование тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из *Thermoactinomyces vulgaris in vivo* // Прикл. биохимия и микробиология. 1990. 26. (5). 623–628.
11. Мадонов П.Г. Фармакологические свойства и клинические эффекты белково-полимерных лекарственных средств, созданных электронно-лучевым синтезом: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2012.
12. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В. и др. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Медицина и образование в Сибири. 2013. (4). <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1115>.
13. Мадонов П.Г., Кинит Д.Н., Ершов К.И. и др. Опыт клинического применения нового лекарственного препарата Тромбозим в сосудистой хирургии // Ангиол. и сосуд. хирургия. 2015. 21. (1). 99–104.
14. Мадонов П.Г., Маринкин И.О., Кулешов В.М. и др. Эффективность применения препарата Тромбозим при хронической венозной недостаточности на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных оральных контрацептивов // Человек и лекарство: сб. мат. XVI Рос. конгр. М., 2010. 175.
15. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Кинит Д.Н. Химические и фармакологические свойства субтилизинов // Сиб. науч. мед. журн. 2016. 36. (3). 13–22.
16. Плотников М.Б., Дыгай А.М., Алиев О.И. и др. Антитромботический и тромболитический эффект нового отечественного протеолитического препарата Тромбозим // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. 147. (4). 418–421.
17. Соловьев М.А. Плейотропные эффекты перорального фибринолитика в комплексной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца: стенокардией напряжения, ФК I-II, НК 0-1: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2011.
18. Сощенко Д.Г., Фокин А.А. Оценка качества жизни больных с окклюзионным поражением сосудов системы нижней полой вены и опыт применения нового лекарственного препарата Тромбозим // Тромбоз, гемостаз и реология. 2011. (2). 59–64.
19. Троицкий А.В. Разработка способа получения лекарственных препаратов на основе иммобилизованных протеаз *Vac. subtilis*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1998.
20. Трофимов А.О., Кравец Л.Я. К вопросу о фибринолизе при внутрочерепных кровоизлияниях // V Съезд нейрохирургов России: мат. съезда. Уфа, 2009. 464.
21. Baharifar H., Tavoosidana G., Karimi R. et al. Optimization of self-assembled chitosan/streptokinase nanoparticles and evaluation of their cytotoxicity and thrombolytic activity // J. Nanosci. Nanotechnol. 2015. 15. (12). 10127–10133.
22. Bi Q., Han B., Feng Y. et al. Antithrombotic effects of a newly purified fibrinolytic protease from *Urechis unicinctus* // Thromb. Res. 2013. 132. (2). e135–e144.
23. Cesarone M.R., Belcaro G., Nicolaidis A.N. et al. Prevention of venous thrombosis in long-haul flights with Flite Tabs: the LONFLIT-FLITE randomized, controlled trial // Angiology. 2003. 54. (5). 531–539.
24. Choi D.B., Cha W.-S., Park N. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris* // Bioresour. Technol. 2011. 102. (3). 3279–3285.
25. Efficacy and Safety of Natto Extract. Clinical trial NCT00447434. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00447434?term=NCT00447434&rank=1>.
26. Effect of natto diet on blood pressure // Basic and Clinical Aspects of Japanese Traditional Food Natto II. Japan Technology Transfer Association (JTTAS) / Eds.: M. Maruyama, H. Sumi. Tokyo, 1998. 1–3.
27. Fujita M., Hong K., Ito Y. et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat // Biol. Pharm. Bull. 1995. 18. (10). 1387–1391.
28. Fujita M., Hong K., Ito Y. et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract // Biol. Pharm. Bull. 1995. 18. (9). 1194–1196.
29. Hsia C.H., Shen M.C., Lin J.S. et al. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects // Nutr. Res. 2009. 29. (3). 145–220.
30. Hsu R.L., Lee K.T., Wang J.H. et al. Amyloid-degrading ability of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* // J. Agric. Food Chem. 2009. 57. (2). 503–508.
31. Kim J.Y., Gum S.N., Paik J.K. et al. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial // Hypertens. Res. 2008. 31. (8). 1583–1588.
32. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. 97. (15). 6647–6665.4
33. Lampe B.J., English J.C. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. natto // Food Chem. Toxicol. 2016. 88. 87–99.

34. Lee A.J., Mowbray P.I., Lowe G.D. et al. Blood viscosity and elevated carotid intima-media thickness in men and women: The Edinburgh Artery Study // *Circulation*. 1998. 97. 1467–1473.
35. Mahajan P.M., Nayak S., Lele S.S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization // *J. Biosci. Bioeng.* 2012. 113. (3). 307–314.
36. Majumdar S., Sarmah B., Gogoi D. et al. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B // *Biochimie*. 2014. 103. 50–60.
37. Mine Y., Wong A.H.K., Jiang B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods // *Food Res. Int.* 2005. 38. (3). 243–250.
38. Mukherjee A.K., Rai S.K., Thakur R. et al. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits *in vivo* anticoagulant activity and thrombolytic potency // *Biochimie*. 2012. 94. (6). 1300–1308.
39. Nattokinase Atherothrombotic Prevention Study (NAPS). Clinical trial NCT02080520. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02080520?term=NCT02080520&rank=1>.
40. Ogasawara K., Inoue K., Park S. et al. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial // *Hypertens. Res.* 2008. 31. (8). 1583–1588.
41. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. 69. (2). 126–132.
42. Simkhada J.R., Cho S.S., Mander P. et al. Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model // *Thromb. Res.* 2012. 129. (2). 176–182.
43. Spreer A., Rüchel R., Reichard U. Characterization of an extracellular subtilisin protease of *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during invasive rhino-orbital mycosis // *Med. Mycol.* 2006. 44. (8). 723–731.
44. Suzuki Y., Kondo K., Ichise H. et al. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening // *Nutrition*. 2003. 19. (3). 261–264.
45. Suzuki Y., Kondo K., Matsumoto Y. et al. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery // *Life Sci.* 2003. 73. (10). 1289–1298.
46. Tai M.W., Sweet B.V. Nattokinase for prevention of thrombosis // *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2006. 63. (12). 1121–1123.
47. Vaidya B., Nayak M.K., Dash D. et al. Development and characterization of highly selective target-sensitive liposomes for the delivery of streptokinase: *in vitro/in vivo* studies // *Drug Deliv.* 2016. 23. (3). 801–807.
48. Wang C., Ji B., Cao Y. et al. Evaluating thrombolytic efficacy and thrombus targetability of RGDS-liposomes encapsulating subtilisin FS33 *in vivo* // *Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2010. 27. (2). 332–336. [In Chinese].
49. Wang C.T., Ji B.P., Li B. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. 33. (9). 750–758.
50. Wang S., Deng Z., Li Q. et al. A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica* // *Comp. Biochem Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2011. 159. (1). 18–25.
51. Yan F., Yan J., Sun W. et al. Thrombolytic effect of subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice // *J. Thromb. Thrombolysis*. 2009. 28. (4). 444–448.

## TARGETED PHARMACODYNAMIC OF SUBTILISINS

**Pavel Gennadievich MADONOV<sup>1,2</sup>, Svetlana Vladimirovna MISHENINA<sup>2</sup>,  
Dmitriy Nikolaevich KINSHT<sup>1,2</sup>, Nataliya Vladimirovna KIKHTENKO<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Novosibirsk State Medicinal University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

<sup>2</sup> *Scientific Future Management Ltd.  
630559, Koltsovo, Technoparkovaya str., 10*

---

Subtilisin is one of the proteolytic enzymes. It is produced by bacteria of the genus *Bacillus subtilis* and has great potential in pharmacology of thrombosis. Direct thrombolytic effect and no side effects similar to those of widely used in the last 20 years plasminogen activators lead to this opportunity. Recent studies of the clinical use of subtilisin have shown their effectiveness not only for the treatment of thrombosis, but also for the prevention of cardiovascular disease and dementia. However, the use of subtilisin in medicine is limited by its low bioavailability. Trombovazim® is a new domestic product, which is based on pegylated subtilisin and created using technology of radiation synthesis. Trombovazim® has targeted thrombolytic, cardioprotective and anti-inflammatory action. Today Trombovazim® is the only registered oral thrombolytic. Immobilized subtilisin are broad prospects for introduction in clinical practice.

---

**Key words:** subtilisins, nattokinase, Trombovazim, thrombolytic therapy, anticoagulant activity, venous sinus thrombosis, myocardial infarction.

*Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor; head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: madonov@scpb.ru*

*Mishenina S.V. – candidate of medical sciences, associated professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine*

*Kinsht D.N. – doctor of medical sciences, professor; head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine*

*Kikhtenko N.V. – deputy head of research department*

## ЭПИФИЗАРНО-ИММУННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ У МЫШЕЙ ЛИНИЙ СВА И С57BL/6J

Галина Ивановна ЛИТВИНЕНКО, Оксана Борисовна ГРИЦЫК,  
Павел Александрович АВРОРОВ, Евгения Владимировна МЕЛЬНИКОВА,  
Анна Вениаминовна ШУРЛЫГИНА, Валерий Алексеевич ТРУФАКИН

*НИИ физиологии и фундаментальной медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4*

Цель исследования – выявить особенности взаимоотношений между эпифизом и органами иммунной системы у мышей линий СВА и С57BL/6J с высоким и низким эндогенным уровнем мелатонина. **Материал и методы.** Субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии, аутофлуоресценцию липофусцина эпифиза и тимуса регистрировали с помощью конфокальной микроскопии. **Результаты и их обсуждение.** У мышей С57BL/6J по сравнению с мышами СВА больше корреляционных связей между параметрами эпифиза и клеточным составом органов иммунной системы, а также между численностью клеточных субпопуляций в тимусе, селезенке и крови. Это свидетельствует о большей значимости эпифиза в эндокринно-иммунных взаимоотношениях и повышенной напряженности межклеточных взаимодействий в иммунной системе при низком уровне эндогенного мелатонина у мышей С57BL/6J.

**Ключевые слова:** эпифиз, лимфоцит, тимус, селезенка.

В последние годы получены новые данные о механизмах, обеспечивающих комплексное взаимодействие между нервной, иммунной и эндокринной системами. Одним из интеграторов этого взаимодействия является гормон эпифиза мелатонин, который регулирует деятельность центральной и вегетативной нервной систем, эндокринных органов и иммунной системы [11]. Основное количество исследований, касающихся выяснения роли эпифиза в нейроэндокринно-иммунных взаимоотношениях, базируется на применении экзогенных эпифизарных факторов, или блокаторов синтеза мелатонина, и очень мало работ, которые были бы посвящены изучению эпифизарно-иммунных взаимосвязей в интактном организме. Исследования такого плана необходимы для более полного понимания механизмов нейроэндокринной регуляции иммунных функций, так как при введении экзогенных

гормонов или экспериментальном воздействии на их продукцию регуляторные эффекты могут осуществляться с вовлечением других сигнальных и метаболических путей, чем это происходит в интактном организме.

В этом отношении удобной моделью для исследования являются лабораторные мыши инбредных линий СВА и С57BL/6J, которые значительно различаются как по функциональному состоянию иммунной системы, так и по уровню продукции эпифизарного мелатонина. Так, у мышей этих линий различна способность селезеночных Т- и В-клеток к спонтанной и стимулированной пролиферации: высокая у мышей СВА, низкая – у С57BL/6J [5]. У мышей С57BL/6J преобладает Th1-зависимый иммунный ответ [16]. У них по сравнению с мышами СВА эпифиз продуцирует значительно меньше мелатонина, что обусловлено естественной мутацией гена, коди-

*Литвиненко Г. И. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории хронофизиологии,  
e-mail: litv\_g\_i@mail.ru*

*Грицык О.Б. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории хронофизиологии,  
e-mail: oks-gricik@yandex.ru*

*Авроров П.А. – научный сотрудник лаборатории хронофизиологии, e-mail: pavel.avrorov@gmail.com*

*Мельникова Е.В. – научный сотрудник лаборатории хронофизиологии, e-mail: gennyuma@gmail.com*

*Шурлыгина А.В. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории хронофизиологии,  
e-mail: anna\_v\_s@mail.ru*

*Труфакин В.А. – д.м.н., проф., академик РАН, руководитель лаборатории хронофизиологии,  
e-mail: trufakin@physiol.ru*

рующего синтез N-ацетилтрансферазы [17]. Таким образом, можно сказать, что эти две линии мышей оппозитны по функциональному состоянию иммунной и нейроэндокринной систем. В то же время неизвестно, существуют ли особенности во взаимоотношениях между эпифизом и иммунной системой у животных при генетически обусловленной низкой продукции мелатонина. Выяснение этого вопроса необходимо для более полного понимания механизмов нейроэндокринной регуляции иммунитета и для выработки персонализированных стратегий применения эпифизарных эндокринных факторов в лечебных целях.

Цель работы – с помощью корреляционного анализа выявить особенности взаимоотношений между эпифизом и органами иммунной системы у мышей с низким и высоким эндогенным уровнем мелатонина.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте использованы самцы мышей СВА и С57BL/6J в возрасте 4 месяцев, массой 26–30 г, родившиеся и содержавшиеся в виварии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии. По 7 мышей линий СВА и С57BL/6J содержались при световом режиме 12 ч свет : 12 ч темнота. Освещенность на уровне клеток составляла 750 люкс. Мыши содержались при постоянной температуре ( $22 \pm 2$  °C) на стандартной лабораторной диете со свободным доступом к пище и воде. Эксперимент проведен в весеннее (март) время года. Животных взвешивали, затем декапитировали под этиминаловым наркозом. Забирали кровь из декапитационной раны, лимфоидные органы (тимус и селезенку), эпифиз.

Подсчитывали количество ядросодержащих клеток в крови и суспензии из лимфоидных органов. С помощью моноклональных антител, меченных FITC и фикоэритрином (BD Pharmingen, США), на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Becton Dickinson, США) в тимусе и селезенке определяли содержание Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ), Т-хелперов/индукторов ( $CD4^+8^-$ ), цитотоксических Т-клеток ( $CD4^+8^+$ ), незрелых дубль-позитивных Т-клеток ( $CD4^+8^+$ ), Т-лимфоцитов с высоким уровнем экспрессии  $CD3$  – более дифференцированные Т-клетки ( $CD3^{hi}$ ), Т-регуляторных супрессорных лимфоцитов ( $CD4^+25^+$ ), В-лимфоцитов ( $CD19^+$ ). Абсолютное количество клеток выражали в  $10^6$ /мл для крови и  $10^6$ /орган для тимуса и селезенки. Оценку соотношения клеток тимуса и селезенки в различных фазах клеточного цикла проводили методом проточной цитометрии после окраски йодидом пропидиума [10]. Выделенные эпифизы и тимусы

помещались в среду для замораживания NEG 50 (Termo Microm Scientific, Германия), после чего они хранились в жидком азоте до момента исследования. Липофусцин в криостатных срезах эпифиза и тимуса выявляли по ранее описанной методике [4].

Уход за животными и экспериментальные процедуры соответствовали Европейской директиве (86/609/ЕЕС). Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $SE$ ) и представляли в виде  $M \pm SE$ . Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни при уровне значимости  $> 95\%$  ( $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ проводился с вычислением коэффициентов корреляции Спирмена ( $p < 0,001$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У мышей линии С57BL/6J по сравнению с животными линии СВА зарегистрирован сниженный индекс эпифиза, более высокие масса и индекс селезенки, индекс тимуса. Общее количество и абсолютное число всех исследованных субпопуляций тимоцитов были повышены, но снижена их пролиферативная активность (% клеток в фазах S+G2/M с содержанием ДНК в ядре  $> 2n$ ). В селезенке мышей С57BL/6J выявлен более высокий уровень общего количества спленоцитов и абсолютного количества лимфоцитов  $CD3^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD4^+8^-$ ,  $CD4^+8^+$ ,  $CD4^+25^+$ . Отмечена увеличенная по сравнению с мышами СВА пролиферативная активность спленоцитов (% гипердиплоидных клеток с содержанием ДНК в ядре  $> 2n$ ). Показатель дифференцировки клеток в тимусе, равный соотношению абсолютных уровней зрелых и незрелых субпопуляций лимфоцитов в органе ( $CD4^+8^- + CD4^+8^+ / CD4^+8^+$ ), у мышей линии С57BL/6J меньше, чем у мышей линии СВА (соответственно  $0,09 \pm 0,01$  и  $0,32 \pm 0,20$ ,  $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Таким образом, мыши линии С57BL/6J, характеризующиеся низким уровнем продукции эпифизарного мелатонина и иммунного ответа на Т-зависимый антиген, имеют дефицит тимусного Т-лимфопоэза по сравнению с высокоответствующими на Т-зависимый антиген животными линии СВА. У них снижена пролиферация и дифференцировка тимоцитов, что выражается в уменьшенном содержании в тимусе клеток в фазах S+G2/M, сниженном отношении числа зрелых и незрелых тимоцитов. Это ассоциируется с низким уровнем синтеза эпифизарного мелатонина у животных данной линии [17], чему соответ-

Таблица 1

Масса эпифиза, тимуса и селезенки, уровень липофусцина в тимусе и эпифизе, клеточный состав тимуса и селезенки у мышей линий СВА и С57BL/6J

Показатель	Линия мышей	
	СВА	С57BL/6J
Масса мышцы, г	27,91 ± 0,92	26,89 ± 0,87
Масса тимуса, мг	33,17 ± 5,87	42,57 ± 3,95
Индекс тимуса	0,92 ± 0,12	1,58 ± 0,14*
Масса селезенки, мг	83,14 ± 3,70	102,71 ± 4,9*
Индекс селезенки	3,05 ± 0,14	3,83 ± 0,18*
Масса эпифиза, мг	0,89 ± 0,21	0,40 ± 0,08
Индекс эпифиза	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00*
Содержание липофусцина в эпифизе, усл. ед.	37,53 ± 3,37	36,06 ± 2,71
Содержание липофусцина в тимусе, усл. ед.	48,44 ± 5,45	37,50 ± 2,87
Клеточный состав тимуса		
Общее количество клеток в тимусе, ×10 <sup>6</sup>	14,08 ± 2,52	105,52 ± 12,97*
CD3 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	10,79 ± 1,86	68,38 ± 8,21*
CD3 <sup>hi</sup> , ×10 <sup>6</sup>	1,96 ± 0,39	12,71 ± 1,60*
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>-</sup> , ×10 <sup>6</sup>	1,17 ± 0,24	7,33 ± 1,01*
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	12,02 ± 2,16	93,71 ± 11,56*
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	0,41 ± 0,08	1,97 ± 0,29*
< 2n, %	0,27 ± 0,14	0,29 ± 0,06
2n, %	91,97 ± 0,88	96,67 ± 0,30*
>2n, %	7,76 ± 0,86	3,04 ± 0,32*
Клеточный состав селезенки		
Общее количество клеток в селезенке, ×10 <sup>6</sup>	33,17 ± 3,01	79,64 ± 7,78*
CD3 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	12,89 ± 1,01	28,23 ± 2,95*
CD19 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	17,62 ± 1,78	43,07 ± 4,35*
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>-</sup> , ×10 <sup>6</sup>	8,26 ± 0,63	16,82 ± 1,84*
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	4,79 ± 0,45	11,19 ± 1,11*
CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> , ×10 <sup>6</sup>	0,88 ± 0,06	2,34 ± 0,25*
< 2n, %	0,37 ± 0,12	0,56 ± 0,09
2n, %	97,10 ± 0,15	95,63 ± 0,39*
> 2n, %	2,53 ± 0,11	3,81 ± 0,36*

Примечание. \* – отличие от величины соответствующего показателя мышей линии СВА статистически значимо при  $p < 0,05$ ; > 2n – гипердиплоидные клетки (фазы S+G2/M); 2n – диплоидные клетки в фазе G0/G1; < 2n – гиподиплоидные клетки (апоптоз).

стует уменьшенный весовой индекс пинеальной железы и сниженная на 55 % масса эпифиза [9]. Можно предполагать, что недостаток мелатонина у мышей С57BL/6J обуславливает характерные для этих животных особенности центральной дифференцировки Т-лимфоцитов.

В противоположность сниженной функции тимуса у мышей С57BL/6J наблюдаются признаки активации спленоцитов в виде повышенного количества клеток в синтетической и митотической фазах клеточного цикла. Это совпадает с данными Л.П. Михайловой о более выраженном гранулематозном воспалительном процессе у данных мышей [6] из-за преобладания клеточно-Тh1-зависимого иммунного ответа [16].

При генетически обусловленных различиях продукции мелатонина у мышей линий СВА и С57BL/6J эпифизарно-иммунные взаимоотношения могут иметь межлинейные особенности, которые мы попытались выявить с помощью корреляционного анализа.

В табл. 2 представлены результаты корреляционного анализа показателей, характеризующих состояние эпифиза и клеточный состав разных отделов иммунной системы – центрального (тимус) и периферического (селезенка, кровь). У мышей СВА обнаружены две связи между иммунными и эпифизарными параметрами: между содержанием липофусцина в эпифизе и количеством клеток в тимусе и между содержанием липофусцина в

Таблица 2

Значения коэффициентов корреляции между морфофункциональными показателями эпифиза, периферической крови и органов иммунной системы мышей линии СВА и С57BL/6J

Пара показателей группы мышей линии СВА	<i>r</i>	Пара показателей группы мышей линии С57BL/6J	<i>r</i>
Лип т – Лип эп	–0,900	CD3 <sup>+</sup> т – Лип эп	0,942
ОКМ Т – Лип эп	0,942	CD3 <sup>hi+</sup> т – Лип эп	0,942
		CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>–</sup> т – Лип эп	0,942
		CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> т – Лип эп	0,828
		т 2n% – Лип эп	0,828
		CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup> к – Лип эп	0,885
		Масса эп – Л к	0,926
		Масса эп – CD3 <sup>+</sup> к	0,963
		Масса эп – CD19 <sup>+</sup> к	0,926
		Масса эп – CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>–</sup> к	0,963
		Масса эп – CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> к	0,852

*Примечание.* Здесь и в табл. 3 для анализа использованы значения абсолютного количества клеток в органе или в 1 мл крови; *r* – коэффициент корреляции Спирмена (все приведенные коэффициенты корреляции достоверны при  $p < 0,001$ ); к – кровь; Л – количество лейкоцитов в периферической крови; с – селезенка; т – тимус; эп – эпифиз; ОКМ – общее количество мононуклеарных клеток в органе; Лип – липофусцин (интенсивность аутофлуоресценции, усл. ед).

тимусе и эпифизе. Учитывая, что липофусцин является маркером повреждения клеток эпифиза и снижения их функциональной активности [8, 15], последняя отрицательная связь может отражать возможность компенсаторного усиления синтеза тимусного мелатонина при дефиците его эпифизарной продукции [12].

У мышей С57BL/6J количество корреляционных связей между массой эпифиза, уровнем в нем липофусцина и клеточным составом крови и тимуса увеличивается до 11. Уровень липофусцина в эпифизе положительно коррелирует с процентным содержанием в тимусе не пролиферирующих диплоидных клеток в фазе клеточного цикла G0/G1 (2n) и с числом зрелых тимоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>hi+</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>–</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>). Эти связи могут отражать более высокую значимость функционального состояния клеток пинеальной железы для обеспечения центрального Т-лимфопоэза [14] у дефицитных по мелатонину мышей С57BL/6J. Масса эпифиза, характеризующая уровень продукции в нем мелатонина [9], имеет корреляционные связи с клеточным составом циркулирующего пула лимфоцитов крови.

Таким образом, по-видимому, при относительно низком уровне мелатонина у мышей С57BL/6J усиливается регуляторная роль эпифиза для процессов пролиферации, дифференцировки и циркуляции иммунокомпетентных клеток. При этом повышается напряженность взаимоотношений между эпифизом и тимусом, что находит свое отражение в увеличении количества корреляцион-

ных связей между показателями эпифиза и численностью клеток в различных отделах иммунной системы. Это соответствует данным о наличии взаимосвязей уровня липофусцина в эпифизе с клеточным составом органов иммунной системы только при подавлении синтеза эпифизарного мелатонина круглосуточным освещением [4].

Межлинейные различия обнаружены и для взаимосвязей между показателями клеточного состава крови и органов иммунной системы (табл. 3). У мышей линии СВА имеется 34 корреляционных связи, из них 6 – отрицательных. У мышей С57BL/6J общее количество связей составляет 42, при этом все они положительные.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что у мышей исследуемых линий в формировании пула Т-лимфоцитов тимуса принимают участие разные субпопуляции клеток. У мышей линии СВА положительные корреляционные связи между количеством всех клеток тимуса и зрелых Т-клеточных субпопуляций CD3<sup>hi+</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>–</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> свидетельствуют о том, что пул тимоцитов у животных этой линии в большей степени формируется за счет дифференцированных Т-лимфоцитов. У мышей линии С57BL/6J в этом процессе принимает участие и менее дифференцированная субпопуляция CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>.

Численность пула CD3<sup>+</sup>-спленоцитов (Т-клетки) у мышей СВА положительно связана с количеством клеток CD4<sup>+</sup>8<sup>–</sup> и CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, что свидетельствует о преимущественном включении этих субпопуляций в формирование Т-лимфоцитар-

Таблица 3

Значения коэффициентов корреляции между показателями клеточного состава периферической крови и органов иммунной системы мышей линии СВА и С57BL/6J

Пара показателей группы мышей линии СВА	<i>r</i>	Пара показателей группы мышей линии С57BL/6J	<i>r</i>
ОКМ Т – CD3 <sup>hi+</sup> Т	0,964	ОКМ Т – CD4 <sup>8+</sup> Т	0,900
ОКМ Т – CD4 <sup>8+</sup> Т	0,964	ОКМ Т – CD4 <sup>8+</sup> Т	0,900
ОКМ Т – CD4 <sup>8+</sup> Т	0,857	CD3 <sup>+</sup> с – CD19 <sup>+</sup> с	0,893
4.. CD3 <sup>+</sup> Т – CD4 <sup>8+</sup> Т	0,900		
CD3 <sup>+</sup> с – CD4 <sup>8+</sup> с	0,964		
CD3 <sup>+</sup> с – CD4 <sup>8+</sup> с	0,892		
CD4 <sup>8+</sup> с – CD4 <sup>25+</sup> с	–0,774		
CD4 <sup>25+</sup> к – CD3 <sup>hi+</sup> Т	–0,900		
CD4 <sup>25+</sup> к – CD4 <sup>8+</sup> Т	–0,900		
CD4 <sup>25+</sup> к – CD4 <sup>8+</sup> Т	–0,942		

ной популяции спленоцитов. У мышей С57BL/6J не было найдено корреляционных связей числа CD3<sup>+</sup>-спленоцитов с количеством других Т-клеточных субпопуляций, что говорит об отсутствии подобной закономерности.

У мышей СВА обращают на себя внимание отрицательные связи между численностью CD4<sup>25+</sup>-спленоцитов и лимфоцитов крови с количеством селезеночных эффекторов/киллеров (CD4<sup>8+</sup>) и дифференцированных тимоцитов (CD3<sup>hi+</sup>, CD4<sup>8+</sup>, CD4<sup>8+</sup>), которые могут объясняться супрессорной функцией CD4<sup>25+</sup>-Т-регуляторных клеток. У мышей С57BL/6J таких связей не обнаружено, что свидетельствует о менее упорядоченных регуляторных взаимоотношениях внутри клеточного пула иммунной системы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у мышей линии СВА, характеризующихся высоким уровнем синтеза мелатонина и иммунного ответа на Т-зависимый антиген, регуляция процессов пролиферации, дифференцировки и циркуляции лимфоцитов, по-видимому, происходит преимущественно с участием «внутрииммунных» механизмов. Включение эпифиза в иммунорегуляторные взаимодействия у этих животных сравнительно невелико. Это совпадает с данными, полученными нами ранее, о большом количестве корреляционных связей между клеточным составом органов иммунной системы и отсутствием корреляций между иммунными показателями и уровнем кортикостерона в крови этих животных [7].

Животные линии С57BL/6J демонстрируют иную картину эпифизарно-иммунных взаимоотношений. Низкий уровень синтеза мелатонина и низкий иммунный ответ на Т-зависимый антиген

у этих животных ассоциируются с большим количеством корреляционных связей между показателями функции эпифиза и клеточным составом органов иммунной системы, что свидетельствует о более значимой роли эпифиза в эндокринно-иммунных взаимоотношениях по сравнению с мышами линии СВА. У этих животных наблюдается и большее количество «внутрииммунных» связей. Учитывая мнение о том, что внутри- и межсистемные корреляции отражают напряженность функционирования биологической системы и состояние механизмов адаптации [1, 3], можно предположить более высокую напряженность и сниженные адаптационные возможности функционирования иммунно-эндокринного комплекса у мышей линии С57BL/6J, дефицитных по синтезу мелатонина. Это предположение поддерживается данными настоящего исследования о сниженном уровне пролиферации и дифференцировки тимоцитов, а также сведениями о сниженном противоопухолевом иммунитете [13] и выраженном гранулематозном процессе при индукции воспаления [6] у животных этой линии. Межлинейные различия в эпифизарно-иммунных взаимоотношениях проявляются и в реакции иммунной системы мышей СВА и С57BL/6J на круглосуточное освещение, подавляющее синтез мелатонина в эпифизе: у животных С57BL/6J в отличие от мышей СВА воздействие вызывает нарушение центрального лимфопоеза в тимусе [2].

Таким образом, эндогенный уровень мелатонина, различающийся у мышей линий СВА и С57BL/6J, имеет значение для направленности и выраженности взаимоотношений между морфофункциональными параметрами эпифиза и органов иммунной системы. Повышенная напряженность и сниженные адаптационные возможности иммунной системы при генетически обуслов-

ленном дефиците мелатонина могут быть предикторами значительных иммунных дисфункций в стрессовых ситуациях и при нарушении суточных ритмов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветлугина Т.П., Никитина В.Б., Невидимова Т.И. и др. Система иммунитета и уровень тревожности при адаптации человека к новым условиям жизнедеятельности // *Фундамент. исслед.* 2012. (9, Ч. 1). 17–21.
2. Дубровина Н.И., Шурлыгина А.В., Литвиненко Г.И. и др. Поведение, память и иммунологический статус у мышей в модели десинхроноза // *Рос. физиол. журн.* 2015. 101. (5). 586–598.
3. Лебедев К.А., Полякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М., 1990. 224 с.
4. Литвиненко Г.И., Шурлыгина А.В., Грицык О.Б. и др. Взаимоотношения морфофункциональных показателей шишковидной железы и органов иммунной системы у крыс при естественном световом режиме и круглосуточном освещении // *Морфология.* 2014. 145. (2). 26–30.
5. Манько В.М., Чижевская М.А., Мастернак Т.Б. и др. Фенотипическая коррекция генного контроля иммунного ответа на гриппозную вакцину // *Иммунология.* 1994. (4). 17–21.
6. Михайлова Л.П., Макарова О.В. Сравнительная характеристика цитокинового профиля и морфологических проявлений гранулематозного воспаления у мышей BALB/c и C57BL/6 // *Иммунология.* 2005. (2). 95–98.
7. Шурлыгина А.В., Литвиненко Г.И., Ковшик И.Г., Труфакин В.А. Проблемы хронорегуляции функций лимфоидной системы // *Лимфология* / ред. В.И. Коненков, Ю.И. Бородин, М.С. Любарский. Новосибирск, 2012. 312–325.
8. Doublea K.L., Dedova V.N., Fedorow H. et al. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. 65. 1669–1682.
9. Feng P., Hu Y., Vurbic D., Guo Y. Maternal stress induces adult reduced REM sleep and melatonin level // *Dev. Neurobiol.* 2012. 72. (5). 677–687.
10. Gould M.K., Vu X.L., Seebeck T., de Koning H.P. Quantification of apoptosis and the cell cycle distribution of primary B cells using propidium iodide AfCS procedure protocol // *Anal. Biochem.* 2008. 382. (2). 87–93.
11. Guerrero J.M., Reiter R.J. Melatonin-immune system relationships // *Curr. Top. Med. Chem.* 2002. 2. (2). 167–179.
12. Jimenez-Jorge S., Jimenez-Caliani A.J., Guerrero J.M. et al. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland // *J. Pineal. Res.* 2005. 39. (1). 77–83.
13. Liu Z., Liu J.Q., Shi Y. et al. Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficiency leads to impaired antitumor T-cell responses and accelerated tumor growth // *Oncoimmunology.* 2015. 4. (7). e989137.
14. Maestroni G.J. The immunotherapeutic potential of melatonin // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2001. 10. (3). 467–476.
15. Maharaj D.S., Glass B.D., Daya S. Melatonin: new places in therapy // *Biosci. Rep.* 2007. 27. (6). 299–320.
16. Marquis J.F., Gros P. Genetic analysis of resistance to infections in mice: A/J meets C57BL/6J // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. 321. 27–57.
17. Von Gall C., Lewy A., Schomerus C., Vivien-Roels B. et al. Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice // *Eur. J. Neurosci.* 2000. 12. (3). 964–972.

## **EPIPHYSIS-IMMUNE RELATIONSHIP IN MICE OF CBA AND C57BL/6J STRAINS**

**Galina Ivanovna LITVINENKO, Oksana Borisovna GRITSYK,  
Pavel Aleksandrovich AVROROV, Evgeniya Vladimirovna MELNIKOVA,  
Anna Veniaminovna SHURLYGINA, Valeriy Alekseevich TRUFAKIN**

*Research Institute of Physiology and Basic Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4*

---

**Purpose of the study.** To identify the features of the relationship between the pineal gland and organs of the immune system in mice CBA and C57BL / 6J with high and low levels of endogenous melatonin. **Material and methods.** Lymphocyte subsets were determined by flow cytometry, autofluorescence of lipofuscin epiphysis and thymus was recorded by confocal microscopy. **Results and discussion.** The greater correlations between the parameters of the epiphysis and cellular composition organs of the immune system, as well as between the number of cell subsets in the thymus, spleen and blood were revealed in C57BL / 6J mice as compared to mice CBA. This testifies to the epiphysis greater importance in the pineal endocrine-immune relationships and increased tension in intercellular interactions of the immune system with low endogenous melatonin levels in mice C57BL/6J.

---

**Key words:** pineal gland, lymphocyte, thymus, spleen.

*Litvinenko G.I. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory for chronophysiology,  
e-mail: litv\_g\_i@mail.ru*

*Gritsyk O.B. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory for chronophysiology,  
e-mail: oks-gricik@yandex.ru*

*Avrorov P.A. – researcher of the laboratory for chronophysiology, e-mail: pavel.avrorov@gmail.com*

*Melnikova E.V. – researcher of the laboratory for chronophysiology, e-mail: gennyma@gmail.com*

*Shurlygina A.V. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher of the laboratory for chronophysiology,  
e-mail: anna\_v\_s@mail.ru*

*Trufakin V.A. – academician of RAS, doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory  
for chronophysiology, e-mail: trufakin@physiol.ru*

## ОПТИМИЗАЦИЯ КОДОНОВ ГЕНА ПРОТЕАЗЫ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ *E. coli*

Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Мария Владимировна КОТОВА,  
Лев Михайлович ПОЛЯКОВ

НИИ биохимии

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе представлен материал по оптимизации кодонов гена протеазы вируса табачной мозаики (tobacco etch virus protease – TEVp) с целью увеличения продукции соответствующего фермента клетками *E. coli*. В гене TEVp сделано 37 синонимических замен кодонов и 4 мутации (T17S, N68D, I77V и S219V). Ген клонировали в векторе в виде слитой последовательности с геном мальтозосвязывающего белка (MBP) и без него. Результаты экспериментов выделения белка в нативных условиях из клеток-продуцентов показали, что наибольшее количество фермента получено с конструкцией слитых генов MBP-TEVp.

**Ключевые слова:** протеаза вируса табачной мозаики, TEVp, рекомбинантный белок, оптимизация кодонов, *E. coli*.

В биотехнологии при создании различных рекомбинантных белков широко используется прием их получения в виде предшественников – слитых химерных полипептидов, впоследствии расщепляемых. Для расщепления слитых полипептидов используются специфичные протеазы. Одной из таких протеаз является протеаза вируса табачной мозаики (tobacco etch virus protease – TEVp). Белок представляет собой каталитический домен белка ядерного включения с молекулярной массой 29 кДа и может быть получен в рекомбинантном виде с сохранением ферментативной активности в клетках *E. coli* [6]. Протеаза вируса табачной мозаики может использоваться в получении различных терапевтических полипептидов из их химерных предшественников, в частности, при создании рекомбинантного аполипопротеина А-I, а также слаборастворимых белков в виде предшественников, слитых с мальтозосвязывающим белком. Фермент может быть получен в сравнительно большом количестве в клетках *E. coli*, однако при сверхэкспрессии гена TEVp рекомбинантный протеин, как и многие гетерологичные белки для *E. coli*, в большей степени накапливается в клетке в виде телец включения, что затрудняет его последующее выделение в нативных условиях с сохранением ферментативной активности [7]. В связи с этим исследователи

пытаются найти различные приемы для увеличения растворимости рекомбинантного белка в цитоплазме. В частности, в работе [11] описаны мутации в структуре фермента с целью увеличения его цитоплазматической растворимости, что позволило повысить выход энзима по сравнению с аналогичной системой гена «дикого типа» в пять раз. В литературе также известна работа, в которой фермент получали в виде слитого химерного полипептида с мальтозосвязывающим белком (MBP) [10]. Химерный полипептид в такой конструкции между доменами MBP и TEVp содержал сайт расщепления. При экспрессии полипептид оказался растворимым и накапливался в цитоплазме с последующим саморасщеплением и высвобождением TEVp. Следует отметить, что в данных работах использовался ген протеазы «дикого типа». Мы предположили, что, объединив эти две стратегии и оптимизировав структуру гена TEVp для экспрессии в клетках *E. coli*, можно добиться существенного повышения продукции фермента.

Таким образом, целью нашей работы являлась оптимизация кодонов гена TEVp для экспрессии в клетках *E. coli*, а также конструирование продуцентов с использованием оптимизированного гена и исследование влияния оптимизации на выход фермента из клеток-продуцентов.

*Рябченко А.В.* – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: borrelia@mail.ru

*Котова М.В.* – аспирант лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: zerokiri@mail.ru

*Поляков Л.М.* – д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

При конструировании модели рекомбинантной ДНК за основу была взята известная структура гена (gi M15239.1 (TEVGEN:6256-6981) в базе данных National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/335201>). Анализ частоты встречаемости редких кодонов в геноме *E. coli* проводили с помощью программы интернет-ресурса «Классическая и молекулярная биология» ([http://molbiol.ru/scripts/01\\_11.html](http://molbiol.ru/scripts/01_11.html)). Рекомбинантная ДНК с 5'-конца дополнительно содержала сайт эндонуклеазы рестрикции KpnI, а с 3'-конца – сайт эндонуклеазы рестрикции XhoI. Рекомбинантная ДНК размером 792 п.н. была синтезирована из нуклеотидов по принципу «de novo» фирмой «DNA 2.0» (США) и встроена в состав экспрессирующего вектора pD441-mbr. В результате встраивания под контролем промотора T5 в одной рамке считывания находилась рекомбинантная ДНК размером 1890 пар нуклеотидов, кодирующая химерный полипептид MBP-TEVp (625 аминокислотных остатков (а.о.), примерная молекулярная масса – 70 кДа). Рекомбинантная ДНК получена от фирмы-производителя в составе вектора в виде готовой плазмиды pD441-MBP-TEVp.

Трансформацию клеток *E. coli* шт. BL21(DE3) необходимой плазмидой или лигазной смесью проводили с помощью электропорации согласно методике фирмы-производителя прибора («PeqLab, Biotechnologie GmbH», Германия). Клоны *E. coli*, содержащие плазмиду, отбирали на селективной агаризованной среде LB, содержащей канамицин 30 мкг/мл.

Для конструирования плазмиды, содержащей ген TEVp без гена MBP, использовали ранее полученный вектор pETm, в который под регуляторной областью промотора фага T7 входит полилинкер, несущий набор сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции [3]. Плазмиды pD441-MBP-TEVp и pETm гидролизовали эндонуклеазами рестрикции KpnI и XhoI согласно инструкциям фирмы производителя ферментов («Сибэнзим», Россия). Фрагменты ДНК разделяли в 0,8%-м агарозном геле с последующей экстракцией ДНК набором «GeneJET Gel Extraction Kit» («Thermo Scientific», США). Очищенные фрагменты ДНК, ген TEVp и вектор pETm лигировали в эквимольном соотношении 5:1 (ген : плазида) с помощью T4 ДНК-лигазы («Сибэнзим»). Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli*. Несколько клонов отбирали для анализа на способность синтезировать рекомбинантный белок путем инкубирования клеток с индуктором и последующего анализа клеточных лизатов в полиакриламидном

геле (ПААГ). Положительные клоны отбирали в лабораторный музей для выделения плазмидных ДНК и дальнейшей работы. Плазмидную ДНК выделяли из клеток набором «Plasmid Miniprep» («Евроген», Россия).

Для экспрессии генов полипептидов использовали клетки *E. coli* шт. BL21(DE3). Из музейного клона *E. coli* выращивали ночную культуру в среде LB объемом 5 мл при 37 °С. На следующий день ночную культуру переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей канамицин 30 мкг/мл. Клетки выращивали при активном перемешивании и 37 °С до оптической плотности  $D_{600} = 0,8-1,2$ . Для анализа отбирали пробу (контроль) и добавляли индуктор – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,05 или 0,5 мМ. Далее клетки инкубировали 5 ч при аналогичных условиях. При необходимости температуру понижали до 20–22 °С, а время инкубирования увеличивали до 18 ч. По окончании инкубирования отбирали пробу для анализа (опытный образец). Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, замораживали и хранили при –20 °С для последующего выделения фермента.

Белковые препараты и клеточные лизаты анализировали в 12%-м ПААГ в денатурирующих условиях по Леммли. Образцы клеточных лизатов получали осаждением клеток из 1 мл культуры в течение 1 мин при 10 000 об/мин с последующим ресуспендированием клеток в 100 мкл буфера для загрузки образцов в ПААГ. Образцы выдерживали в кипящей водяной бане в течение 10 мин, клеточный дебрис осаждали 1 мин при 10 000 об/мин, 5–10 мкл супернатанта наносили на дорожки ПААГ. Белки в геле окрашивали раствором кумасси R250.

Выделение TEVp осуществляли в нативных условиях согласно протоколу фирмы-производителя аффинного сорбента Ni-NTA-сефароза CL-6B («Quiagen», Германия). Клетки *E. coli* ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), дополнительно содержащем 200 мМ хлорида натрия, 20 мМ имидазола, и разрушали обработкой ультразвуком (УЗГ 13-0,1/22, Всероссийский НИИ токов высокой частоты, Россия). Клеточный лизат отделяли от дебриса центрифугированием 20 мин при 15 000 об/мин. Дебрис экстрагировали 20 мин 8М мочевиной, осаждали 10 мин при 10 000 об/мин, супернатант использовали для анализа в ПААГ. Фермент из лизата клеток выделяли и очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с объемом смолы 8 мл. Хроматографию осуществляли общепринятыми методами жидкостной хроматографии,

профиль элюции регистрировали на проточном УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Целевой белок элюировали PBS, содержащим 250 мМ имидазола, pH 7,5. От имидазола фермент очищали с помощью диализа в PBS. Чистоту белка анализировали в ПААГ. На заключительном этапе к ферменту добавляли равный объем 100 % глицерина, перемешивали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Измерение концентрации белков осуществляли спектрофотометрически в ЦКП «Спектрометрические измерения» на базе НИИ биохимии, г. Новосибирск (спектрофотометр Evolution 300 «Thermo Scientific», США) по методике Варбурга и Кристиана.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оптимизации кодонов для экспрессии в клетках *E. coli* в структуру гена *TEVp* было внесено 37 синонимических замен, заменены все кодоны с частотой встречаемости менее 10 на 1000 (табл. 1). Кроме того, были сделаны четыре замены аминокислот: S219V, T17S, N68D и I77V. Мутация S219V уменьшает неспецифическую автокаталитическую активность примерно в 100 раз по сравнению с диким типом фермента, благодаря чему фермент остается более стабильным [6]. Мутации T17S, N68D и I77V приводят к большей цитоплазматической растворимости фермента при сохранении его каталитической активности [11].

Для саморасщепления полипептида MBP-TEV-протеаза и последующей очистки фермента с помощью аффинной хроматографии с 5'-конца гена TEV-протеазы был добавлен фрагмент ДНК, кодирующий сайт эндонуклеазы рестрикции KpnI, глицин, сайт TEV-протеазы (ENLYFQ/G), 6 аминокислотных остатков гистидина и глицин: 5'-GGTACCGCGCAAACCTGTATTTTCAGGGCCACCATCATCATCATGCGC-3'. С 3'-конца гена был добавлен фрагмент ДНК, кодирующий стоп-кодон, и сайт эндонуклеазы рестрикции XhoI: 5'-TAACTAAGCTAACTCGAG-3'.

В результате анализа клеточных лизатов из клеток *E. coli* шт. BL21(DE3), содержащих плазмиду pD441-MBP-TEVp и инкубированных с 0,5 мМ ИПТГ в течение 4 ч, был обнаружен белковый банд, по подвижности равный  $\sim 29$  кДа (рис. 1, дорожка 2). Изучение зависимости продукции фермента от времени инкубирования клеток показало, что максимальный уровень экспрессии наблюдался уже через 4 ч и в дальнейшем количество фермента не увеличивалось (данные не приводятся).

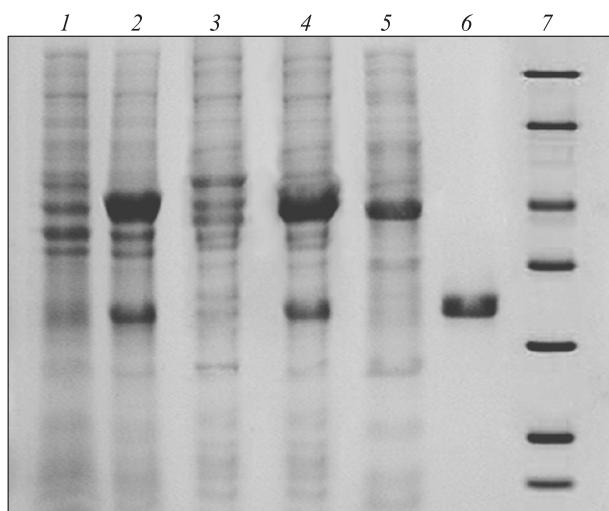
В результате выделения фермента в нативных условиях из клеток, инкубированных в течение 5

Таблица 1

Сравнение кодонов гена «дикого типа» *TEVp* (gi M15239.1 (TEVGEN:6256-6981)) и оптимизированного гена

Позиция а. о.	а. о.	Кодоны гена «дикого типа»	Кодоны оптимизированного гена
4	Leu	TTG – 12.9	CTG – 45.8
8	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
14	Ile	ATA – 8.3	ATT – 29.7
15	Ser	TCG – 8.5	AGC – 15.0
17	Thr17Ser	ACC – 21.3	AGC – 15.0
19	Cys	TGT – 5.4	TGC – 6.0
28	His	CAC – 8.8	CAT – 12.5
31	Ser	TCG – 8.5	AGC – 15.0
39	Pro	CCC – 5.6	AGC – 19.3
46	His	CAC – 8.8	CAT – 12.5
49	Arg	AGA – 4.5	CGC – 18.3
50	Arg	AGA – 4.5	CGC – 18.3
60	Leu	CTA – 4.5	CTG – 45.8
68	Asn68Asp	AAC – 21.1	GAC – 18.8
75	His	CAC – 8.8	CAT – 12.5
77	Ile77Val	ATT – 29.7	GTG – 23.4
80	Arg	AGG – 2.6	CGC – 18.3
83	Ile	ATA – 8.3	ATT – 29.7
88	Pro	CCT – 8.0	CCG – 19.3
92	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
93	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
95	Pro	CCT – 8.0	CCG – 19.3
101	Arg	AGA – 4.5	CGC – 18.3
103	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
109	Ile	ATA – 8.3	ATT – 29.7
110	Cys	TGT – 5.4	TGC – 6.0
133	Pro	CCT – 8.0	CCG – 19.3
138	Ile	ATA – 8.3	ATT – 29.7
151	Cys	TGT – 5.4	TGC – 6.0
154	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
159	Arg	AGA – 4.5	CGC – 18.3
166	Ile	ATA – 8.3	ATT – 29.7
167	His	CAC – 8.8	CAT – 12.5
170	Ser	TCG – 8.5	AGC – 15.0
203	Arg	CGA – 4.1	CGC – 18.3
219	Ser219Val	AGC – 15.0	GTG – 23.4
221	Pro	CCT – 8.0	CCG – 19.3
223	Glu	GAG – 18.8	GAA – 37.9
224	Pro	CCT – 8.0	CCG – 19.3
227	Pro	CCA – 8.7	CCG – 19.3
241	Ser	TCG – 8.5	AGC – 15.0

*Примечание.* В таблице указаны только те кодоны, которые были изменены относительно гена «дикого типа». Позиция аминокислоты обозначает позицию аминокислоты в ферменте, кодируемом геном «дикого типа». Частота встречаемости кодонов приведена на 1000 кодонов для генома *E. coli*.



**Рис. 1.** Фрагмент электрофореграммы белковых образцов на различных стадиях выделения TEVp из клеток, содержащих плазмиду pD441-MBP-TEVp. Дорожки: 1 – лизат клеток, инкубированных без добавления индуктора (контроль); 2 – лизат клеток, инкубированных с индуктором 0,5 мМ (биомасса для выделения белка); 3 – фракция клеточного дебриса после разрушения ультразвуком; 4 – фракция супернатанта после разрушения клеток ультразвуком (лизат); 5 – фракция после прохождения лизата колонки со смолой; 6 – очищенный фермент TEVp, фракция, элюированная 250 мМ имидазолом; 7 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овальбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции *Vsp98I* 25 кДа, бета-лактоглобулин 18,4 кДа, лизоцим 14,4 кДа (*Thermo Fisher Scientific, США*)

ч при 30 °С и концентрации индуктора 0,5 мМ, получено ~ 50 мг рекомбинантного белка из 1 л культуры клеток. Подвижность очищенного белка в ПААГ совпала с белковым бандом с молекулярной массой ~ 29 кДа (см. рис. 1, дорожки 2 и 6). Это свидетельствует о сохранении каталитической активности фермента в составе слитого полипептида MBP-TEVp, в результате чего он саморасщеплялся в клетке с высвобождением фермента TEVp (~ 29 кДа) и MBP (~ 41 кДа). При этом чистота полученного энзима достигала 90 %.

В литературе известны работы по оптимизации выхода растворимой формы TEVp с использованием различных приемов, в том числе слияние с MBP и/или оптимизация кодонов либо введение мутаций в ген *TEVp* (табл. 2).

Полученные нами результаты (выход 50 мг/л) совпадают с данными работы [11] для варианта клеток с мутантным геном A26 (выход 54 мг/л), содержащим четыре аминокислотные замены: T17S, N68D, I77V и S219N. Мы предполагали, что в нашей системе выход фермента будет более высоким; вероятно, разница объясняется различными экспрессирующими системами, поэтому сравнение результатов выхода фермента является не совсем корректным. В частности, в указанной работе использовался вектор с промотором T7, в нашем случае – T5, а в качестве хозяйского штамма авторы использовали клетки *Rosetta(DE3)* pLysS, которые синтезируют сравнительно редкие для *E. coli* транспортные РНК.

Из литературы известно сообщение, в котором авторы оптимизировали кодоны гена *TEVp* в аналогичном с нашим слитом варианте ге-

**Таблица 2**

Сравнение данных по количеству выделенного белка TEVp в нативных условиях из одного литра клеток *E. coli* при различных условиях экспрессии гена

Конструкция	Условия экспрессии гена <i>TEVp</i>	Количество белка
MBP-TEVp (настоящее исследование)	Шт. BL21(DE3), промотор – T5, вектор p441-mbp, инкубация клеток 5 ч при 30 °С	TEVp – 50 мг
MBP-TEVp [9]	Шт. BL21(DE3), промотор – T7, вектор pET30a, ген <i>TEVp</i> был оптимизирован, инкубация клеток 24 ч при 20 °С	TEVp (S219V) – 200 мг
6His-TEVp (настоящее исследование)	Шт. BL21(DE3), промотор – T7, вектор pET36b(+), инкубация клеток 18 ч при 22 °С	TEVp – 20 мг
6His-TEVp [12]	Шт. Rosetta(DE3), промотор – T7, вектор pET28a, инкубация клеток 12 ч при 28 °С	TEVp (S219V) – 80 мг; TEVpM1 – 108 мг
TEVp-6His [11]	Шт. Rosetta(DE3)pLysS, промотор – T7, вектор pTH24, инкубация клеток 20 ч при 20 °С	TEVp (S219N) – 9,9 мг; TEVp (A26) – 54 мг

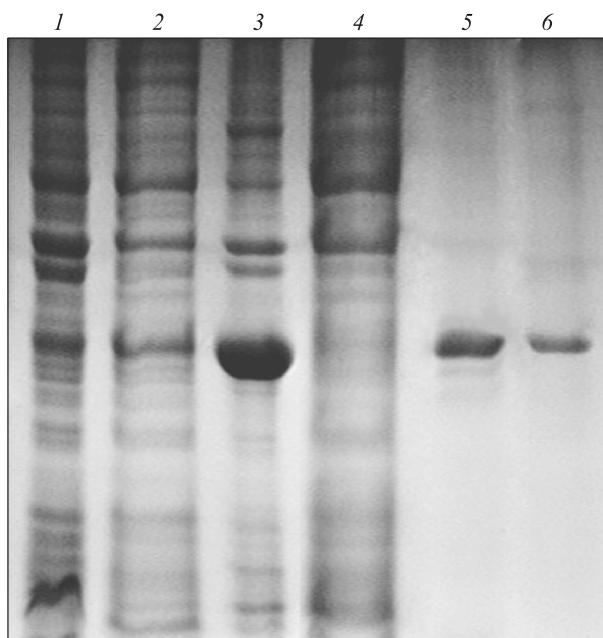
*Примечание.* 6His – 6 аминокислотных остатков гистидина, расположенных с N-конца фермента (6His-TEVp) либо с C-конца (TEVp-6His). TEVpM1 – вариант гена с мутациями T17S, N68D, I77V и S219V. A26 – вариант гена с мутациями T17S, N68D, I77V и S219N.

нов *MBP-TEVp* и достигли выхода фермента до 200 мг/мл [9]. К сожалению, в данной работе авторы не раскрывают, какие именно кодоны были оптимизированы. Из статьи следует, что были использованы клетки *E. coli* шт. BL21(DE3), вектор pET30a (промотор T7), а инкубирование проводили 24 ч при 20 °С.

Мы попытались воспроизвести условия, аналогичные указанным в работах [9, 11], – снизили температуру инкубирования до 20 °С и проводили его в течение ночи (~20 ч). Однако в результате такого эксперимента после выделения фермента примерно треть полипептида *MBP-TEVp* оставалась нерасщепленной (данные не приведены). Вероятно, это связано с тем, что оптимальная температура для работы фермента составляет 34 °С [8], и при понижении до 20 °С активность фермента падала настолько, что полипептид не успевал полностью проводить реакцию саморасщепления. Таким образом, в составе слитого полипептида *MBP-TEVp* оптимальными условиями для получения фермента в клетках-продуцентах при концентрации индуктора 0,5 мМ являлась температура инкубации 30 °С, а время инкубации составляло 4–5 ч.

Далее мы меняли модель и экспрессирующую систему. Для этого переклонировали ген *TEVp* в составе полученного нами ранее вектора pETm (модифицированный вариант pET36b(+)) [3]). Полученная экспрессирующая система (клетки *E. coli* шт. BL21(DE3) и вектор pETm) показала хороший результат даже при экспрессии неоптимизированных генов гетерологичных для *E. coli* белков – 20–50 мг/л клеток [1, 2]. А в случае оптимизированных генов получали до 200 мг/л даже при низких концентрациях ИПТГ (0,02–0,05 мМ) [4]. В данном векторе ген *TEVp* находился под контролем промотора T7 и не содержал фрагмента ДНК, кодирующего *MBP*. Рекомбинантный белок *TEVp*, синтезируемый в данной конструкции (pET-*TEVp*), содержал с N-конца 6 аминокислотных остатков гистидина. Предполагаемый размер такого полипептида составлял около 29 кДа.

В результате выделения фермента в нативных условиях из клеток, инкубированных в течение ночи (~18 ч) при комнатной температуре (~22 °С) и концентрации индуктора 0,5 мМ, было получено ~20 мг рекомбинантного белка из 1 л культуры клеток. Подвижность очищенного белка в ПААГ совпадала с ранее полученным ферментом из клеток с плазмидой pD441-*MBP-TEVp* (рис. 2, дорожки 5 и 6). На рис. 2 видно, что значительная часть белка после разрушения клеток ультразвуком и осаждения дебриса оставалась в осадке (дорожки 2 и 3), т. е. в нерастворимой фракции,



**Рис. 2.** Фрагмент электрофореграммы белковых образцов на различных стадиях выделения *TEVp* из клеток, содержащих плазмиду pET-*TEVp*. Дорожки: 1 – лизат клеток, инкубированных с индуктором 0,5 мМ (биомасса для выделения белка); 2 – фракция супернатанта после разрушения клеток ультразвуком (лизат); 3 – фракция клеточного дебриса после разрушения ультразвуком; 4 – фракция после прохождения лизатом колонки со смолой; 5 – очищенный фермент *TEVp*, фракция, элюированная 250 мМ имидазолом; 6 – фермент *TEVp*, выделенный из клеток, содержащих плазмиду pD441-*MBP-TEVp*

в отличие от белка, продуцируемого клетками с плазмидой pD441-*MBP-TEVp* (см. рис. 1, дорожка 3). Вероятно, основная часть фермента в клетках, содержащих плазмиду pET-*TEVp*, накапливалась в клетках в виде телец включения.

Изменение условий инкубации клеток, в том числе снижение концентрации ИПТГ до 0,05 мМ с целью уменьшения сверхэкспрессии гена, не привело к увеличению цитоплазматической растворимости белка. Таким образом, можно сделать вывод, что удаление из нашей конструкции *MBP-TEVp* домена *MBP* значительно снизило растворимость *TEVp* в клетке и, как следствие, уменьшило выход фермента при выделении его в нативных условиях примерно в 2,5 раза.

Количество выделенного белка в нативных условиях оказалось больше, чем при использовании гена «дикого типа» [6] или с мутацией S219N [11], но было меньше, чем при использовании других мутаций в гене *TEVp* (см. табл. 2), – в частности, в случае гена *TEVp* (A26) с тремя

аналогичными мутациями (T17S, N68D и I77V) (в 2,5 раза) [11], а также гена *TEVpMI* с четырьмя аналогичными мутациями (T17S, N68D, I77V и S219V) [12]. Вероятными причинами отличий в выходе рекомбинантного фермента могут служить различия в экспрессирующих системах (разные штаммы клеток), а также условия выращивания биомассы для выделения белка. Вторая наиболее вероятная причина может заключаться в оптимизации гена *TEVp*. В нашей работе было сделано 37 синонимических замен кодонов гена, в том числе 7 замен кодона аргинина (R49, R50, R80, R101, R105, R159 и R203). Следует заметить, что недавно опубликована работа, в которой показано, что замена трех и более кодонов аргинина в гене фермента приводила к значительному увеличению синтеза клетками белка, но при этом доля его цитоплазматической растворимой фракции снижалась в несколько раз относительно исходного гена [5]. Более того, авторы данной работы исследовали 15 различных вариантов гена с измененными кодонами аргинина и обнаружили, что: а) имеет значение, в какой именно позиции будет заменен аргинин; б) при экспрессии одного и того же гена в различных штаммах клеток (сравнивались BL21(DE3) и Rosseta (DE3)) цитоплазматическая растворимость TEVp отличается; в) не всегда увеличение растворимости фермента TEVp увеличивает его каталитическую активность. Таким образом, можно предположить, что нами проведена избыточная оптимизация гена, которая привела к снижению цитоплазматической растворимости фермента, что и привело к уменьшению выхода белка при выделении в нативных условиях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы на основе клеток *E. coli* шт. BL21(DE3) получены продуценты рекомбинантного фермента TEVp как в свободном варианте, так и в составе полипептида MBP-TEVp с выходом белка 20 и 50 мг/л культуры клеток соответственно. Данный результат был достигнут за счет оптимизации 37 кодонов гена *TEVp* для экспрессии в клетках *E. coli*, слиянии фермента с мальтозосвязывающим белком и заменой 4 аминокислот (T17S, N68D, I77V и S219V). Выход фермента при выделении в нативных условиях при сравнении с литературными данными оказался выше, чем в клетках с геном «дикого типа», но был ниже по сравнению с экспрессией гена с аналогичными мутациями. Вероятно, это снижение было обусловлено избыточной опти-

мизацией гена *TEVp*. Полученные данные на примере *TEVp* показывают, что оптимизация гена для его экспрессии в клетках *E. coli* не гарантирует увеличение продукции соответствующего белка в цитоплазматической растворимой форме.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Караваев В.С., Рябенко А.В., Беклемишев А.Б. Иммунохимический анализ рекомбинантного белка FlaA западно-сибирского изолята *Borrelia garinii* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. (4). 66–71.
2. Караваев В.С., Рябенко А.В., Беклемишев А.Б. Оценка значимости рекомбинантного белка DbpB спирохет *Borrelia garinii* для серодиагностики Лайм-боррелиоза // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. (3). 73–79.
3. Рябенко А.В., Караваев В.С., Беклемишев А.Б. Сравнительный структурный и иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов OspC новосибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* // Бюл. СО РАМН. 2010. (2). 6–12.
4. Рябенко А.В., Котова М.В., Поляков Л.М. Конструирование суперпродуцента рекомбинантного аполипопротеина А-I человека на основе клеток *Escherichia coli* // Сиб. науч. мед. журн. 2015. (6). 16–21.
5. Fang J., Zou L., Zhou X. et al. Synonymous rare arginine codons and tRNA abundance affect protein production and quality of TEV protease variant // Plos One. 2014. (11). e112254.
6. Kapust R.B., Tozser J., Fox J.D. et al. Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency // Prot. Eng. 2001. (12). 993–1000.
7. Lucast L.J., Batey R.T., Doudna J.A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease // Biotechniques. 2001. (3). 544–546.
8. Nallamsetty S., Kapust, R.B., Tozser J. et al. Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro // Protein Expr. Purif. 2004. (1). 108–115.
9. Sun C., Liang J., Shi R. et al. Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives // Protein Expr. Purif. 2012. (1). 226–231.
10. Tropea J.E., Cherry S., Waugh D.S. Expression and purification of soluble his6-tagged TEV protease // Methods Mol. Biol. 2009. 498. 297–307.
11. Van den Berg S., Lofdahl P., Hard T. et al. Improved solubility of TEV protease by directed evolution // J. Biotechnol. 2006. (3). 291–298.
12. Wei L., Cai X., Qi Z. et al. In vivo and in vitro characterization of TEV protease mutants // Protein Expr. Purif. 2012. (2). 157–163.

## CODON OPTIMIZATION OF GENE OF TOBACCO ETCH VIRUS PROTEASE FOR EXPRESSION IN *E. COLI* CELLS

Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Mariya Vladimirovna KOTOVA,  
Lev Mikhaylovich POLYAKOV

*Institute of Biochemistry*  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

---

The article presents data on codon optimization of gene of tobacco etch virus protease (TEVp) to increase the production of enzyme in *E. coli* cells. 37 synonymous mutations into rare codons and 4 mutations (T17S, N68D, I77V, S219V) were made in *TEVp* gene. The gene was cloned into the vector as the fused sequence with the gene of maltose-binding protein (MBP) and without it. The results of protein purification under native conditions from producer cells revealed that the greatest amount of enzyme was obtained with the construction of fusion genes *MBP-TEVp*.

---

**Key words:** tobacco etch virus protease, TEVp, recombinant protein, codon optimization, *E. coli*.

*Ryabchenko A.V.* – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: borrelia@mail.ru

*Kotova M.V.* – postgraduate student of laboratory of medical biotechnology, e-mail: zerokiri@mail.ru

*Polyakov L.M.* – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of medical biotechnology, e-mail: plm@niibch.ru

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В КАЧЕСТВЕ ТРАНСПОРТНОГО СРЕДСТВА ПЛАЗМИДНЫХ ДНК НА МОДЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ ЛИМФОБЛАСТОВ

Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Мария Владимировна КОТОВА,  
Лев Михайлович ПОЛЯКОВ

НИИ биохимии

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе представлен материал по исследованию возможности трансфекции *in vitro* клеток опухолевых лимфоцитов линии U937 с помощью аполипопротеина А-I (апо А-I). Клетки трансфицировали векторами, экспрессирующими в клетках животных ген зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*) и ген *gfp*, слитый с геном *APOA1* человека. В работе показано проникновение ФИТЦ-меченного апо А-I в клетки опухолевых лимфоцитов, однако ни с одним из используемых векторов положительных результатов трансфекции обнаружено не было.

**Ключевые слова:** аполипопротеин А-I, трансфекция, лимфоциты, *gfp*.

В настоящее время продолжается поиск и изучение макромолекул, связывающих гормоны и другие биологически активные соединения в надежде выявить специфические метаболические пути их доставки и попадания в клетки организма. Одной из таких транспортных форм являются липопротеины плазмы крови [5]. Показано, что наиболее перспективны в качестве переносчиков липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и их основной белковый компонент – аполипопротеин А-I (апо А-I), способный образовывать комплексы с целым спектром биологически активных веществ [4, 14, 19]. Практически все клетки организма имеют на мембранах специфические рецепторы к апо А-I [11, 12], это и послужило поводом для создания искусственных липосом, где апо А-I является лигандом при распознавании их клетками [15, 17, 20]. В последнее время появились работы, свидетельствующие о возможности использования липопротеинов и их белкового компонента в качестве транспортеров генетического материала. С помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258 показана ДНК-связывающая активность различных классов липопротеинов плазмы крови крыс и человека. Оказалось, что не менее 12 % внеклеточной ДНК циркулирует в плазме крови в составе комплексов с липопротеинами, из них 7–8 % – с ЛПВП [10]. Основная роль в процессе взаимодействия

внеклеточной ДНК с частицами ЛПВП, вероятно, принадлежит их структурному белковому компоненту апо А-I. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение возможности трансфекции клеток плазмидными ДНК с помощью апо А-I на модели клеток млекопитающих – опухолевых лимфоцитов линии U937.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Выделение и очистку нативного апо А-I* из плазмы крови человека проводили по методике, описанной в работе [6]. Рекомбинантный апо А-I получали из клеток продуцента, сконструированного ранее в нашей лаборатории. Клетки *Escherichia coli* разрушали ультразвуком, белок из клеточного лизата выделяли с помощью аффинной хроматографии на сорбенте «Ni-NTA Superflow» («Qiagen», США) с последующим отщеплением лидерной последовательности, как описано в работе [7]. Качество белков анализировали в 12%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Леммли. Белки обессоливали общепринятым методом диализа против фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,4–7,5 и стерилизовали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,22 мкм «Syringe-DivenFilters» («JetBiofilm», Корея). Стерильные чистые белки хранили при 4 °C либо замораживали.

*Рябченко А.В.* – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: borrelia@mail.ru

*Котова М.В.* – аспирант лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: zerokiri@mail.ru

*Поляков Л.М.* – д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru

Спектрофотометрические измерения проводили в ЦКП «Спектрометрические измерения» на базе ФГБНУ НИИ биохимии, г. Новосибирск. Концентрацию белков и ДНК измеряли на спектрофотометре Evolution 300 («Thermo Scientific», США) при  $\lambda = 280$  и  $260$  нм соответственно. Флуориметрические измерения конъюгата «апо А-1 – ФИТЦ» выполняли на спектрофлуориметре RF-5301PC («Shimadzu», Япония).

Получение и очистка плазмидных ДНК. Плазмиды для трансфекции содержали ген *gfp* под контролем раннего промотора цитомегаловируса рTagGFP2-С размером ~4700 пар нуклеотидов (п. н.) («Евроген», Россия). Второй вариант плазмиды был аналогичным и содержал рекомбинантную ДНК со слитыми генами *gfp* и *APOA1* человека размером ~5450 п. н. Плазмиды нарабатывали в клетках *E. coli*, штамм *recA*– «NovaXGF» («Novagen», США), в среде LB в присутствии 30 мкг/мл канамицина. Плазмиды выделяли из клеток набором «PlasmidMidiprep» («Евроген», Россия) согласно инструкции. Качество плазмид и анализ фрагментов ДНК размером от 500 до 6000 п.н. осуществляли методом электрофореза в геле агарозы с последующим окрашиванием ДНК бромистым этидием.

Ампликон гена апо А-1 получали с помощью ПЦР. Для ПЦР использовали набор реагентов с *Taq*-полимеразой («Евроген», Россия). Состав реакционной смеси использовали согласно инструкции к набору. Матрицей для ПЦР служила плазмидная ДНК рЕТ-апоА-1, выделенная из клеток-продуцентов рекомбинантного белка апо А-1. Температура отжига праймеров первых пяти циклов составляла 58 °С, последующие циклы – 65 °С, общее количество циклов – 30. Праймеры для амплификации гена *APOA1*: прямой (смысловый) 5'-GATGATCCGCCGAGAGC-3'; обратный (антисмысловый) 5'-CTGGGTGTTTCAGCTTCTTAG-3'. Концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 0,1 пмоль/мкл, объем реакционной смеси – 50 мкл.

Получение конъюгата «апо А-1 – ФИТЦ». Конъюгат «апо А-1 – ФИТЦ» получали путем инкубирования белков с ФИТЦ в течение ночи в карбонатном буфере рН 9,5 в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ на 1 мг белка. Конъюгат от непрореагировавшего ФИТЦ отделяли с помощью гель-фильтрации на Sephadex G25 (1 мг белка на 10 мл смолы, высота колонки 10 см). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 («LKB», Швеция) при длине волны 280 нм. Образование конъюгата в полученных хроматографических фракциях подтверждали анализом в полиакриламидном геле, а также на спектрофлуориметре на наличие характерных для ФИТЦ

пиков возбуждения (490 нм) и эмиссии (520 нм). Полученный конъюгат использовали для инкубирования с клетками.

Работа с культурой опухолевых клеток млекопитающих. В качестве модели клеток млекопитающих использовали опухолевые лимфобласты линии U937, любезно предоставленные А.В. Чечушковым (НИИ экспериментальной и клинической медицины, г. Новосибирск). Клетки выращивали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), рН 7,4, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина. Инкубирование проводили на 24-луночных планшетах («OrangeScientific», США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Cole-Parmer», США) в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % воздуха, при температуре 37 °С. Клетки снимали с планшетов 0,25 % раствором трипсина, жизнеспособность оценивали методом исключения трипанового синего («Serva», Германия). Музейные образцы клеток хранили в жидком азоте в среде RPMI-1640 с добавлением 40 % эмбриональной сыворотки коров и 10 % диметилсульфоксида.

Клетки инкубировали с комплексом «апо А-1 – ФИТЦ» после достижения конfluентности культурой клеток в лунках на уровне 50–60 %. Инкубирование клеток с трансфицирующими реагентами (комплексами пДНК с апо А-1 и липофектаминам (Lipofectamine 2000)) проводили после достижения конfluентности культурой клеток в лунках 80–90 %. За основу метода трансфекции был взят протокол, прилагаемый фирмой-производителем липофектамина («Invitrogen:LifeTechnologies», США). На одну лунку использовали 0,5 мкг ДНК и разное количество Lipofectamine 2000 – 1, 2 и 4 мкл; инкубирование ДНК и Lipofectamine 2000 проводили в 50 мкл бессывороточной среды в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего раствор добавляли в лунку планшета. В случае использования апо А-1 к 0,5 мкг ДНК добавляли разное количество апо А-1 (от 0,5 до 5 мкг), смесь инкубировали в растворе ФСБ при комнатной температуре в течение 20–30 мин и добавляли в лунку планшета. На следующие сутки инкубационную среду меняли на свежую, не содержащую трансфицирующих реагентов.

Для визуального анализа флуоресценции клеток использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 40 CFL («Zeiss», Германия). На вторые сутки после трансфекции клетки анализировали визуально. Уровень трансфекции оценивали как отношение количества флуоресцирующих клеток к общему количеству клеток, наблюдаемых в микроскопическом поле (не менее 20 полей для каждого образца). Резуль-

таты статистически обрабатывались и представлены в процентах как среднее значение и ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе работ было исследовано предположение о проникновении апо А-I в клетки опухолевых лимфобластов. Для этого был получен конъюгат апо А-I с флуоресцирующим красителем ФИТЦ. Для получения конъюгата использовался рекомбинантный и нативный апо А-I. Исследовались следующие концентрации конъюгата: 5, 15, 50 и 150 мкг/мл. Клетки инкубировались с конъюгатом в течение 20 ч, затем отмывались дважды раствором ФСБ и анализировались на инвертированном флуоресцентном микроскопе. Светящиеся клетки интерпретировались как поглотившие конъюгат. Типичный пример результата инкубирования клеток линии U937 с конъюгатом представлен на рисунке.

Для подсчета числа светящихся клеток использовалось 20 микроскопических полей. Результаты представлены в таблице, где доля светящихся клеток выражена в процентах относительно общего количества клеток. Следует отметить, что в образцах клеток, инкубированных с концентрацией конъюгата 150 мкг/мл, их монослой был значительно разрежен относительно других образцов. Вероятно, при такой высокой концентрации апо А-I (150 мкг/мл) клетки теряли способность крепиться на культуральной планшете и отлипали от поверхности. В связи с этим не представлялось возможным достоверно произвести расчет снимков с концентрацией конъюгата 150 мкг/мл, поэтому данные с этой концентрацией в таблице не приведены.

Результаты инкубирования клеток с конъюгатом показали, что наибольшее количество светящихся клеток обнаруживалось при максимальной исследуемой концентрации 50 мкг/мл и составляло примерно 1/3 часть от их общего числа. Наличие 1/3 выраженных светящихся клеток от их общего количества служило прямым доказательством проникновения конъюгата в опухолевые лимфобласты. В контрольных клетках, ин-

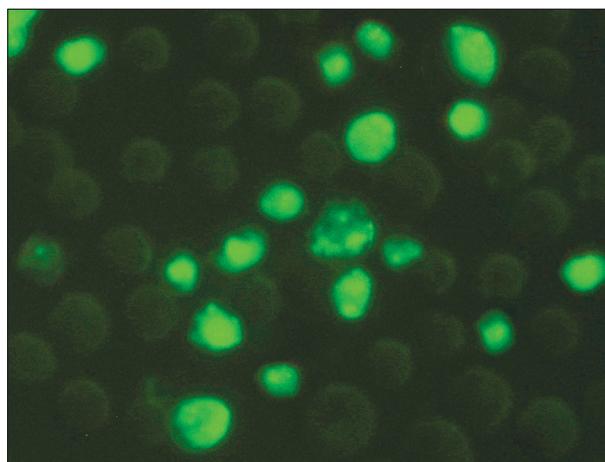


Рис. Флуоресцентная микроскопия клеток линии U937, инкубированных с конъюгатом 50 мкг/мл, в флуоресцентном режиме (ув.  $\times 40$ )

кубированных с апо А-I, подобного свечения не наблюдалось. Результаты также показывают, что количество светящихся клеток при использовании конъюгатов из нативного и рекомбинантного апо А-I было сходным, и достоверных различий в исследуемых концентрациях не обнаружено. Это говорит о схожести биологических свойств полученного рекомбинантного апо А-I с нативным белком. Поэтому дальнейшие эксперименты проводились на рекомбинантном варианте белка.

Подтверждение проникновения апо А-I в клетки U937 позволило перейти к следующему этапу, на котором мы исследовали способность апо А-I трансфицировать клетки U937. Для этого использовали плазмидные ДНК со встроенным геном зеленого флуоресцирующего белка *gfp* (1 вариант,  $\sim 4700$  п. н.) и слитыми генами *gfp-APOA1* (2 вариант,  $\sim 5450$  п.н.) под регуляторной областью раннего промотора цитомегаловируса. Ранее в нашем институте было показано, что апо А-I имеет сродство к GСС-богатым олигонуклеотидам [1, 18]. Путем анализа структуры гена апо А-I человека на примере известной кДНК [GenBank:AK292231.1] мы обнаружили в 3'-концевой области гена некоторое количество относительно сближенных GСС-триплетов. Расстояние между GСС-триплетами составляло от

Таблица

Доля светящихся клеток линии U937 (%) при инкубировании с различной концентрацией конъюгатов, приготовленных из нативного и рекомбинантного белков апо А-I с ФИТЦ

Тип конъюгатов	Концентрация конъюгата, мкг/мл		
	5	15	50
Рекомбинантный апо А-I – ФИТЦ	$7,2 \pm 0,8$	$12,8 \pm 2,1$	$31,2 \pm 3,5$
Нативный апо А-I – ФИТЦ	$7,8 \pm 0,7$	$13,1 \pm 1,8$	$32,5 \pm 2,7$

двух до восьми нуклеотидов. Это позволило нам предположить, что с таким вариантом плазмиды взаимодействие белка апо А-I будет более специфичным, как и в случае с GСС-богатыми олигонуклеотидами.

Для образования комплекса «пДНК – апо А-I» компоненты инкубировали в ФСБ при комнатной температуре в течение 20–30 мин, затем смесь добавляли к клеткам. Исследовались различные соотношения пДНК и апо А-I по массе от 1:1 до 1:10. Количество пДНК составляло от 0,5 до 5 мкг на ~ 200 000 клеток. В качестве отрицательного контроля клетки инкубировали с пДНК в отсутствие апо А-I, в качестве положительного контроля трансфекцию проводили с теми же препаратами пДНК с липофектаминол. На следующие сутки после 24 ч инкубирования проводили микроскопический анализ клеток. Через каждые сутки инкубационная среда менялась на свежую, не содержащую трансфицирующих реагентов. Общее время инкубирования клеток не превышало трех суток.

В результате экспериментов наблюдались флуоресцирующие клетки U937, экспрессирующие гены *gfp* и *gfp* – *APOA1* только с липофектаминол. Уровень трансфекции был низким и не превышал 5–10 %, в зависимости от количества используемой пДНК. Максимальный уровень флуоресцирующих клеток (~10 %) был обнаружен при соотношении пДНК : липофектамин, равном 1 мкг : 3 мкл и общем количестве пДНК 5 мкг. Дальнейшее увеличение количества пДНК, а также увеличение количества липофектамина в соотношении пДНК : липофектамин не приводило к росту уровня трансфекции, но заметно снижало выживаемость клеток. Низкий уровень трансфекции клеток U937 согласуется с литературными данными [16], в которых подчеркивается сложность данного объекта для трансфекции липофектамин-подобными препаратами [21].

В клетках, инкубированных с комплексами «пДНК – апо А-I», количество флуоресцирующих клеток не отличалось от отрицательного контроля – клетках, инкубированных только с пДНК. Количество светящихся клеток, инкубированных с комплексами «пДНК – апо А-I», не превышало 0,5 %, достоверного отличия от контрольных образцов не обнаружено. Это говорит о том, что комплексы «пДНК – апо А-I» в исследованных соотношениях не проникали в клетки и/или ядра клеток U937. Следует отметить, что ранее в НИИ биохимии в подобных экспериментах на клетках асцитной карциномы Эрлиха нами также были получены аналогичные отрицательные результаты [8]. Их вероятной причиной могли быть: а) «громоздкость» комплекса «пДНК – апо А-I»,

что делало невозможным его перенос в клетку и/или ядра клеток; б) недостаточное специфическое связывание апо А-I с пДНК для формирования стабильных комплексов или распад (диссоциация) комплексов «пДНК – апо А-I» в инкубационной среде. Однако, учитывая литературные данные об успешной трансфекции клеток млекопитающих с помощью различных гистоновых белков [9], можно предположить, что в нашем случае «громоздкость» комплексов «пДНК – апо А-I» не является лимитирующим фактором для успешной трансфекции.

Для проверки предположения о недостаточном специфическом связывании апо А-I с пДНК мы исследовали взаимодействие ДНК с апо А-I методом ретардации фрагментов ДНК в агарозном геле. В случае образования комплексов «белок – ДНК» они в электрическом поле задерживаются в геле (движутся медленнее) относительно свободных молекул ДНК. Данный метод используется для определения специфичности связывания различных белков с ДНК, например, искусственных полипептидов [3] и гистоновых белков [13].

В качестве ДНК использовалась плазида, содержащая слитые гены *gfp* и *APOA1* (2-й вариант, ~5450 п. н.) и ампликон гена *APOA1* (~750 п. н.). Ампликон гена *APOA1* в препаративных количествах получали методом ПЦР, очищали от белковых компонентов в реакционной смеси фенол-хлороформной экстракцией с последующим осаждением ДНК этанолом. Исследовались два варианта апо А-I – нативный и рекомбинантный. При анализе соотношение ДНК/белок по массе варьировалось от 1:1 до 1:200, количество ДНК на дорожку составляло ~100 нг. При анализе использовалась различная концентрация агарозы в геле (0,5, 1,0 и 1,5 %). ДНК и белок смешивали в растворе ФСБ и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем к образцам добавляли 1/10 часть 80%-го глицерина и наносили в карманы геля. Пробег образцов составлял 10–12 см. После окончания электрофореза ДНК окрашивали путем экспозиции геля в растворе бромистого этидия. Результаты анализа показали, что ампликон гена *APOA1* и пДНК в присутствии белка апо А-I не изменяли скорости движения в электрическом поле относительно контрольных образцов, содержащих ДНК без белка (результаты электрофореза не приведены). Согласно работе [2], сродство апо А-I к олигонуклеотидам увеличивалось в присутствии тетрагидрокортизола, поэтому мы провели соответствующий анализ (использовался двукратный молярный избыток тетрагидрокортизола). Для этого предварительно инкубировали апо А-I с тетрагидрокортизолом, затем к комплек-

су добавляли ампликон гена *APOA1* (массовое соотношение ДНК/белок составило 1:10). Смесь, предположительно содержащую комплекс «тетрагидрокортизол – апо А-I – пДНК», анализировали в агарозном геле аналогично предыдущим экспериментам. В результате анализа мы не обнаружили различий между подвижностью исследуемых и контрольных образцов. По литературным данным, гистоновые белки или их фрагменты, успешно трансфицирующие клетки, вызывают задержку фрагментов ДНК в геле уже при массовом отношении ДНК : белок, равном 1 : 0,5 [13]. В наших экспериментах изменения в подвижности не были обнаружены даже при избыточном отношении белка. На основании этих результатов мы сделали вывод об отсутствии взаимодействия белка апо А-I (как рекомбинантной, так и нативной формы) с исследуемыми молекулами ДНК.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана способность рекомбинантного и нативного белка апо А-I, меченного флуоресцентной меткой ФИТЦ, проникать в клетки опухолевых лимфобластов линии U937. На модели клеток U937 установлено, что апо А-I не способен трансфицировать пДНК в клетки эукариот. Методом ретардации фрагментов ДНК в агарозном геле на примере плазмидной ДНК и ампликона гена *APOA1* показано отсутствие специфического взаимодействия апо А-I с молекулами ДНК. Вероятно, это и является причиной неспособности использования апо А-I в качестве транспортной формы генетического материала в клетки эукариот.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гимаутдинова О.И., Базалук В.В., Кузнецов П.А. и др. Влияние первичной структуры ДНК на связывание с комплексом «тетрагидрокортизол–апоА-I»: роль образовавшихся аддуктов в транскрипции и копировании // Сиб. науч. мед. журн. 2010. (2). 23–27.
2. Гимаутдинова О.И., Кузнецов П.А., Тузилов Ф.В. и др. Сайты взаимодействия ДНК эукариот с комплексами аполипопротеин А-I–стероидный гормон // Сиб. науч. мед. журн. 2007. (5). 33–37.
3. Гурьянов И.А., Власов Г.П., Лесина Е.А. и др. Катионные олигопептиды, модифицированные липофильными фрагментами: использование для доставки ДНК в клетку // Биоорган. химия. 2005. (1). 22–30.
4. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Усынин И.Ф. и др. Влияние кортикостероидов в комплексе с аполипопротеином А-I на биосинтез белка в культуре гепатоцитов // Пробл. эндокринологии. 2009. (3). 45–47.
5. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеины высокой плотности и аполипопротеин А-I: регуляторная роль и новые терапевтические стратегии лечения атеросклероза // Атеросклероз. 2013. (1). 42–53.
6. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А. и др. Анализ взаимодействия липопротеинов и стероидных гормонов // Биомед. химия. 2011. (3). 308–313.
7. Рябченко А.В., Котова М.В., Поляков Л.М. Конструирование суперпродукента рекомбинантного аполипопротеина А-I человека на основе клеток *Escherichia coli* // Сиб. науч. мед. журн. 2015. (6). 16–21.
8. Рябченко А.В., Твердохлеб Н.В., Князев Р.А. Клетки асцитной карциномы Эрлиха как модель для трансфекции *in vitro* // Фундамент. исслед. 2014. (5). 1213–1217.
9. Соловьева В.В., Кудряшова Н.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков // Клеточ. трансплантология и тканев. инженерия. 2011. (3). 29–40.
10. Суменкова Д.В., Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеины плазмы крови как транспортная форма внеклеточной ДНК // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2012. (11). 577–579.
11. Favre G., Blancy E., Tournier J.F. et al. Proliferative effect of high density lipoprotein (HDL) and HDL fractions (HDL1,2, HDL3) on virus transformed limfoblastoid cells // Biochim. Biophys. Acta. 1989. (2). 118–124.
12. Farve G., Tazi K., Le G. et al. High density lipoprotein3 bindings sites are related to DNA biosynthesis in the adenocarcinoma cell line A549 // J. Lipid. Res. 1993. (7). 1093–1106.
13. Jung H.J. Hwang D.S., Wei Q.D. et al. *Carassius auratus*-originated recombinant histone H1 C-terminal peptide as gene delivery material // Biotechnol. Prog. 2008. (1). 17–22.
14. Kader A., Pater A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little effect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells // J. Control Release. 2002. (1). 29–44.
15. Kratzer I., Werning K., Panzenboeck U. et al. Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an *in vitro* model of the blood-brain barrier // J. Control Release. 2007. (3). 301–311.
16. Martinet W., Schrijvers D.M., Kockx M.M. Nucleofection as an efficient nonviral method for human monocytic cells // Biotechnol. Lett. 2003. (13). 1025–1029.
17. Nakayama T., Butler J., Sehgal A. et al. Harnessing a physiologic mechanism for siRNA delivery with mimetic lipoprotein particles // Mol. Ther. 2012. (8). 1582–1589.
18. Panin L., Gimautdinova O., Kuznetsov P. et al. The mechanism of interacting biologically active complexes dehydroepiandrosterone- or tetrahydrocor-

tisol-apolipoprotein A-I with DNA and their role in enhancement of gene expression and protein biosynthesis in hepatocytes // *Curr. Chem. Biol.* 2011. (1). 9–16.

19. Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Knyazev R.A. *et al.* The analysis of interaction of lipoproteins and steroid hormones // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Series B: Biomed. Chem.* 2010. (4). 362–365.

20. Rui M., Tang H., Li Y. *et al.* Recombinant high density lipoprotein nanoparticles for target-specific delivery of siRNA // *Pharm. Res.* 2013. (5). 1203–1214.

21. Tietz S.M., Berghoff M. Gene silencing of MK2 in hard-to-transfect human U937 cells // *J. Biomol. Tech.* 2012. (2). 47–50.

## **STUDY OF APOLIPOPROTEIN A-I AS A CARRIER OF PLASMID DNA ON TUMOR LYMPHOBLASTS MODEL**

**Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Mariya Vladimirovna KOTOVA,  
Lev Mikhaylovich POLYAKOV**

*Institute of Biochemistry  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

---

The paper presents the study of the transfecting cells possibility in vitro tumor lymphoblasts of line U937 using apolipoprotein A-I (apoA-I). Cells were transfected with vectors expressing in animal cells the gene of green fluorescent protein (gfp) and GFP gene fused with a gene of human apoA-I. The paper shows the penetration of FITC-labeled apoA-I into tumor cells of lymphoblasts, however, the positive results was not revealed with any of the vectors used in the transfection.

---

**Key words:** apolipoprotein A-I, transfection, lymphoblasts, *gfp*.

*Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: borrelia@mail.ru*

*Kotova M.V. – postgraduate student of laboratory of medical biotechnology, e-mail: zerokiri@mail.ru*

*Polyakov L.M. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of medical biotechnology, e-mail: plm@niibch.ru*

## ТИМУС ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

**Олег Васильевич КАЗАКОВ, Алексей Васильевич КАБАКОВ, Александр Федорович ПОВЕЩЕНКО, Александр Петрович ЛЫКОВ, Татьяна Владимировна РАЙТЕР, Дмитрий Николаевич СТРУНКИН, Ирина Юрьевна ИЩЕНКО, Светлана Викторовна МИЧУРИНА, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ**

*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Проведено гистологическое исследование преобразований в тимусе при оперативном удалении опухоли молочной железы (через 6 месяцев от начала эксперимента), индуцированной интрамаммарным введением N-метил-N-нитрозомочевины самкам крыс Wistar. Выявлены структурные признаки формирования акцидентальной инволюции, проявляющейся в менее выраженной форме, чем в группе с опухолью молочной железы без лечения. Сочетание удаления опухоли молочной железы и химиотерапии по сравнению с группой с удалением опухоли молочной железы без химиотерапии вызывает более выраженную инволюцию тимуса, характеризующуюся повышением миграции лимфоцитов из тимуса, делимфотизацией морфофункциональных зон паренхимы тимуса.

**Ключевые слова:** тимус, лимфоциты, онкология, рак, оперативное лечение, профилактическое лечение.

Рак молочной железы – самая широко диагностируемая онкопатология и частая причина смертности у женщин в большинстве стран мира [18]. При обширном метастатическом поражении основным, а зачастую и единственным методом лечения является системная противоопухолевая терапия, которая усугубляет имеющийся дисбаланс в иммунной системе, оказывая повреждающее действие на лимфоидную ткань, что представляет собой одну из центральных проблем в химиотерапии опухолей [3, 8, 14, 18]. От морфофункционального состояния тимуса зависит поддержание гомеостаза в организме и обеспечение стабильности его антигенных структур. В литературе есть большое количество работ по изучению морфологии тимуса при разнообразной патологии, включая и опухолевый рост, и действие на него цитотоксических препаратов [15, 17, 19, 20]. Сведения, приведенные в литературе при лечении конкретных видов злокачественных опухолей, а также полученные нами данные о морфофункциональном состоянии тимуса при циторедуктивной

терапии, на наш взгляд, могут быть использованы для разработки новых методов коррекции, направленных на стимуляцию неспецифической резистентности организма. Это могло бы существенно оптимизировать традиционные схемы комплексной противоопухолевой терапии и увеличить продолжительность жизни пациентов.

Целью данного исследования было изучение структурных преобразований в тимусе при экспериментальной опухоли молочной железы (ОМЖ), после ее оперативного удаления и полихимиотерапии.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Исследование выполнено

*Казаков О.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: kazakoff\_oleg@mail.ru*

*Кабаков А.В. – научный сотрудник, e-mail: Doctor03-85@ngs.ru*

*Повещенко А.Ф. – д.м.н., зав. лабораторией, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru*

*Лыков А.П. – к.м.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: aplykov2@mail.ru*

*Райтер Т.В. – аспирант, e-mail: reitert@mail.ru*

*Стрункин Д.Н. – к.м.н., e-mail: strunkind@mail.ru*

*Ищенко И.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: irenisch@mail.ru*

*Мичурина С.В. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник, e-mail: s.michurina@ngs.ru*

*Коненков В.И. – д.м.н., проф., академик РАН, директор, e-mail: konenkov@soramn.ru*

на 80 самках крыс Wistar (возраст 3 месяца на начало эксперимента, вес 250–300 г). Было сформировано четыре группы животных: 1-я – интактные крысы (контроль) ( $n = 20$ ) (возраст 9,5 мес.); 2-я – крысы с экспериментальной ОМЖ ( $n = 20$ ), индуцированной интрамаммарным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma-Aldrich, США); 3-я – крысы после хирургического удаления ОМЖ, операция проводилась под наркозом (40 мг/кг нембутала внутривенно; Sigma-Aldrich, США) через 6 месяцев от начала индукции канцерогеном в молочную железу ( $n = 20$ ); 4-я группа – крысы после хирургического удаления ОМЖ и последующим курсом полихимиотерапии ( $n = 20$ ). Модель ОМЖ создавалась путем введения N-метил-N-нитрозомочевины 5 раз с интервалом в 7 дней подкожно в область одной и той же молочной железы (2-я молочная железа справа) [4, 9]. Курс полихимиотерапии включал в себя: 5-фторурацил (Ebewe, Австрия) из расчета 15 мг/кг внутривенно на 1-й и 8-й день курса терапии; метотрексат (Ebewe, Австрия) из расчета 2,5 мг/кг внутривенно на 1-й и 8-й день курса терапии; циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск) из расчета 3 мг/кг внутривенно ежедневно однократно 14 дней.

Животных из эксперимента выводили через 6,5 месяцев под нембуталовым наркозом. Для гистологического исследования забирали тимус, ОМЖ и фиксировали в растворе Теллесницкого, заливали в парафиновые блоки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Майеру и азуром II и эозином по Нохту – Максимуму [10]. Гистологические препараты изучали с помощью окулярной тестовой системы при увеличении 32, 400 и 1000 раз, морфометрию срезов и подсчет клеточных элементов в опухоли и структурно-функ-

циональных зонах тимуса проводили методом точечного счета. В тимусе подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади 2025 мкм<sup>2</sup>, дифференцировали бласты, средние и малые лимфоциты, незрелые и зрелые плазматические клетки, клетки с фигурами митоза, гбнущие клетки, эпителиальные клетки, макрофаги, моноциты, тучные клетки. Клетки тимуса подсчитывались в пяти зонах субкапсулярной, внутренней зоне коркового вещества, в кортико-медулярной зоне и центральном мозговом веществе. В ОМЖ определяли соотношение паренхимы и стромы, выраженность клеточного полиморфизма. Для всех морфологических данных вычисляли абсолютные и относительные показатели.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), и представляли в виде  $M \pm m$ . Различия между группами оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 6,5 месяцев от начала индукции N-метил-N-нитрозомочевинной в молочной железе развивается опухоль, по морфологии представляющая собой аденокарциному, в строении которой паренхима ( $60,5 \pm 1,7$  %) преобладает над стромой ( $39,5 \pm 1,2$  %). В тимусе при экспериментальной ОМЖ наблюдается уменьшение корково-мозгового соотношения на 15,3 % по сравнению с интактными животными. При этом относительная площадь коркового вещества уменьшается на 10 %, увеличивается площадь соединительнотканых структур (на 31,3 %), железистой

Таблица 1

Относительные площади структурно-функциональных зон тимуса в норме, при экспериментальной ОМЖ, оперативном удалении ЭОМЖ, полихимиотерапии, %

Структурно-функциональные зоны	Интактные животные (контроль)	Экспериментальная ОМЖ	Оперативное удаление экспериментальной ОМЖ	Оперативное удаление экспериментальной ОМЖ + химиотерапия
Корковое вещество	$57,7 \pm 0,84$	$52,0 \pm 1,0^*$	$48,97 \pm 1,32^*$	$49,29 \pm 0,67^*$
Мозговое вещество	$31,59 \pm 0,58$	$33,54 \pm 0,68$	$36,9 \pm 0,55^{\bullet}$	$38,5 \pm 0,64^{\bullet}$
Корково-мозговое соотношение	$1,83 \pm 0,05$	$1,55 \pm 0,04^*$	$1,33 \pm 0,04^{\bullet}$	$1,28 \pm 0,03^{\bullet}$
Соединительнотканые элементы	$10,32 \pm 0,45$	$13,55 \pm 0,43^*$	$13,71 \pm 0,34^{\bullet}$	$12,06 \pm 0,38^*$
Железистые структуры	$0,42 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,12^*$	$0,42 \pm 0,07^{\bullet}$	$0,18 \pm 0,04^{\bullet}$
Паренхиматозно-стромальное соотношение	$8,65 \pm 0,38$	$6,31 \pm 0,51^*$	$6,26 \pm 0,51^*$	$7,28 \pm 0,25^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от соответствующих показателей: \* – контроля,  $\bullet$  – животных с ОМЖ без лечения.

Таблица 2

Клеточный состав структурно-функциональных зон тимуса в норме, при экспериментальной ОМЖ, оперативном удалении ЭОМЖ, полихимиотерапии, %

Клеточные элементы	Интактные животные (контроль)	Экспериментальная ОМЖ	Оперативное удаление экспериментальной ОМЖ	Оперативное удаление экспериментальной ОМЖ + химиотерапия
Субкапсулярная зона коркового вещества				
Иммунобласты	4,96 ± 0,19	9,84 ± 0,61*	5,98 ± 0,11*•	8,9 ± 0,17*
Средние лимфоциты	11,32 ± 0,41	21,07 ± 1,16*	20,88 ± 0,68*	19,28 ± 0,47*
Малые лимфоциты	78,88 ± 3,28	61,65 ± 2,34*	64,26 ± 1,16*	61,0 ± 1,4*
Митоз	1,04 ± 0,08	3,03 ± 0,18*	2,47 ± 0,11*•	2,49 ± 0,1*•
Пикноз	0,65 ± 0,08	1,98 ± 0,15*	0,7 ± 0,09•	1,21 ± 0,07*•
Макрофаги	0,82 ± 0,07	0,97 ± 0,07	2,31 ± 0,07*•	1,98 ± 0,07*•
Эпителиальные клетки	2,33 ± 0,17	1,45 ± 0,16*	3,39 ± 0,09*•	5,14 ± 0,23*•
Центральная часть коркового вещества				
Иммунобласты	3,13 ± 0,14	5,66 ± 0,37*	2,95 ± 0,1•	6,7 ± 0,15*
Средние лимфоциты	9,33 ± 0,39	17,93 ± 1,26*	21,76 ± 0,65*•	20,07 ± 0,8*
Малые лимфоциты	82,73 ± 2,68	70,21 ± 1,98*	68,71 ± 1,55*	63,61 ± 1,17*•
Митоз	0,8 ± 0,06	1,8 ± 0,16*	1,08 ± 0,07*•	2,13 ± 0,1*
Пикноз	0,68 ± 0,09	2,04 ± 0,12*	0,34 ± 0,07*•	0,89 ± 0,08•
Макрофаги	0,58 ± 0,07	0,71 ± 0,06	1,72 ± 0,05*•	1,77 ± 0,1*•
Эпителиальные клетки	2,76 ± 0,12	1,64 ± 0,17*	3,45 ± 0,13*•	4,84 ± 0,15*•
Кортико-медуллярная зона				
Иммунобласты	3,12 ± 0,18	5,61 ± 0,4*	4,67 ± 0,17*	7,48 ± 0,16*•
Средние лимфоциты	8,67 ± 0,4	19,26 ± 0,73*	20,43 ± 0,87*	18,55 ± 0,6*
Малые лимфоциты	81,2 ± 1,3	66,3 ± 3,23*	64,47 ± 2,15*	60,14 ± 1,21*
Митоз	1,08 ± 0,07	1,91 ± 0,21*	1,73 ± 0,1*	2,46 ± 0,14*
Пикноз	0,89 ± 0,06	1,36 ± 0,15*	0,58 ± 0,09•	1,15 ± 0,13
Макрофаги	0,79 ± 0,07	1,34 ± 0,07*	2,47 ± 0,08*•	2,46 ± 0,1*•
Эпителиальные клетки	4,24 ± 0,17	4,24 ± 0,33	5,64 ± 0,24*•	7,76 ± 0,19*•
Центральная часть мозгового вещества				
Иммунобласты	3,1 ± 0,14	2,51 ± 0,38	0,22 ± 0,1*•	2,72 ± 0,14
Средние лимфоциты	12,95 ± 0,46	20,37 ± 0,81*	16,13 ± 0,71*•	22,1 ± 0,28*
Малые лимфоциты	73,68 ± 3,17	63,39 ± 2,37	62,97 ± 1,81*	52,52 ± 2,64*•
Митоз	0,68 ± 0,1	1,03 ± 0,19	0,07 ± 0,05*•	0,64 ± 0,11
Пикноз	0,86 ± 0,06	1,68 ± 0,18*	0,33 ± 0,1*•	0,6 ± 0,1•
Макрофаги	1,04 ± 0,1	2,41 ± 0,13*	5,07 ± 0,3*•	4,04 ± 0,22*•
Эпителиальные клетки	7,7 ± 0,24	8,6 ± 0,37*	15,21 ± 0,76*•	17,4 ± 0,31*•

структуры (в 2,2 раза) по сравнению с интактной группой (табл. 1). Полученные результаты согласуются с данными литературы, показывающими, что на поздних стадиях рака молочной железы в тимусе мышей выявлено нарушение функции стромы, уменьшение числа незрелых тимоцитов и увеличение их апоптоза, не отмечается угнетающего влияния на эндокринную функцию вилочковой железы [15]. Также авторы полагают, что подавление клеточно-опосредованных иммунных функций, возникающих у мышей на поздних стадиях рака молочной железы, может быть связано с инволюцией тимуса.

Выявленные нами структурные преобразования в тимусе при ОМЖ, вызванной N-метил-

N-нитрозомочевинной, могут свидетельствовать об его акцидентальной инволюции [2, 6]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, а именно уменьшением площади коркового вещества, снижением плотности расположения клеточных элементов во всех структурных компонентах тимуса (особенно в центральной части коркового вещества), уменьшением во всех исследуемых зонах тимуса количества малых лимфоцитов и увеличением числа клеток с пикнотическими ядрами (наиболее выраженное в подкапсулярной зоне и центральной части коркового вещества – в 3 раза) (табл. 2). Однако проведенное нами исследование на крысах с ОМЖ также выявило увеличение числа им-

мунобластов, средних лимфоцитов, митотически делящихся клеток в корковом веществе и в кортико-медуллярной зоне, увеличение числа макрофагов в кортико-медуллярной зоне и центральной части мозгового вещества – в 2,3 раза. Полученные данные указывают на усиление в тимусе процессов бласттрансформации и пролиферации, макрофагальной реакции, что, по-видимому, может свидетельствовать об активации в тимусе при ОМЖ процессов, направленных на обеспечение цитотоксических механизмов иммунного ответа [4, 7, 11].

Результаты наших исследований показали, что при хирургической инструментальной резекции экспериментальной ОМЖ, по сравнению с интактной группой, относительная площадь коркового вещества тимуса уменьшается на 15,1 %, а мозгового – увеличивается на 16,8 % (см. табл. 1). Кортико-мозговое соотношение уменьшается на 27,3 %, а относительная площадь соединительнотканых структур увеличивается на 32,8 %. Паренхиматозно-стромальное соотношение при этом снижается на 27,6 %. Отмечается снижение плотности расположения клеточных элементов в центральной части мозгового вещества и в кортико-медуллярной зоне. Во всех зонах тимуса по сравнению с интактной группой выявлено уменьшение числа малых лимфоцитов и увеличение числа средних лимфоцитов (см. табл. 2), а также увеличение количества иммунобластов, митотически делящихся клеток в субкапсулярной зоне коркового вещества и кортико-медуллярной зоне.

По сравнению с группой с ОМЖ без лечения, в экспериментальной группе с удалением ОМЖ выявлено увеличение площади мозгового вещества тимуса на 10 % при уменьшении площади железистых структур на 54,3 %. При этом в сравнении с животными с ОМЖ без лечения в субкапсулярной и центральной части коркового вещества обнаружено повышение плотности расположения клеточных элементов, уменьшение количества иммунобластов и митотически делящихся клеток, увеличение числа макрофагов (особенно в корковом веществе тимуса), что можно рассматривать как компенсаторные процессы, направленные на ускорение созревания тимоцитов в соответствующих зонах. По сравнению с группой с ОМЖ без лечения в зонах тимуса отмечено уменьшение числа клеток с пикнотическими ядрами и увеличение количества эпителиальных клеток (см. табл. 2). Все эти изменения в структуре тимуса после удаления ОМЖ могут свидетельствовать о формировании акцидентальной инволюции, но проявляющейся в менее выраженной форме, чем в группе с ОМЖ без

лечения, что подтверждается полученными морфологическими результатами, указывающими на снижение интенсивности лимфопоэтической функции тимуса, уменьшение числа гибнущих лимфоидных клеток.

После хирургического удаления экспериментальной ОМЖ с последующим курсом полихимиотерапии по сравнению с интактной группой уменьшается относительная площадь коркового вещества на 14,6 %, а мозгового и соединительнотканых элементов – увеличивается на 21,9 и 16,9 % соответственно. Кортико-мозговое соотношение при этом уменьшается на 30 %, паренхиматозно-стромальное соотношение – на 15,8 %. Относительная площадь железистых структур снижена на 57 %. По сравнению с интактной группой животных выявлено уменьшение плотности расположения клеточных элементов тимуса в корковом веществе, в кортико-медуллярной зоне и, наиболее выраженное, в мозговом веществе. По сравнению с интактной группой в тимусе выявлено повышение активности процессов бласттрансформации и пролиферации (увеличено количество иммунобластов, средних лимфоцитов, митотически делящихся клеток) в субкапсулярной зоне коркового вещества, в центральной части коркового вещества и в кортико-медуллярной зоне, при уменьшении числа малых лимфоцитов (см. табл. 2). Возрастает количество макрофагов и эпителиальных клеток, а число клеток с пикнозом ядер увеличено только в субкапсулярной зоне коркового вещества.

По сравнению с группой с ОМЖ без лечения, в экспериментальной группе с хирургическим удалением ОМЖ и курсом химиотерапии выявлено увеличение площади мозгового вещества тимуса на 14,8 % при уменьшении площади железистых структур на 80,4 % (см. табл. 1), а также увеличение плотности расположения клеточных элементов в центральной части коркового вещества и снижение – в центральной части мозгового вещества. Во всех структурных компонентах тимуса наблюдался рост количества макрофагов и эпителиальных клеток. Число клеток с пикнотическими ядрами уменьшилось как в корковом, так и в мозговом веществе.

По сравнению с группой, где проводилось только удаление ОМЖ, в экспериментальной группе с удалением ОМЖ и курсом химиотерапии обнаружено уменьшение площади соединительнотканых элементов и железистых структур на 12 и 57,2 % соответственно. В литературе отмечаются случаи доброкачественной гиперплазии тимуса после оперативного лечения рака молочной железы и адьювантной химиотерапии в стандартных дозах [17], что подтверждается по-

лученными нами данными: повышена общая площадь тимуса, увеличены площади долек по сравнению с интактной группой, группой с ОМЖ без лечения и группой с ОМЖ с удалением опухоли. Выявлено уменьшение плотности расположения клеточных элементов и в центральной части коркового и мозгового вещества. Определенный вклад в эти процессы, по-видимому, вносит ускорение миграции лимфоцитов из тимуса через посткапиллярные венулы и лимфатические сосуды, сочетающееся с повышенной гибелью клеток и приводящее к снижению плотности клеточных элементов в паренхиме тимуса [5, 12, 16].

Оперативное удаление ОМЖ и последующая затем полихимиотерапия, с одной стороны, вызывают развитие стресс-реакции, а с другой стороны, они непосредственно являются значительными повреждающими факторами, при которых происходит выброс Т-лимфоцитов в кровь и гибель лимфоидных элементов в самом органе, особенно в корковом веществе [13]. Полученные нами данные указывают на усиление в тимусе процессов бласттрансформации (увеличено числа иммунобластов), причем эти процессы более выражены в отличие от группы с ОМЖ без лечения, что также может свидетельствовать о более выраженной активации в тимусе процессов, направленных на обеспечение цитотоксических механизмов иммунного ответа [4, 11]. Сохраняющееся увеличенным количество макрофагов в группе с удалением ОМЖ и введением химиопрепаратов по сравнению с интактной группой и группой с ОМЖ без лечения мы также связываем с деструктивными процессами в тимусе, вызываемыми в том числе химиотерапией [1]. Отмечается возрастание числа клеток с пикнотическими ядрами и значительное увеличение количества эпителиальных клеток как в корковом, так и мозговом веществе. Изменения в структуре тимуса при удалении ОМЖ и химиотерапии могут свидетельствовать о его выраженной акцидентальной инволюции, характеризующейся миграцией лимфоцитов из тимуса, делимфотизацией морфофункциональных зон тимической паренхимы.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях только оперативного удаления ОМЖ в тимусе выявлены структурные признаки формирования акцидентальной инволюции, проявляющейся в менее выраженной форме, чем в группе с ОМЖ без лечения, что подтверждается полученными морфологическими результатами, указывающими на снижение интенсивности лимфопоэтической функции тимуса, увеличении количества лимфоцитов в корковом веществе,

уменьшении числа гибнущих лимфоидных клеток, макрофагальной реакции.

При сочетании удаления ОМЖ и химиотерапии, по сравнению с группой, где проводилось только удаление ОМЖ, выявлена более выраженная акцидентальная инволюция, о чем свидетельствует увеличение числа гибнущих лимфоидных клеток, уменьшение количества лимфоцитов, как в центре, так и на периферии долек, активация бласттрансформации и повышение миграции лимфоцитов из тимуса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васендин Д.В. Особенности структурных изменений в тимусе при повреждающих воздействиях (обзор литературы) // Учен. зап. ПетргУ. 2014. (2). 59–64.
2. Драндрова Е.Г., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М. и др. Иммуногистохимические исследования клеточного состава тимуса при канцерогенезе в условиях врожденного иммунодефицита // Современ. пробл. науки и образ. 2015. (3). <http://www.science-education.ru/pdf/2015/3/405.pdf>
3. Ильина Н.И., Латышева Т.В., Пинегин Б.В. и др. Синдром вторичной иммунной недостаточности (протоколы диагностики и лечения) // Иммунология. 2000. (5). 8–9.
4. Казаков О.В., Кабаков А.В., Повещенко А.Ф. и др. Тимус при экспериментальном канцерогенезе молочной железы // Вестн. НГУ. Сер. Биол., клин. мед. 2014. 12. (3). 58–62.
5. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О. и др. Нейроиммуноэндокринология тимуса. СПб., 2005. 160 с.
6. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // Успехи современ. биологии. 2004. 124. (6). 589–601.
7. Ковешников В.Г., Бибик Е.Ю. Функциональная морфология органов иммунной системы. Луганск, 2007. 172 с.
8. Кузьмина Е.Г., Неприна Г.С., Ватин О.Е. и др. Коррекция вторичных иммунодефицитных состояний, индуцированных химиолучевой терапией, у онкологических больных // Рос. онкол. журн. 2003. (2). 32–36.
9. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В. и др. Сравнительный анализ содержания в лимфе гормонов, вовлеченных в патогенез рака молочной железы у крыс линии Wistar // Сиб. онкол. журн. 2015. (1). 64–67.
10. Микроскопическая техника: Руководство / ред. Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. М., 1996. 544 с.
11. Чекнев С.Б. Естественная цитотоксичность в комплексе межклеточных взаимодействий // Вестн. РАМН. 1999. (4). 30–34.

12. Чернушенко Е.Ф. Диагностика вторичных иммунодефицитных состояний // Искусство лечения. 2006. (2). 5–12.
13. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов // Иммунология. 2004. (5). 312–320.
14. Freyer G., Braud A. Dealing with metastatic breast cancer in elderly women: results from a French study on a large cohort carried out by the 'Observatory on Elderly Patients' // Ann. Oncol. 2006. 17. (2). 211–216.
15. Lopez D.M., Charyulu V., Adkins B. Influence of breast cancer on thymic function in mice // Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2002 Apr. 7(2). 191–199.
16. Lyden D., Hattor R., Dias S. et al. Accidental involution of Thymus // Nature Med. 2001. 7. (11). 1886.
17. A.S., Tallaksen R.J., Bennett J., Abraham J. Thymic hyperplasia after adjuvant chemotherapy in breast cancer // J. Thorac. Imaging. 2006. 21. (1). 43–46.
18. Wildiers H., Kunkler I. Management of breast cancer in elderly individuals: recommendations of the International Society of Geriatric Oncology // Lancet Oncol. 2007. 8. (12). 1101–1115.
19. Yoon S., Yoo Y.H., Kim B.S., Kim J.J. Ultrastructural alterations of the cortical epithelial cells of the rat thymus after cyclophosphamide treatment // Histol. Histopathol. 1997. 12. (2). 401–413.
20. Zusman I., Kossoy G., Ben-Hur H. T cell kinetics and apoptosis in immune organs and mammary tumors of rats treated with cyclophosphamide and soluble tumor-associated antigens // In vivo. 2002. 16. (6). 567–576.

## THYMUS AFTER SURGICAL REMOVAL OF EXPERIMENTAL TUMORS OF MAMMARY GLAND AND CHEMOTHERAPY

Oleg Vasilevich KAZAKOV, Alexei Vasilevich KABAKOV,  
Alexandr Fedorovich POVESHCHENKO, Alexandr Petrovich LYKOV,  
Tatyana Vladimirovna RAYTER, Dmitriy Nikolaevich STRUNKIN,  
Irina Yuryevna ISHCHEENKO, Svetlana Victorovna MICHURINA,  
Vladimir Iosiphovich KONENKOV

*Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The histological study of changes in the thymus of female Wistar rats after breast tumor surgical removal (after 6 months from the start of the experiment) induced by intramammary administration of N-methyl-N-nitrosourea has been carried out. The structural features of the accidental involution formation manifested in a less pronounced way compared to the group with breast tumor without treatment have been revealed. The combination of lumpectomy with chemotherapy, compared to the group with the lumpectomy without chemotherapy causes the more pronounced thymus involution characterized by increased migration of lymphocytes from the thymus, delymphotization of morphofunctional zones of thymic parenchyma.

**Key words:** thymus, lymphocytes, cancer, surgery, preventive treatment.

*Kazakov O.V. – candidate of biological sciences, leading researcher, e-mail: kazakoff\_oleg@mail.ru  
Kabakov A.V. – researcher, e-mail: Doctor03-85@ngs.ru  
Poveshchenko A.F. – doctor of medical sciences, head of the laboratory, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru  
Lykov A.P. – candidate of medical sciences, leading researcher, e-mail: aplykov2@mail.ru  
Rayter T.V. – postgraduate student, e-mail: reitert@mail.ru  
Strunkin D.N. – candidate of medical sciences, researcher, e-mail: strunkind@mail.ru  
Ishchenko I.Yu. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: irenisch@mail.ru  
Michurina S.V. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher, e-mail: s.michurina@ngs.ru  
Kononkov V.I. – doctor of medical sciences, academician of RAS, director, e-mail: kononkov@soramn.ru*

## АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПАНТОГЕМАТОГЕНА НА РЕАКЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Александр Александрович БЛАЖКО<sup>1</sup>, Игорь Ильич ШАХМАТОВ<sup>1,2</sup>,  
Светлана Валерьевна МОСКАЛЕНКО<sup>1</sup>, Наталья Александровна ЛЫЧЕВА<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России  
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

<sup>2</sup> НИИ физиологии и фундаментальной медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Цель исследования – оценить реакции системы гемостаза на фоне предварительного курсового приема пантогематогена разной продолжительности. **Материал и методы.** В работе использовались 50 половозрелых крыс-самцов линии Wistar. Три группы экспериментальных животных принимали пантогематоген по 6 мл в сутки в течение 7, 14 и 30 дней соответственно. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что 7-дневный прием пантогематогена разнонаправленно влиял на плазменный гемостаз, повышал антикоагулянтную активность плазмы крови. По истечении 30 дней приема препарата отмечалось увеличение агрегационной активности тромбоцитов, гиперкоагуляция на всех этапах плазменного гемостаза, повышение антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови.

**Ключевые слова:** система гемостаза, пантогематоген, антикоагулянтная активность плазмы, гиперкоагуляция, фибринолиз.

Изучение приспособительных реакций систем органов и организма в целом, возникающих при различных стрессорных воздействиях, является актуальной проблемой современной физиологии. Система гемостаза, выступая в качестве одной из наиболее реактивных систем организма, играет важную роль в процессах адаптации, поскольку способна отвечать на действие различных по интенсивности и продолжительности раздражителей как эустрессорной, так и дистрессорной реакцией [1, 7]. При этом дистресс со стороны системы гемостаза характеризуется повышением риска развития тромбоза: гиперкоагуляцией с признаками тромбинемии на фоне подавления антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы, что объединено понятием «состояние тромботической готовности» [3].

Чтобы не допустить развития состояния тромботической готовности, необходимо повышать сопротивляемость как организма в целом, так и системы гемостаза в частности с целью формирования эффекта долговременной адаптации. Показано, что предварительные многократные физические тренировки снижают риск

развития состояния тромботической готовности у крыс при действии сверхпорогового стрессора [6]. Для повышения устойчивости организма к стрессорным воздействиям используются также адаптогены животного происхождения. К ним относятся продукты пантового оленеводства, которые наиболее часто находят применение в спортивно-медицинской практике. Пантогематоген увеличивает умственную и физическую работоспособность организма, активизирует иммунную систему, поддерживает стабильность липидного обмена и поддерживает баланс в системе «прооксиданты – антиоксиданты» [5]. Показано, что в пантогематогене отсутствуют какие-либо запрещенные допинговые вещества или близкие к ним аналоги [4].

Ранее нами установлено, что предварительный 30-дневный прием пантогематогена значительно снижает риск развития состояния тромботической готовности у крыс после однократной 8-часовой физической нагрузки [2], а также выявлена максимально эффективная дозировка пантогематогена. Однако комплексное чистое влияние курсового приема пантогематогена на состояние

*Блажко А.А.* – преподаватель кафедры нормальной физиологии, e-mail: blazhko\_1990@mail.ru

*Шахматов И.И.* – д.м.н., зав. кафедрой нормальной физиологии, e-mail: iish59@yandex.ru

*Москаленко С.В.* – студентка, e-mail: sunrisemsv@gmail.com

*Лычева Н.А.* – к.б.н., младший научный сотрудник, e-mail: kuzminan\_86@mail.ru

системы гемостаза изучено не было. Цель исследования – оценить реакции системы гемостаза на фоне предварительного курсового приема пантогематогена разной продолжительности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали 50 половозрелых крыс-самцов линии Wistar массой 200–250 г (группа интактных животных ( $n = 20$ ) и три экспериментальные группы ( $n = 3 \times 10$ )). Все экспериментальные животные принимали препарат «Пантогематоген (Лубянгем)» (Всероссийский НИИ пантового оленеводства, г. Барнаул) по 6 мл в сутки в течение 7, 14 или 30 дней. Данная дозировка выбрана нами на основании ранее проведенных исследований [2], показавших, что при ней максимально снижается риск развития состояния тромбоцитической готовности при действии сверхпороговой физической нагрузки. Экспериментальные животные содержались в индивидуальных клетках и принимали водный раствор пантогематогена перорально из индивидуальных поилок. Раствор приготавливался путем добавления 6 мл пантогематогена в воду, доводя раствор до общего объема 40 мл (суточная норма потребления воды для данных крыс, выявленная нами до начала эксперимента). Интактные животные принимали воду в том же объеме, что и экспериментальные животные.

Кровь для исследования в объеме 6 мл получали путем забора из печеночного синуса в полистироловый шприц с широкой иглой, содержащий 0,11 М (3,8 %) раствор цитрата натрия (соотношение крови и цитрата 9:1), под эфирным наркозом. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией и директивами по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте.

Параметры системы гемостаза оценивались на коагулометрах «Минилаб» (Россия) и «Trombostat-2» (Германия) с помощью диагностических наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия), согласно рекомендациям З.С. Баркагана и А.П. Момота [1]. Комплексная оценка состояния системы гемостаза включала исследование тромбоцитарного гемостаза, внутреннего и внешнего путей активации плазменного гемостаза, конечного этапа свертывания крови, антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови. Количество тромбоцитов в периферической крови подсчитывали при помощи гематологического анализатора Drew3 (Великобритания). Индуцированную агрегацию тромбоцитов проводили на агрегометре «Биола», при этом в качестве индуктора использовался раствор АДФ. При исследова-

нии агрегации тромбоцитов для нормализации их количества богатую тромбоцитами плазму крови крыс разводили в соотношении 1:1 с «собственной» бедной тромбоцитами плазмой крови. Такое соотношение выбиралось из-за того, что количество тромбоцитов в исследуемых и контрольных плазмах экспериментальных животных в 2 раза превышало нормальные показатели человека.

Так как полученные признаки не подчинялись нормальному распределению, достоверность различий оценивалась при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ . Полученные в ходе исследования результаты представлены в таблице в виде ( $m$  [25–75 %]), где  $m$  – медиана в выборочной совокупности; [25–75 %] – 25-й и 75-й перцентиль.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные исследования состояния системы гемостаза интактных животных и трех экспериментальных групп представлены в таблице.

Первоначально было исследовано состояние системы гемостаза после предварительного 7-дневного курсового приема пантогематогена. Как видно из таблицы, 7-дневный прием пантогематогена не оказывал влияния на показатели тромбоцитарного звена гемостаза. Плазменный гемостаз после 7-дневного приема пантогематогена реагировал укорочением активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) на 20 % ( $p < 0,05$ ) и укорочением силиконового времени на 23 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными животными, что свидетельствовало о гиперкоагуляции по внутреннему пути свертывания крови. По внешнему пути активации плазменного гемостаза наблюдалась гипокоагуляция: увеличение протомбинового времени на 9 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными животными. На конечном этапе свертывания крови наблюдалась активация за счет повышения концентрации растворенных фибрин-мономерных комплексов (РФМК) на 143 % ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения содержания фибриногена на 27 % ( $p < 0,05$ ), при этом тромбиновое время не отличалось от такового у интактных животных. По завершении 7-дневного приема пантогематогена у крыс отмечалось повышение антикоагулянтной активности плазмы крови на 33 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями интактных крыс, активность фибринолитической системы оставалась на уровне интактных животных. Таким образом, прием пантогематогена в течение 7 дней вызывает разнонаправленные сдвиги в реакциях системы гемостаза, соответственно, по итогам

Таблица

Состояние системы гемостаза у интактных крыс, а также на фоне курсового приема пантогематогена на продолжительность 7, 14 и 30 дней ( $n$  [25–75 %])

Параметр	Интактные животные ( $n = 20$ )	Пантогематоген, 6 мл/сут		
		7 дней	14 дней	30 дней
Содержание тромбоцитов, $10^9/л$	569,5 [562,0–572,5]	615,0 [588,0–637,0]	533,0* [497,5–557,5]	568,0 [546,5–594,0]
Индукцированная АДФ агрегация тромбоцитов, макс. значения	29,1 [28,6–29,8]	22,8 [16,4–34,0]	78,4* [53,9–106,0]	42,8* [37,0–54,8]
Силиконовое время, с	310,0 [298,0–321,0]	239,0* [205,0–289,0]	165,0* [141,3–173,8]	144,0* [140,0–155,0]
АПТВ, с	21,4 [20,6–22,3]	17,2* [16,0–18,3]	17,5* [16,5–18,6]	14,9* [12,8–16,1]
Протромбиновое время, с	26,2 [25,2–27,0]	28,5* [27,8–29,4]	22,8* [21,8–23,5]	22,7* [21,4–22,9]
Тромбиновое время, с	44,9 [43,1–46,2]	44,5 [42,7–44,7]	35,1* [29,9–37,4]	33,0* [31,8–35,9]
Содержание РФМК, мг%	3,5 [3,5–3,9]	8,5* [7,4–9,3]	6,5* [5,0–8,4]	9,0* [8,8–11,0]
Содержание фибриногена, г/л	2,2 [1,9–2,6]	1,6* [1,1–1,7]	1,7* [1,7–1,8]	1,4* [1,4–1,5]
Содержание антитромбина III, %	95,7 [94,7–97,3]	127, 5* [126,2–128,6]	126,0* [124,1–126,9]	127,8* [127,2–128,4]
Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз, мин	530,0 [506,3–560,0]	557,5 [518,8–566,3]	510,0 [417,5–580,0]	415,0* [412,5–420,0]

Примечание. \* – отличие от величины соответствующего показателя интактных животных статистически значимо при  $p < 0,05$ .

недельного приема препарата еще нельзя говорить об адаптивном эффекте пантогематогена.

На 14-й день приема пантогематогена у крыс отмечалась активация агрегационной функции тромбоцитов на 169 % ( $p < 0,05$ ) и уменьшение количества тромбоцитов на 6 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными животными. По внутреннему пути активации плазменного гемостаза, так же как и после 7 дней приема пантогематогена, отмечалась гиперкоагуляция (укорочение АПТВ на 18 %, силиконового времени – на 47 % ( $p < 0,05$ )). Гипокоагуляция по внешнему пути свертывания крови, зарегистрированная через 7 дней приема пантогематогена, к 14-му дню курсового приема сменилась гиперкоагуляцией, что характеризовалось укорочением протромбинового времени на 13 % ( $p < 0,05$ ). Конечный этап плазменного гемостаза при повышении концентрации РФМК на 86 % ( $p < 0,05$ ) и снижении фибриногена на 23 % ( $p < 0,05$ ) к 14-му дню приема препарата характеризовался и укорочением тромбинового времени на 22 % ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о гиперкоагуляции на конечном этапе свертывания крови. Антикоагулянтная активность плазмы крови после 14-го дня приема пантогематогена оставалась повышенной на 32 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с

показателем у интактных крыс. Фибринолитическая система плазмы крови не реагировала на 14-дневный прием пантогематогена. Таким образом, по итогам 14-дневного приема пантогематогена отмечается содружественная активация тромбоцитарного и плазменного звена гемостаза, повышение активности антикоагулянтов плазмы крови, однако система фибринолиза не активировалась.

Изменения реакций системы гемостаза, зарегистрированные по истечении 14-дневного приема пантогематогена, сохранили свою направленность и после завершения 30-дневного курса. Так, после 30 дней приема пантогематогена у крыс отмечалось повышение агрегационной функции тромбоцитов на 47 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными крысами, что свидетельствовало об активации тромбоцитарного звена гемостаза. Со стороны плазменного гемостаза отмечалось укорочение АПТВ и силиконового времени на 30 и 53 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, укорочение протромбинового времени на 13 % ( $p < 0,05$ ) и тромбинового времени на 26 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями гемостаза интактных животных, что свидетельствовало об активации на всех этапах коагуляционного гемостаза. Это под-

тверждалось повышением концентрации РФМК на 157 % ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения содержания фибриногена на 36 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с референтными значениями. 30-дневный курсовой прием пантогематогена на фоне активации процессов свертывания крови приводил к увеличению антикоагулянтной активности плазмы крови, что характеризовалось повышением по сравнению с интактными животными концентрации антитромбина III на 34 % ( $p < 0,05$ ). На 30-й день приема пантогематогена впервые отмечалась активация фибринолитической системы плазмы крови, о чем свидетельствовало укорочение времени спонтанного эуглобулинового фибринолиза на 22 % ( $p < 0,05$ ). Таким образом, 30-дневный прием пантогематогена активировал все звенья системы гемостаза.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют предположить, что 30-дневный курсовой прием пантогематогена активирует систему гемостаза, не сдвигая в ней динамическое равновесие, при этом на фоне активации тромбоцитарного гемостаза и системы свертывания значительно повышается активность и противовесных им антикоагулянтной и фибринолитической систем плазмы крови. Частичная гиперкоагуляция со стороны плазменного гемостаза выявляется уже на 7-й день приема пантогематогена и усиливается до полной активации к 30-му дню.

На фоне приема пантогематогена система гемостаза находится в постоянном напряжении, что дает право предположить, что при более длительном приеме препарата возможно ее истощение. При этом выявленный эффект позволяет предположить, что меньшая реактивность системы гемостаза, зарегистрированная в ответ на действие сверхпороговых стрессоров на организм на фоне предварительного приема пантогематогена, обусловлена предварительной активацией всех звеньев системы гемостаза.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работы выполнена на средства «Гранта Ректора АГМУ» (договор № 2-гр от 09.01.2016 г.). Также выражается признательность ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства» ФАНО России, г. Барнаул, в лице директора, д.в.н., профессора В.Г. Луницына за предоставленные разработки продукции пантового оленеводства.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., 2008. 292 с.
2. Блажко А.А., Шахматов И.И., Лычева Н.А. Снижение риска развития состояния тромбоцитической готовности при воздействии сверхпороговой физической нагрузки у крыс на фоне предварительного приема пантогематогена // *Соврем. пробл. науки и образ.* 2016. (2). <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24255> (дата обращения: 07.05.2016)
3. Момот А.П. Современные методы распознавания состояния тромбоцитической готовности. Барнаул, 2011. 18–19.
4. Семенов В.А., Латков Н.Ю., Кошелев Ю.А. Применение пантогематогена в спортивно-медицинской практике // *Техн. и технол. пищ. пр-в.* 2014. (2). 113–117.
5. Сулов Н.И. Продукция на основе пантогематогена. Механизмы действия и особенности применения. Новосибирск: Сиб. универ. изд-во, 2008. 27–38.
6. Шахматов И.И., Алексеева О.В. Влияние многократного воздействия физической нагрузки на систему гемостаза // *Фундамент. исслед.* 2011. 10-1. 181–185.
7. Шахматов И.И., Вдовин В.М. Изменения в системе гемостаза в ответ на однократную физическую нагрузку различной интенсивности // *Вестн. нов. мед. технол.* 2011. XVIII. (3). 207–209.

## ACTIVATING EFFECT OF ANTLER HEMATOGEN UPON THE REACTIONS OF HEMOSTASIS SYSTEM

Aleksandr Aleksandrovich BLAZHKO<sup>1</sup>, Igor Ilich SHAKHMATOV<sup>1,2</sup>,  
Svetlana Valerevna MOSKALENKO<sup>1</sup>, Natalya Aleksandrovna LYCHEVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Altai State Medical University of Minzdrav of Russia*  
656038, Barnaul, Lenin str., 40

<sup>2</sup> *Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine*  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4

---

The objective of the present research is to assess reactions of hemostatic system after preliminary administration of antler hematogen in courses of different duration. **Methods and material.** 50 adult male Wistar rats were used in the present work. In the course of the experiment three groups of animals were taking 6 ml of antler hematogen per day for 7, 14 and 30 days respectively. **Results and their discussion.** It was experimentally established that the 7-day administration of antler hematogen had different effects upon plasma hemostasis and increased anticoagulant activity of blood plasma. After 30 days of administration of the preparation an increase in platelet aggregation, hypercoagulation at all stages of plasma hemostasis, an increase in anticoagulant and fibrinolytic activity of plasma were noted.

---

**Key words:** hemostasis system, antler hematogen, anticoagulant activity of plasma, hypercoagulation, fibrinolysis.

*Blazhko A.A.* – lecturer of the chair for normal physiology, e-mail: blazhko\_1990@mail.ru

*Shakhmatov I.I.* – doctor of medical sciences, head of the chair for normal physiology, senior researcher, e-mail: iish59@yandex.ru

*Moskalenko S.V.* – student, sunrisemsv@gmail.com

*Lycheva N.A.* – candidate of medical sciences, junior researcher, e-mail: kuzminan\_86@mail.ru

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА КОРНЕВИЩ *CURCUMA LONGA L.* В ГЛИЦЕРИНЕ НА МОДЕЛИ РОСТА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ В16

Геннадий Юрьевич ЛЮБИМОВ, Ирина Александровна ГОЛЬДИНА,  
Константин Валентинович ГАЙДУЛЬ, Владимир Александрович КОЗЛОВ

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

Целью настоящего исследования было выявление противоопухолевой эффективности экстракта модифицированного порошка корневищ куркумы в глицерине на модели меланомы мышей В16. **Материал и методы.** Исследование выполнено на 30 мышках-самках (СВА×С57BL/6)F1. За 7 суток до инокуляции клеток меланомы и в течение 21 суток эксперимента в пищу животных опытной группы добавляли экстракт куркумы. Модификация порошка куркумы проводилась методом механического измельчения до размера 20–100 нм с иммобилизацией на полимерном носителе – декстране с молекулярной массой 10,0 кДа. **Результаты.** Выявлено уменьшение массы очагов меланомы в мышцах под действием экстракта куркумы, что свидетельствует о его противоопухолевых свойствах.

**Ключевые слова:** куркума, наночастицы, экстракт, глицерин, меланома В16, противоопухолевые свойства, механическая модификация.

В настоящее время онкологическая заболеваемость и смертность в мире остается стабильно высокой [13]. Так, в США ежегодно регистрируется до 1 638 910 новых случаев рака [25]. Прогресс в лечении онкологических заболеваний напрямую зависит от эффективности комплексной терапии, неотъемлемой частью которой является химиотерапия. Но ее применение ограничивается развитием как лекарственной резистентности клеток опухоли, так и тяжелых побочных реакций [15]. Успешная стратегия преодоления этих ограничений заключается в создании и комплексном использовании новых эффективных композиций химиотерапевтических препаратов с веществами природного происхождения, обладающими цитотоксическими и антиоксидантными свойствами, для которых не характерно наличие тяжелых побочных эффектов, поэтому их можно применять в течение длительного времени и для профилактики, и для поддерживающей терапии онкологических заболеваний.

Известно, что некоторые фитонутриенты оказывают антиканцерогенное действие. Такими свойствами обладают, в частности, многие рас-

тительные полифенольные соединения [30]. В связи с этим полифенолы перспективны для использования в качестве как непосредственно противоопухолевых препаратов, так и адъювантов для усиления эффективности других химиотерапевтических средств [18].

*Curcuma longa L.* (куркума) – растение порядка имбирных, характеризующееся высоким содержанием куркуминоидов – куркумина (1,7-бис-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион), диметоксикуркумина, циклокуркумина, метилкуркумина, бисдиметоксикуркумина [10, 17]. Ряд экспериментальных исследований свидетельствует о способности куркумина, основного биологически активного компонента куркумы, подавлять рост опухоли при многих видах рака – желудка, поджелудочной железы, кишечника, печени, молочной железы, простаты [5, 8, 11]. Основными механизмами антиканцерогенного действия куркумина являются подавление клеточных сигнальных путей, включая ингибирование активности фактора транскрипции NF-κB [24], протеина активации AP-1 [12], вовлеченных в пролиферацию, инвазию клеток опухо-

Любимов Г.Ю. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории регуляции иммунорезистентности,  
e-mail: glubimov@rambler.ru

Гольдина И.А. – научный сотрудник лаборатории регуляции иммунорезистентности, e-mail: igoldina@mail.ru

Гайдуль К.В. – д.м.н., проф., руководитель лаборатории регуляции иммунорезистентности,  
e-mail: kgaidul@mail.ru

Козлов В.А. – д.м.н., проф., академик РАН, научный консультант, e-mail: vkoz@yandex.ru

ли, ангиогенез; модуляция экспрессии ростовых факторов (epidermal grow factor receptor (EGFR), циклооксигеназа 2), обладающих антипролиферативными, антиинвазивными и антиангиогенными свойствами [22, 26]; остановка клеточного цикла и индукция апоптоза раковых клеток через стимуляцию экспрессии проапоптотических генов (HIP1, CRAF1, TRAF6) [19], повышение экспрессии проапоптотических протеинов (Bax, Vim, Bak, Puma, Noxa) и подавление антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-XL, survivin, inhibitor of apoptosis protein (IAP)) [23]; нейтрализация прооксидантов и канцерогенов [10]. В связи с этим в настоящее время полифенолы куркумы рассматриваются в качестве перспективных адьювантов для усиления клинической эффективности противоопухолевых препаратов [18].

Характерной особенностью куркумина является его низкая биодоступность (около 1 %) при пероральном применении [7]. Малая растворимость в воде и незначительная абсорбция, интенсивный системный метаболизм значительно ограничивают клиническую эффективность куркумина. Для повышения биодоступности куркумина применяются различные стратегии – модификация его до наночастиц, применение в виде эмульсий, в составе липосом или фосфолипидных комплексов, добавление эфирных масел или синтез структурных аналогов куркумина [14, 27]. Так, комбинация куркумина с эфирными маслами куркумы увеличивала его абсорбцию в 6,9 раза, при этом токсичность таких комплексов не возрастала [6, 9]. В результате наших собственных исследований также была установлена способность экстракта корневищ куркумы в масле растительного происхождения эффективно подавлять рост экспериментальной карциномы легких у мышей [4]. Композиция куркумина с глицерином, смолами и водой повышала плазменную концентрацию куркумина в 27,6 раза по сравнению с нативным куркумином [21].

Целью настоящего исследования было выявление противоопухолевой эффективности экстракта модифицированного измельчением порошка корневищ куркумы в глицерине в отношении экспериментальной меланомы мышей B16.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 30 мышах-самках (СВА×С57BL/6)F1 в возрасте трех месяцев, с массой тела 25–27 г, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (г. Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми

Европейской конвенцией по защите животных, используемых для научных целей (Страсбург, 1986), в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, при свободном доступе к воде и пище, естественном световом режиме. Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 № 267 «Правила лабораторной практики в РФ»).

Животные случайным образом были разделены на 2 группы. В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали рост перевиваемой линии мышинной меланомы B16, полученной из коллекции НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, в мышцах. Клетки опухоли культивировали по стандартной методике в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> [20, 31]. Перед началом эксперимента клетки выделяли при помощи стандартной процедуры трипсинизации и оценивали их жизнеспособность на основании окраски трипановым синим. Затем животным обеих групп однократно внутримышечно в верхнюю треть правого бедра инокулировали по 4×10<sup>5</sup> клеток меланомы в 0,2 мл физиологического раствора на одно животное. За 7 суток до инокуляции клеток опухоли в пищевой рацион животных опытной группы добавляли экстракт сухого измельченного модифицированного порошка корневища куркумы в глицерине (150 г/л) из расчета 1 столовая ложка на 10 мышей в сутки, а животным контрольной группы – глицерин в соответствующем количестве в те же сроки. Кормление продолжали в течение 21 суток после инокуляции клеток опухоли. Модификация порошка куркумы проводилась методом механического измельчения в высокоинтенсивных шаровых мельницах с одновременной иммобилизацией на полимерном носителе – декстране с молекулярной массой 10,0 кДа с целью формирования механокомпозиата [3]. Рентгенофазовый анализ данной композиции проводился на дифрактометре ДРОН-3 (Россия), гранулометрический состав исследовали на лазерном гранулометре Micro-Sizer 201 (Россия). В результате механохимической обработки образовались наночастицы порошка размером 20–100 нм.

На протяжении времени эксперимента учитывали выживаемость животных, а по его окончании оценивали суммарную массу очагов опухоли в тканях. Масса опухолевых очагов определялась как разница массы бедра с очагами опухоли и

здорового оппозитного бедра животного после удаления шкуры. Выживаемость животных оценивали путем ежедневного учета их количества в опытной и контрольной группе.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни для двух независимых групп. Результаты представляли в виде медианы и интервала между 1 и 3 квартилями (Me (25 %; 75 %)). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Учет продолжительности жизни опухоленосителей в эксперименте показал, что мыши опытной и контрольной групп не различались по показателю выживаемости в указанные сроки наблюдения. После трансплантации клеток меланомы опухолевые очаги сформировались у животных обеих групп. Выявление изменений характера опухолевого роста экспериментальной меланомы мышей В16 при воздействии экстракта модифицированного порошка куркумы в глицерине проводилось, как было указано выше, на основании оценки суммарной массы очагов опухоли в мышцах. Установлено, что в группе мышей, получавших в составе пищевого рациона экстракт порошка куркумы в глицерине, активность роста опухоли была ниже, чем у животных контрольной группы: абсолютная суммарная масса опухолевых очагов составляла соответственно 3,78 (2,83; 5,07) и 5,56 г (5,0; 6,6) ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что экстракт измельченного сухого корневища куркумы в глицерине обладает противоопухолевыми свойствами, что подтверждено уменьшением роста очагов опухоли на модели роста меланомы В16 у экспериментальных животных.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Порошок корневищ *Curcuma longa* L. характеризуется высоким содержанием полифенолов, которые являются продуктами вторичного метаболизма растений и защищают их от окислительного и иных видов стресса, патогенных организмов [16]. Куркумин представляет собой липофильный полифенол, практически нерастворимый в воде, обладающий высокой антиоксидантной и противоопухолевой активностью. Его биодоступность при применении в виде сухого порошка невысока, но увеличивается при растворении в ряде солевых растворов, а также измельчении [28]. Учитывая способность куркумина растворяться в спиртах, мы

использовали способ спиртовой экстракции биологически активных веществ модифицированного измельчением до размера наночастиц с иммобилизацией на интактном полимерном носителе (декстрани с молекулярной массой 10,0 кДа), не обладающем иммуномодулирующими свойствами [1, 2] порошка корневищ куркумы. В качестве растворителя мы использовали глицерин, представляющий собой многоатомный спирт. Глицерин ( $C_3H_5(OH)_3$ ) – нетоксичный биосовместимый натуральный метаболит, который в организме человека является, например, источником синтеза триглицеридов и фосфолипидов [29]. Эффективность спиртового экстракта модифицированного измельчением порошка куркумы оценивали на основании показателей роста очагов опухоли экспериментальной меланомы В16 у лабораторных животных. Спиртовой экстракт куркумы продемонстрировал противоопухолевую активность, которая выражалась в уменьшении суммарной массы опухолевых очагов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была установлена противоопухолевая эффективность глицеринового экстракта модифицированного порошка корневищ куркумы в отношении роста экспериментальной меланомы В16 у животных – опухоленосителей. Следовательно, механическая модификация измельчением с иммобилизацией на полимерном носителе и спиртовая экстракция биологически активных веществ порошка корневищ куркумы являются перспективным способом получения на его основе препарата с противоопухолевыми свойствами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайдурь К.В., Гольдина И.А., Якимова Ю.Л. и др. Антибактериальные свойства цефотаксима, механически иммобилизованного на полимерном носителе // Якут. мед. журн. 2009. (2). 163–164.
2. Гайдурь К.В., Сафронова И.В., Гольдина И.А. и др. Исследование влияния модифицированного цефотаксима на функциональную активность лимфоцитов в культуре и на течение местного гнойно-септического процесса // Вестн. Урал. мед. акад. науки. 2010. (2-1). 246.
3. Душкин А.В. Возможности механохимической технологии органического синтеза и получения новых материалов // Химия в интересах устойчивого развития. 2004. (12). 251–274.
4. Любимов Г.Ю., Гольдина И.А., Гришина Л.В., Гайдурь К.В. Влияние масляного экстракта *Curcuma longa* L. на рост карциномы легких Льюис в экспе-

- рименте // Рос. иммунол. журн. 2014. (8). 702–704. [In Russian].
5. Aggarwal B.B., Kumar A., Bharti A.C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies // *Anticancer Res.* 2003. 23. 363–398.
  6. Aggrawal M.L., Chacko K.M., Kuruvilla B.T. Systematic and comprehensive investigation of the toxicity of curcuminoid-essential oil complex: A bioavailable turmeric formulation // *Mol. Med. Rep.* 2016. 13. 592–604.
  7. Anand P., Runnumakkara A.B., Newman R.A., Aggrawal B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises // *Mol. Pharm.* 2007. 4. 807–818.
  8. Anand P., Sundaram C., Jhurani S. et al. Curcumin and cancer: an «old-age» disease with an «age-old» solution // *Cancer Lett.* 2008. 267. (1). 133–164.
  9. Antony B., Merina B., Lyer V.S. et al. A pilot cross-over study to evaluate human oral bioavailability of BCM-95CG (Biocurumax) a novel bioenhanced preparation of curcumin // *Indian J. Pharm. Sci.* 2008. 70. 445–449.
  10. Araujo C.A.C., Leon L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001. 96. 723–728.
  11. Bengmark S., Mesa M.D., Gil A. Plant-derived health – the effect of turmeric and curcuminoids // *Nutr. Hosp.* 2009. 24. 273–281.
  12. Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Brann D.W. Curcumin suppress growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NF-κB transcription factors // *J. Neurochem.* 2007. 102. 522–538.
  13. Ferlay J, Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // *Int. J. Cancer.* 2008. 127. 2893–2917.
  14. Ganesan P, Ko H.M., Kim I.S., Choi D.K. Recent trends in the development of nanophytobioactive compounds and delivery systems for their possible role in reducing oxidative stress in Parkinson's disease models // *Int. J. Nanomedicine.* 2015. 10. 6757–6772.
  15. Guo O., Li X., Yang Y. et al. Enhanced 4T1 breast carcinoma anticancer activity by co-delivery of doxorubicin and curcumin with core-shell drug-carrier based on heparin modified poly(L-lactide) grafted polyethylenimine cationic nanoparticles // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014. 10. (2). 227–237.
  16. Gupta S.C., Patchva S., Koh W., Aggrawal B.B. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2010. 39. 283–299.
  17. Huang W.Y., Cai Y.-Z., Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention // *Nutrition and Cancer.* 2010. 62. 1–20.
  18. Khan N., Afaq F., Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth // *Carcinogenesis.* 2007. 28. 233–239.
  19. Ramachandran C., Rodrigues S., Ramachandran R. et al. Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and inflammatory epithelial cells lines // *Anticancer Res.* 2005. 25. 3293–3302.
  20. Raz A., McLellan W.L., Hart I.R. et al. Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential // *Cancer Res.* 1980. 40. 1645–1651.
  21. Sasaki H., Sunagawa Y., Takahashi K. et al. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. 34. 660–665.
  22. Scaltriti M., Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy // *Clin. Cancer Research.* 2006. 12. 5268–5272.
  23. Shankar S., Ganapathy S., Chen Q., Srivastava R.K. Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis // *Mol. Cancer.* 2008. 7. ID 16.
  24. Shin H.K., Kim J., Lee E.J. et al. Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-κB activations // *Phyther. Res.* 2010. 24. 577–582.
  25. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics 2012 // *CA Cancer J. Clin.* 2012. 62. 10–29.
  26. Subbaramaiah K., Dannenberg A.J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment // *Trends. Pharmacol. Sci.* 2003. 24. 96–102.
  27. Yallapu M.M., Jaggi M., Chaahan S.C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer // *Drug Discov. Today.* 2012. 17. 1–80.
  28. Wang S., Su R., Nie S. et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals // *J. Nutr. Biochem.* 2014. 25. 363–376.
  29. Zhang H., Grinstaff M.W. Recent advances in glycerol polymers: Chemistry and biomedical applications // *Macromol. Rapid. Commun.* 2014. 35. 1906–1924.
  30. Zheng Y.Y., Viswanathan B., Kesarwani P., Mehrotra S. Dietary agents in cancer prevention: an immunological perspective // *Photochem. Photobiol.* 2012. 88. 1083–1098.
  31. Zugic A., Jeremic I., Isakovic A. et al. Evaluation of anticancer and antioxidant activity of a commercially available CO<sub>2</sub> supercritical extract of old man's beard (*Usnea barbata*) // *PLoS ONE.* 2016. 11. ID e0146342.

## **ANTITUMOR PROPERTIES OF THE *CURCUMA LONGA* L. RHIZOMES GLYCERINE EXTRACT ON THE MICE MELANOMA B16 CELLS GROWTH MODEL**

**Gennadiy Yur'evich LYUBIMOV, Irina Alexandrovna GOLDINA,  
Konstantin Valentinovich GAYDUL, Vladimir Alexandrovich KOZLOV**

*Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Novosibirsk, Yadrincevskaya str., 14*

---

The aim of this study was to determine the antitumor activity of the turmeric rhizomes modified powder of glycerol extract on mouse melanoma B16 model. **Material and methods.** The study was performed on 30 female mice (CBA x C57BL / 6) F1. Beyond 7 days of the inoculation of melanoma cells, and within 21 days of the experiment the turmeric extract was added into the food of the experimental group animals. Modification of turmeric powder was carried out by the mechanical grinding with immobilization on polymeric carrier – dextrane 10,0 kD up to size of 20-100 nm. **Results.** The weight reduction of tumor foci in the muscles under the turmeric extract influence was identified, that indicates its anti-tumor properties.

---

**Key words:** curcuma, nanoparticles, extract, glycerin, melanoma B16, antitumor properties, mechanical modification.

*Lyubimov G.Yu. – candidate of medical sciences, researcher of the immunopoiesis regulation laboratory,  
e-mail: glubimov@rambler.ru*

*Goldina I.A. – researcher of the immunopoiesis regulation laboratory, e-mail: igoldina@mail.ru*

*Gaydul K.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the immunopoiesis regulation laboratory,  
e-mail: kgaidul@mail.ru*

*Kozlov V.A. – academician of RAS, doctor of medical sciences, professor, scientific adviser,  
e-mail: vkoz@yandex.ru*

## ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ВЫБОРУ ОБЪЕМА ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Алена Леонидовна ЧЕРНЫШОВА<sup>1</sup>, Лариса Александровна КОЛОМИЕЦ<sup>1</sup>,  
Сергей Эдуардович КРАСИЛЬНИКОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Томский НИИ онкологии  
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

<sup>2</sup> Государственный областной клинический онкологический диспансер  
630054, г. Новосибирск, ул. Плеханова, 2

Рак шейки матки занимает 4-е место в структуре женской онкологической заболеваемости. В настоящее время активно разрабатываются и внедряются новые медицинские технологии в лечении рака шейки матки – органосохраняющие и функционально-щадящие методики, направленные на повышение качества жизни больных и их полноценную медико-социальную реабилитацию. В статье представлен обзор литературы с использованием данных собственных исследований по целесообразности дифференцированного подхода к выбору тактики лечения больных с инвазивным раком шейки матки.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, лечение, сторожевые лимфатические узлы, трохелэктомия.

Рак шейки матки (РШМ) остается одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей у женщин, занимая 7-е место (9,8 %) в структуре женской онкологической заболеваемости. Ежегодно в Российской Федерации в течение последних 10 лет регистрируют до 15 тыс. впервые заболевших РШМ [8, 9]. Несмотря на постоянное совершенствование существующих методов лечения, разработку новых методов диагностики и лечения, средняя продолжительность жизни у данной категории пациентов остается низкой, при этом увеличения продолжительности жизни удается достигнуть лишь у больных с I–II стадиями заболевания.

В настоящее время стандартом хирургического лечения инвазивного РШМ остается расширенная экстирпация матки с придатками по неизменной технике операции Вертгейма, даже с учетом различных ее модификаций, предлагаемых рядом авторов [37]. Основной задачей операции Вертгейма является полноценное удаление параметральной клетчатки, которая может содержать опухолевые элементы при инвазивном РШМ. В то же время по мере накопления данных об этиологии и патогенезе РШМ, особенностях его течения и метастазирования изменились и

подходы к хирургическому лечению данного заболевания [6, 38]. Длительно существовавшая доктрина «малый рак – большая операция» постепенно перестает быть актуальной. Тенденция к увеличению объемов операций с целью повышения онкологической радикальности, наблюдавшаяся на протяжении многих лет, в последние годы заметно снизилась. В настоящее время активно разрабатываются и внедряются новые медицинские технологии в лечении РШМ – органосохраняющие и функционально-щадящие методики, направленные на повышение качества жизни больных и на их полноценную медико-социальную реабилитацию, о чем свидетельствует ряд публикаций, представленных в мировой литературе [8, 19, 35].

**Концепция сигнальных лимфатических узлов в органосохраняющем лечении инвазивного РШМ.** Применительно ко многим злокачественным новообразованиям внутренних локализаций и для РШМ в частности стратификация по стадиям на этапе предоперационной диагностики не является окончательной. На сегодня единственным надежным методом, который определяет состояние регионарных лимфатических узлов и стадирование опухолевого процесса, является

Чернышова А.Л. – д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения гинекологии, [alacher@list.ru](mailto:alacher@list.ru)

Коломиец Л.А. – проф., руководитель отделения гинекологии

Красильников С.Э. – д.м.н. проф., зав. гинекологическим отделением

морфологическое исследование удаленного препарата. Исследования в области молекулярной биологии показали, что онкологический процесс на определенном начальном этапе (иногда очень длительное время) может иметь локализованный характер, т.е. находиться в так называемой деме-тастатической фазе. В этот период опухолевые клетки еще не приобрели свойств, необходимых для формирования отдаленных метастазов. Поэтому в фазе локализованного опухолевого процесса применение методов локального контроля может быть достаточным, так как нет необходимости в методах системной терапии из-за отсутствия для нее мишеней [7, 15]. При этом результаты клинических исследований показали, что на определенных стадиях различных онкологических заболеваний увеличение радикализма в лечении не ведет к увеличению его эффективности [11].

В настоящее время в онкологической практике стала формироваться идеология органосохраняющего лечения злокачественных опухолей, основной принцип которой можно сформулировать как достижение максимальной эффективности терапии при минимальных осложнениях. Однако до настоящего времени каких-либо четких критериев, кроме как размер первичной опухоли и состояние регионарных лимфатических узлов, для отбора больных в группы органосохраняющего лечения не определено [25, 29]. Одним из обязательных компонентов радикального лечения онкологических заболеваний является воздействие на регионарные лимфатические узлы, т.е. на органы периферической иммунной системы, контролирующей область расположения опухоли. При этом необходимо учитывать возможные осложнения, такие как лимфатические отеки конечностей, венозные тромбозы вен, плекситы, фиброз мягких тканей, функциональные и косметические дефекты, которые являются следствием хирургического или лучевого воздействия на регионарные лимфатические бассейны [26, 31]. Кроме того, состояние регионарных лимфатических узлов отражает метастатический потенциал опухоли. Сами региональные метастазы свидетельствуют о том, что опухолевые клетки стали способны к метастазированию, в том числе и гематогенному [23].

Доступные в настоящее время неинвазивные методы исследования (эхография, компьютерная и магнитно-резонансная томографии, радионуклидная диагностика) не могут дать четкого ответа о наличии или отсутствии метастазов в лимфатических узлах. Диагностировать микрометастазы возможно только морфологическими или молекулярно-биологическими методами,

для которых необходима ткань опухоли, которую можно было бы исследовать под микроскопом [27, 39].

Концепция биопсии сигнальных лимфоузлов приобретает все большее признание и введена для многих локализаций опухолей в стандарты хирургического лечения Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC). Определение сигнального, или сторожевого, лимфатического узла (СЛУ) как анатомически постоянно расположенного первого лимфатического узла на пути лимфатического оттока от органа впервые было дано Gould почти полвека назад (в 1960 г.) и дополнена Cabanas в 1977 г. Концепция биопсии СЛУ основана на предположении, согласно которому метастазы в регионарных лимфатических узлах возникают в определенном порядке, который обусловлен анатомическими особенностями лимфооттока от того или иного отдела органа. При этом, как правило, один или несколько регионарных лимфатических узлов, называемых «сторожевыми», первыми оказываются на пути оттока лимфы и, следовательно, первыми поражаются мигрирующими с током лимфы опухолевыми клетками [3, 5]. Кроме того, определение СЛУ представляет собой более чувствительный метод, чем тазовая лимфаденэктомия.

**Пути метастазирования и методы определение «сторожевых» лимфатических узлов при РШМ.** Лимфогенный путь метастазирования имеет ведущее значение в распространении РШМ. Клинические наблюдения показывают, что чаще всего метастазы при РШМ обнаруживаются в следующих шести группах лимфатических узлов, являющихся для шейки матки регионарными: околошеечных (парацервикальных), околоматочных (параметральных), запирающих, внутренних подвздошных, наружных подвздошных и общих подвздошных. Значительно реже наблюдается метастазирование РШМ в околоаортальные и паховые лимфатические узлы [1, 12]. Перечисленные группы узлов, в свою очередь, могут быть подразделены на три подгруппы: первичная (околошеечные и околоматочные), промежуточная (наружные и внутренние подвздошные, запирающие) и вторичная (общие подвздошные, околоаортальные и паховые лимфатические узлы) [33, 40]. Определены два основных пути лимфогенного метастазирования при РШМ. Первый путь: от околошеечных и околоматочных узлов к наружным подвздошным и запирающим, а затем к околоаортальным и значительно реже – паховым лимфатическим узлам. Второй основной путь: от околошеечных и околоматочных узлов к внутренним подвздошным, а затем к общим подвздошным и околоаортальным лим-

фатическим узлам [13, 18]. Распространение раковых клеток может происходить как по одному из этих путей, так и по обоим, а также только с одной стороны или с обеих сторон одновременно [20]. Этапы лимфогенного метастазирования РШМ: I этап – наружные, внутренние подвздошные и запираемые группы лимфоузлов; II – общие подвздошные лимфатические узлы; III – поясничные лимфатические узлы; IV – лимфоузлы средостения и надключичных областей.

В большинстве случаев отмечается этапность поражения лимфатического аппарата при РШМ. Однако многообразие путей лимфооттока, широкие анастомозы отдельных групп лимфатических узлов друг с другом, непостоянное функционирование лимфатических сосудов и узлов нередко нарушают эту закономерность и предопределяют вариабельность локализации лимфогенных метастазов. Необходимо отметить, что РШМ достаточно длительно протекает как локорегиональный процесс. Интраперитонеальная диссеминация встречается преимущественно при наличии прямого прорастания опухоли в брюшную полость. Гематогенное метастазирование РШМ наблюдается при значительном местном распространении заболевания, а также в случаях прогрессирования после комбинированного лечения. Кроме того, при метастатическом поражении лимфоузлов таза может наблюдаться ретроградное метастазирование в паховые лимфатические узлы [21].

В настоящее время выделяют следующие основные методы определения СЛУ: контрастно-визуальный метод, изотоп-ассоциированный и сочетанный (краситель + изотоп). При контрастно-визуальном способе парацервикально и в ткань опухоли вводится специальный синий краситель. Происходит пигментная индикация лимфоузлов, и сигнальные лимфатические узлы выявляются наглядно во время операции, в ходе которой удаляются прокрашенные СЛУ, затем проводится лимфаденэктомия зон регионарного метастазирования. Большинство красителей протестировано для биопсии СЛУ. Синий изосульфат доступен только в США, тогда как в Европе широко используется запатентованный сине-фиолетовый контраст – Patent V. В России в настоящее время зарегистрированных красителей нет. Изотоп-ассоциированный метод включает в себя два способа определения СЛУ: обнаружение на коже места его проекции (hot spot) и интраоперационное обнаружение СЛУ с помощью ручного гамма-сканера [36].

Для выполнения не прямой обзорной радиоизотопной лимфосцинтиграфии радиофармпрепарат вводится парацервикально по 0,25 мл в 4 точки вокруг опухоли, соответственно 13, 16,

19 и 22 часов условного циферблата, отступая от видимых границ опухоли на 5–10 мм, он избирательно проникает в лимфатические капилляры, достигает лимфатических узлов и накапливается в них. Оценка состояния регионарных лимфатических коллекторов и поиск СЛУ проводится посредством обзорной сцинтиграфии, с использованием стационарного компьютерного гамма-томографа до операции спустя 2–24 часа после введения радиофармпрепарата.

Для интраоперационного поиска используется портативный гамма-сканер, обладающий возможностью контактного определения уровней радиоактивности искомых лимфоузлов. Сканер снабжен встроенным коллиматором, позволяющим с большой точностью локализовать источник фотонного излучения и получать достоверную информацию о распределении радиофармпрепарата в тканях и органах пациента. При этом «сторожевым» считается тот лимфатический узел, радиоактивность которого превышает радиоактивность прочих лимфатических узлов более чем в 3 раза [6].

Продолжаются споры о том, какой из двух перечисленных методов лучше. В настоящее время большинство исследователей полагают, что контрастно-визуальный и изотоп-ассоциированный методы дополняют друг друга, и обнаружение СЛУ является более успешным при комбинации методов [10, 22]. На основании анализа данных литературы можно отметить, что использование радиофармпрепарата эффективнее (88,5 %), чем синего красителя (83,9 %). Оптимальным является сочетанное использование обеих методик, в этом случае вероятность обнаружения СЛУ значительно возрастает (91,4 %) [14].

В настоящее время проводится ряд исследований СЛУ при гинекологическом раке. В 2008 г. опубликованы результаты европейского многоцентрового исследования, посвященного изучению прогностической значимости и особенностей анатомического распределения СЛУ при РШМ. Идентификация СЛУ проводилась комбинированным способом (технеций + синий изосульфат) с последующим полным удалением тазовых и парааортальных лимфоузлов. Положительная детекция СЛУ составила 96,1 %, из них у 5,5 % больных выявлены метастазы в СЛУ, при этом ни у одной пациентки не было выявлено метастатического поражения лимфоузлов без поражения СЛУ. Кроме того, выявлены следующие особенности анатомического распределения СЛУ: 83,5 % – наружные подвздошные артерии, 8,5 % – общие подвздошные, 5,1 % – пресакральные и ретросакральные лимфатические узлы и 2,7 % – в параметральной клетчатке [32].

Согласно результатам ряда исследователей, СЛУ в ряде случаев находятся в параметральной клетчатке достаточно близко к шейке матки, что значительно затрудняет их детекцию во время операции [6, 22]. Максимальное количество СЛУ было выявлено в запирающей ямке (50,4 %), 31,4 % – на наружной подвздошной артерии, 15,2 % – на внутренней подвздошной артерии, 6 % – на общей подвздошной артерии, в двух случаях – в области кардинальных связок. Односторонние СЛУ выявлены в 52,9 % случаев, что можно объяснить вероятным односторонним лимфатическим дренажем малого таза.

Аналогичные результаты получены в исследованиях других ученых, где СЛУ выявлены в 85 % случаев, при этом метастатическое поражение непосредственно СЛУ составило 10 %, а случаев метастатического поражения лимфатических узлов, минуя «сторожевые», не выявлено. Чувствительность метода составила 92 %. При оценке показателей чувствительности определения СЛУ, согласно ряду сообщений, чувствительность варьирует от 71 до 100 %, специфичность составляет 100 %, а диагностическая точность – от 75 до 100 % [16].

Концепция определения СЛУ дополняет современные тенденции в минимально инвазивной хирургии РШМ, но все еще остается экспериментальным методом и не введена в широкую клиническую практику в качестве компонента комплексного обследования и лечения больных РШМ. Необходимы дальнейшие проспективные рандомизированные исследования, касающиеся прогностического значения микрометастазов в СЛУ, а также новых технологий определения статуса лимфатических узлов, включая молекулярные маркеры. Эти усилия могут оптимизировать стадирование регионарной диссеминации опухолей и, соответственно, выбор адекватного лечения [5, 34]. Дальнейшие исследования позволят избежать расширенных операций и не только ограничиться удалением СЛУ на ранних стадиях заболевания, но и определить показания для возможности проведения органосохраняющего лечения даже при инвазивном РШМ. А также наоборот, расширить объем операции или дополнить лечение химио- или лучевой терапией при обнаружении лимфогенных метастазов вне зоны, удаляемой при проведении стандартной лимфодиссекции. Использование двойного контрастирования – радионуклидного и с помощью синего красителя – позволяет легче и точнее находить лимфатические узлы и, соответственно, производить адекватную лимфаденэктомию.

Анализ целого ряда исследований анатомо-топографических особенностей расположения

СЛУ продемонстрировал отсутствие каких-либо закономерностей, но определена тенденция – наибольшее их количество выявлено на общей и наружной подвздошной артерии, при этом латеральная и медиальная часть параметриев поражаются одинаково часто. Исследование СЛУ, по мнению ряда авторов, может сократить объем вмешательства и минимизировать тем самым травматичность и риск послеоперационных осложнений примерно у трети больных, у которых по статистике отсутствуют лимфогенные метастазы, что в конечном итоге приведет к значительному улучшению качества их жизни [1, 17].

Появление метода точной клинической оценки состояния регионарных лимфатических узлов способствует сокращению времени и затрат на морфологическое исследование, уточнению стадии заболевания, индивидуализации объема оперативного вмешательства, в том числе определяя показания к органосохраняющему лечению, а также более адресному применению адъювантной терапии [16].

**Современные принципы хирургического лечения инвазивного РШМ.** В настоящее время хирургические вмешательства, выполняемые при инвазивном РШМ, классифицированы по 5 типам [31].

*Тип А. Экстрафасциальная гистерэктомия:*

- латеральный параметрий удаляют до мочеточников;
- мочеточник не туннелируется;
- передний и задний параметрий не удаляют;
- сосуды удаляют максимально близко к матке;
- практически не выполняют резекцию влагалища.

*Тип В. При гистерэктомии типа В проводят:*

- туннелирование мочеточника;
- частичную резекцию крестцово-маточной связки;
- частичную резекцию пузырно-маточной связки;
- резекцию парацервикальной связки на уровне мочеточникового туннеля.

*Тип С. При гистерэктомии типа С проводят:*

- удаление латерального параметрия до подвздошных сосудов;
- резекцию переднего параметрия (пузырно-маточной связки) до мочевого пузыря;
- резекцию заднего параметрия (крестцово-маточной связки) до прямой кишки;
- полную мобилизацию мочеточника.

*Тип С<sub>1</sub> (с сохранением тазового нерва):*

- латеральный параметрий – сохранение висцерального нерва (splanchnic nerves);

- вентральный параметрий – сохранение пупырной ветви тазового сплетения;
- дорсальный параметрий – сохранение гипогастриального нерва (рис. 4).

*Тип С<sub>2</sub> (без сохранения тазового нерва):*

- латеральный параметрий – пересечение висцерального нерва (splanchnic nerves);
- вентральный параметрий – пересечение пупырной ветви тазового сплетения;
- дорсальный параметрий – все ветви гипогастриального нерва пересечены.

*Тип D. Латеральная параметрэктомия:*

- линия резекции проходит между внутренней запирающей мышцей и пояснично-крестцовым нервным сплетением;
- выполняют резекцию внутренних подвздошных артерий и вен.

По данным литературы, наиболее значимыми прогностическими факторами при инвазивном РШМ, влияющими на выбор тактики лечения, являются размер опухоли, глубина стромальной инвазии, опухолевая инфильтрация параметриев, метастатическое поражение тазовых лимфатических узлов, дифференцировка опухоли и инвазия лимфоваскулярного пространства [1, 8]. Нерешенным остается вопрос о прогностической ценности такого фактора, как инвазия лимфоваскулярного пространства с опухолевыми эмболами в лимфатических щелях. В ряде исследований показано, что наличие опухолевой эмболии приводит к уменьшению 5-летней выживаемости на 25–40 %. Но при проведении стандартизации по другим основным факторам прогноза предсказательное значение ИЛВП не подтвердилось [30]. Так же существенное влияние на течение и прогноз и показатели выживаемости больных РШМ оказывает опухолевая инфильтрация параметриальной клетчатки. При отсутствии инфильтрации пятилетняя выживаемость достигает 95 %, а при вовлечении параметриев в опухолевый процесс – лишь 65–69 % [16]. Пациентки с поражением параметриальной клетчатки нуждаются в проведении адьювантного лечения, что является противопоказанием для проведения органосохраняющего лечения.

В настоящее время ведущими онкогинекологами мира широко обсуждается вопрос о целесообразности параметрэктомии при РШМ, так как частота поражения параметриев при опухолях небольших размеров (до 2 см) составляет 0,6–4 %. В исследовании Benedetti-Panici et al. [14], посвященном изучению анатомических и патогенетических аспектов параметриальной клетчатки, показано, что лимфатические узлы в параметрии расположены хаотично как в медиальной, так и в латеральной его частях. При этом прямое рас-

пространение опухоли на параметрий происходит достаточно редко. Наличие метастатических очагов в таких случаях является результатом опухолевой эмболии сосудов или поражения лимфоузлов кардинальных связок. С одной стороны, это свидетельствует о целесообразности выполнения полной параметрэктомии, вплоть до стенок таза [35]. С другой стороны, очевидно, что это необходимо далеко не всегда. В тех случаях, когда клинически опухоль ограничивается только шейкой матки, как правило, нет изменений в дистальных отделах параметриальной клетчатки. Дальнейшее изучение проблемы параметрэктомии позволит в некоторых случаях снизить агрессивность хирургических вмешательств в условиях сохранения онкологической безопасности. В этой связи наиболее информативным методом интраоперационной диагностики может быть определение СЛУ с интраоперационным гистологическим исследованием [20, 41].

Ряд нерандомизированных исследований показал, что наиболее вероятной причиной рецидивов РШМ является неполное удаление соединительнотканной части мезометрия, прилежащей к мезоректуму. Применение адьювантной лучевой терапии после операции Вертгейма снижает риск рецидивов в малом тазу, но не повышает общую выживаемость больных РШМ с высоким риском прогрессирования. По данным исследований проф. L. Ungar показано улучшение показателей выживаемости за счет тотального удаления параметриев, содержащих лимфатические сосуды и узлы. Согласно разработанной проф. L. Ungar методике, в случаях наличия метастазов в тазовых лимфатических узлах, подтвержденных гистологически, целесообразно проведение расширенной параметрэктомии (LER – laterally extended parametrectomy), которая подразумевает удаление внутренних подвздошных сосудов и клетчатки, лежащей латерально от них, при этом клетчаточное и соединительнотканное содержимое малого таза (пузырно-маточные связки, паракольпий, латеральный параметрий, крестцово-маточные связки) удаляют единым блоком с маткой и верхней третью влагалища [35].

Хирургические операции по поводу инвазивного РШМ в классическом варианте ведут к полной потере репродуктивной функции, а также часто сопровождаются нарушением нормального функционирования мочевыделительной и половой систем. Частота расстройств мочеиспускания после операции на шейке матки составляет 78 %, частота половых расстройств – до 90 %. Основной вероятной причиной этих нарушений является операционная травма элементов тазовой вегетативной нервной системы, иннервирующих

органы мочевой и половой систем и располагающихся в непосредственной близости от области вмешательства [29]. Основными симптомами нарушения функции мочевой системы являются задержка мочеиспускания или недержание мочи разной степени выраженности [28]. Нарушения функций половой системы у женщин проявляются в виде расстройств вагинальной секреции и ритмичных сокращений влагалища [33]. Потеря фертильности, высокая частота мочевых и половых функциональных нарушений, а также урологических осложнений при расширенной гистерэктомии дали толчок для развития функционально-щадящих и органосохраняющих направлений в хирургии инвазивного РШМ. Таким образом, в настоящее время произошло существенное изменение взглядов на объемы хирургического вмешательства при инвазивном РШМ, актуальным направлением стали разработка и внедрение в клиническую практику органосохраняющих и функционально-щадящих подходов, большое внимание уделяется проблемам качества жизни, сохранения фертильности и медико-социальной реабилитации.

**Органосохраняющее лечение инвазивного РШМ.** В последнее десятилетие для лечения инвазивного РШМ IA2-IB2 стадии по классификации FIGO у больных репродуктивного возраста разрабатывается и все более широко внедряется органосохраняющая операция – радикальная абдоминальная трахелэктомия (РАТ), которая может выполняться как вагинальным, так и трансабдоминальным доступом. Целью органосохраняющего лечения у больных РШМ является сохранение детородной функции без ущерба онкологической радикальности лечения.

Трансабдоминальный доступ позволяет проводить операции при размерах опухоли до 6 см, IA2-IB2 стадии FIGO [4], в отдельных случаях при IB2-IIA стадии при размерах опухоли до 4 см и отсутствии признаков метастазирования [14]. Суть РАТ состоит в полном или частичном удалении шейки матки с околошеечной и паравагинальной клетчаткой, верхней трети влагалища, пузырно-маточной, кардинальных и крестцово-маточных связок, подвздошных (общих, наружных, внутренних) и obturatorных лимфатических узлов. При этом сохраняются яичники, маточные трубы и тело матки с внутренним зевом, что и обеспечивает возможность последующей беременности и родов. В первую очередь выполняют тазовую лимфаденэктомию и удаленные лимфоузлы подвергают срочному гистологическому исследованию. В зависимости от его результатов ход операции корректируется. В случае метастатического поражения лимфоузлов объем

операции изменяется до операции Вертгейма. При благоприятном результате – отсутствии опухолевых клеток в лимфоузлах – выполняют второй этап РАТ – удаление шейки матки с парацервикальной, параметральной клетчаткой и верхней третью влагалища. Интактность проксимального края резекции шейки матки подтверждают при срочном гистологическом исследовании [2]. Операцию завершают формированием маточно-влагалищного анастомоза [27]. В отличие от операции Вертгейма, при данных операциях сохраняются тело матки и придатки. Полная эпителизация зоны маточно-влагалищного анастомоза, как правило, наступает в сроке 8–12 недель после операции. По статистическим данным [4], жизнеспособность матки сохраняется у 100 %, а менструальный цикл – у 93 % больных.

В настоящее время доказана онкологическая эффективность, а также имеются данные об успешном наступлении беременности и родов после проведения РАТ [35]. Что касается некоторых технических аспектов ее выполнения, то наиболее важным является изучение влияния пересечения маточных сосудов при выполнении операции на дальнейшую беременность в связи с тем, что в данной ситуации остается только один источник артериального кровотока для тела матки (яичниковые артерии). По данным Ungar и Palfalvi, кровоснабжение матки только через яичниковые сосуды после РАТ позволяет сохранить жизнеспособность матки у всех женщин, а менструальную функцию – у 93 % из них [37]. Авторы доказывают возможность нормального течения беременности и рождения здоровых детей массой более 3 кг после проведения РАТ с пересечением маточных сосудов [32]. Ungar и Palfalvi считают целесообразным сохранять маточные артерии при выполнении РАТ только во время беременности [37].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение современных методов интраоперационной диагностики СЛУ, разработка и внедрение новых методик органосохраняющего и функционально-щадящего методов лечения определяют тенденции в современной инвазивной хирургии РШМ. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут оптимизировать стадирование регионарной диссеминации опухолей и, соответственно, индивидуализировать выбор объема лечения [5], в ряде случаев позволят избежать расширенных операций и определить показания для возможности проведения органосохраняющего лечения даже при инвазивном РШМ, так же как и расширить объем

операции или дополнить лечение химио- или лучевой терапией при обнаружении лимфогенных метастазов вне зоны, удаляемой при стандартной лимфодиссекции. В то же время внедрение представленных методов исследования и методик оперативного вмешательства в повседневную клиническую практику для определения объема хирургического вмешательства требует дополнительных рандомизированных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багшии М.С., Каррам М.К. Атлас анатомии таза и гинекологической хирургии / пер. с англ. Е.Л. Яроцкой; ред. Л.В. Адамян. Лондон: Elsevier Ltd., 2009. 1172 с.
2. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Шашова Е.Е. и др. Активность протеасом в опухолях женской репродуктивной системы // Биоорганич. химия. 2012. 38. (1). 106–110.
3. Семглазов В.Ф. Новое направление в сберегательном и органосохраняющем хирургическом лечении злокачественных опухолей // Мед. вестн. 2009. (35). 12–24.
4. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. и др. Активность протеасом и их субъединичный состав при гиперпластических процессах и раке эндометрия // Опухоли жен. репродуктивной системы. 2011. (4). 64–67.
5. Унгар Л., Нечушкина В.М. Почему нужно выполнять расширенные операции при раке шейки матки // Сиб. онкол. журн. 2013. (3). 5–12.
6. Чернышова А.Л., Ляпунов А.Ю., Коломиец Л.А. и др. Определение сторожевых лимфатических узлов при хирургическом лечении рака шейки матки // Сиб. онкол. журн. 2012. (3). 28–33.
7. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Крицкая Н.Г., Суходоло И.В. Апудоциты при пролиферативных процессах эндометрия // Сиб. науч. мед. журн. 2005. 25. (3). 37–40.
8. Чернышова А.Л. Прогноз и особенности клинического течения рака эндометрия на фоне метаболического синдрома: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2009.
9. Чойнзонов Е.Л., Писарева Л.Ф., Жуйкова Л.Д. Злокачественные новообразования в Томской области в 2004–2009 гг. Оценка качества диагностики // Сиб. онкол. журн. 2011. (3). 29–34.
10. Abu-Rustum N.R., Neubauer N., Sonoda Y. et al. Surgical and pathologic outcomes of fertility-sparing radical abdominal trachelectomy for FIGO stage IB1 cervical cancer // Gynecol. Oncol. 2008. 111. (2). 261–264.
11. ACOG Practice Bulletin, Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. No. 35, May 2002: Diagnosis and treatment of cervical carcinomas // Obstet. Gynecol. 2002. 99. 855–866.
12. Altgassen C., Hertel H. Multicenter validation study of the sentinel lymph node concept in cervical cancer: AGO Study Group // J. Clin. Oncol. 2008. 26. 2943–2951.
13. Averette H.E., Nguyen H.N., Donato D.M. et al. Radical hysterectomy for invasive cervical cancer: a 25-year experience with the Miami technique // Cancer. 1993. 71. 1422–1437.
14. Benedetti-Panici P., Maneschi F., D'Andrea G. et al. Early cervical carcinoma: the natural history of lymph node involvement redefined on the basis of thorough parametrectomy and giant section study // Cancer. 2000. 88. 2267–2274.
15. Chernofsky M.R., Felix J.C., Muderspach L.I. et al. Influence of quantity of lymph node vascular space invasion on time to recurrence in women with early-stage squamous cancer of the cervix // Gynecol. Oncol. 2006. 100. 288–293.
16. Cibula D., Abu-Rustum N.R. Pelvic lymphadenectomy in cervical cancer-surgical anatomy and proposal for a new classification system // Gynecol. Oncol. 2010. 116. 33–37.
17. Cibula D., Velechovska P., Sláma J. et al. Late morbidity following nerve-sparing radical hysterectomy // Gynecol. Oncol. 2010. 116. 506–511.
18. Courtney M. Surgery versus chemoradiation as first line therapy for stage IB2 cervical cancer. Abstracts of the 41st Annual Meeting on Women's Cancer of the Society of Gynecologic Oncologists. March 10–17, 2010. San Francisco, California, USA // Gynecol. Oncol. 2010. 116. (Suppl. 3). S2–S169.
19. Covens A., Rosen B., Murphy J. et al. How important is removal of the parametrium at surgery for carcinoma of the cervix? // Gynecol. Oncol. 2002. 84. 145–149.
20. Darlin L., Persson J., Bossmar T. The sentinel node concept in early cervical cancer performs well in tumors smaller than 2 cm // Gynecol. Oncol. 2010. 117(2). 266–269.
21. Diaz J.P., Sonoda Y., Leitao M.M. Oncologic outcome of fertility-sparing radical trachelectomy versus radical hysterectomy for stage IB1 cervical carcinoma // Gynecol. Oncol. 2008. 111. (2). 255–260.
22. Eiriksson L.R., Covens A. Sentinel lymph node mapping in cervical cancer: the future? // BJOG. 2012. 119. (2). 129–133.
23. Fader A.N., Edwards R.P., Cost M. Sentinel lymph node biopsy in early-stage cervical cancer: utility of intraoperative versus postoperative assessment // Gynecol. Oncol. 2008. 111. (1). 13–17.
24. Hazewinkel M.H., Sprangers M.A., van der Velden J. et al. Long-term cervical cancer survivors suffer from pelvic floor symptoms: across-sectional matched cohort study // Gynecol. Oncol. 2010. 117. 281–286.
25. Hertel H., Köhler C., Grund D. Association of Gynecologic Oncologists (AGO): Radical vaginal

trachelectomy (RVT) combined with laparoscopic pelvic lymphadenectomy: prospective multicenter study of 100 patients with early cervical cancer // *Gynecol. Oncol.* 2006. 103. (2). 506–511.

26. Höckel M., Horn L.C., Manthey N. et al. Resection of the embryologically defined uterovaginal (Müllerian) compartment and pelvic control in patients with cervical cancer: a prospective analysis // *Lancet Oncol.* 2009. 10. 683–692.

27. Kara P.P., Ayhan A., Caner B. Sentinel lymph node detection in early stage cervical cancer: a prospective study comparing preoperative lymphoscintigraphy, intraoperative gamma probe, and blue dye // *Ann. Nucl. Med.* 2008. 22. (6). 487–494.

28. Landoni F., Maneo A., Colombo A. et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage I/b-II/a cervical cancer // *Lancet.* 1997. 350. 535–540.

29. Landoni F., Maneo A., Zarpardiel I. et al. Class I versus class III radical hysterectomy in stage IB1-IIA cervical cancer. A prospective randomized study // *EJSO.* 2012. 38. 203–209.

30. Niikura H., Okamura C., Akahira J. Sentinel lymph node detection in early cervical cancer with combination <sup>99m</sup>Tc phytate and patent blue // *Gynecol. Oncol.* 2004. 94. 528–532.

31. Ogawa S., Kobayashi H., Amada S. Sentinel node detection with (<sup>99m</sup>Tc) phytate alone is satisfactory for cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy // *Int. J. Clin. Oncol.* 2010. 15. (1). 52–58.

32. Palfalvi L., Ungar L. Laterally extended parametrectomy (LEP), the technique for radical pelvic side wall dissection: Feasibility, technique and results // *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2003. 13. 914–917.

33. Piver M.S., Rutledge F., Smith J.P. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer // *Obstet. Gynecol.* 1993. 44. 265–272.

34. Seong S.J., Park H., Yang K.M. Detection of sentinel lymph nodes in patients with early stage cervical cancer // *J. Korean Med. Sci.* 2007. 22. (1). 105–109.

35. Tarnai L., Ungár L., Pálfalvi L. et al. Femoral artery embolism in patients undergoing a laterally extended parametrectomy (LEP) procedure // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2011. 32. 401–402.

36. Undurraga M., Loubeyre P., Dubuisson J.B. et al. Early-stage cervical cancer: is surgery better than radiotherapy? // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2010. 10. 451–460.

37. Ungar L., Palfalvi L. Surgical treatment of lymph node metastases in stage IB cervical cancer: the laterally extended parametrectomy (LEP) procedure // *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2003. 13. 647–651.

38. Wang S.S., Sherman M.E., Silverberg S.G. et al. Pathological characteristics of cervical adenocarcinoma in a multicenter US-based study // *Gynecol. Oncol.* 2006. 103. 541–546.

39. Wertheim E. The extended abdominal operation for carcinoma uteri (based on 500 operative cases) // *Am. J. Obstet. Dis. Women Child.* 1912. 66. 169–232.

40. Du X.L., Sheng X.G., Jiang T. et al. Sentinel lymph node biopsy as guidance for radical trachelectomy in young patients with early stage cervical cancer // *BMC Cancer.* 2011. 11. 157.

41. Yamashita T., Katayama H., Kato Y. Management of pelvic lymph nodes by sentinel node navigation surgery in the treatment of invasive cervical cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2009. 19. (6). 1113–1118.

## **DIFFERENTIATED APPROACH TO THE CHOICE OF THE EXTENT OF SURGERY FOR PATIENTS WITH INVASIVE CERVICAL CANCER**

**Alena Leonidovna CHERNYSHOVA<sup>1</sup>, Larisa Aleksandrovna KOLOMIETS<sup>1</sup>,  
Sergey Eduardovich KRASILNIKOV<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Tomsk Cancer Research Institute  
634050, Tomsk, Kooperativny lane, 5*

<sup>2</sup> *State Regional Cancer Center  
630054, Novosibirsk, Plakhotnoy str., 2*

---

Cervical cancer is the 4th most common cancer in women worldwide. Currently, novel approaches to treatment of cervical cancer, namely organ-preserving and function-sparing surgeries, aimed to improve life quality of patients and their medical and social rehabilitation are being developed and actively implemented. We present a literature review using data from our studies on the feasibility of a differentiated approach to the choice of tactics in treatment of patients with invasive cervical cancer.

---

**Key words:** cervical cancer, treatment, sentinel lymph nodes, trachelectomy.

*Chernyshova A.L. – doctor of medical sciences, leading researcher of department for gynecology,  
e-mail: alacher@list.ru*

*Kolomiets L.A. – professor, head of department for gynecology*

*Krasilnikov S.E. – doctor of medical sciences, professor, head of department for gynecology*

## АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОГЕННЫХ ПРО- И АНТИОКСИДАНТОВ ЖЕЛЕЗА И МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

Владимир Иванович ЩЕРБАКОВ<sup>1</sup>, Иван Михайлович ПОЗДНЯКОВ<sup>2,3</sup>,  
Анна Владимировна ШИРИНСКАЯ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *НИИ экспериментальной и клинической медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52*

<sup>3</sup> *Новосибирский городской клинический перинатальный центр  
630089, г. Новосибирск, ул. Адриена Лежена, 32*

Проведен комплексный анализ содержания мочевого кислоты, сывороточного железа, их соотношения, а также других показателей при преэклампсии различной степени тяжести. Наиболее значимыми из исследуемых маркеров, характеризующих тяжесть преэклампсии, были уровень протеинурии, систолическое артериальное давление, содержание креатинина, кальция и активность трансаминаз в сыворотке крови. Концентрация мочевого кислоты и сывороточного железа повышалась по мере утяжеления преэклампсии. Тяжелая гиперурикемия, при которой возможна кристаллизация мочевого кислоты, наблюдалась только при тяжелой форме преэклампсии. Этот фактор может еще более осложнять работу почек, нарушенную при данной форме патологии. Полученные результаты указывают на то, что для характеристики степени тяжести преэклампсии одновременное определение содержания мочевого кислоты и железа более информативно, чем исследование величин данных показателей по отдельности.

**Ключевые слова:** мочевого кислота, преэклампсия, сывороточное железо.

Преэклампсия (ПЭ) осложняет 4–6 % всех беременностей, что в абсолютных цифрах составляет примерно 8 370 000 случаев в мире ежегодно [10] и служит важной причиной материнской, фетальной и неонатальной заболеваемости и гибели [1]. В рамках ведущего в настоящее время иммунологического направления в изучении развития ПЭ [3, 15] успешно развивается цитокиновая гипотеза индукции артериальной гипертензии [14], что является новым разделом изучения этих молекул межклеточной коммуникации при различной патологии беременности, таких как гестационная артериальная гипертензия (АГ), ПЭ.

Эндогенные антиоксиданты, в том числе мочевого кислота (МК), представляют важную линию защиты против окислительного повреждения тканей, что особенно важно в условиях беременности [2], где такое повреждение нарушает нормальный вектор развития эмбриона

или плода, так называемое «нарушенное программируемое развитие» [6], закладывая основы различной патологии в последующей жизни. Существует мнение, что на МК приходится более 50 % антиоксидантной активности крови [7]. Открытие новых свойств МК как эндогенного сигнала опасности [13], который обладает функцией распознаваемого иммунной системой эндогенного адьюванта [16], дало импульс для расширения спектра исследований в этой области, в том числе и в акушерстве. Выявлено, что МК наряду с антиоксидантным может оказывать и провоспалительное действие [4]. МК способна тормозить миграцию вневорсинчатого трофобласта [8], который осуществляет ремоделирование спиральных артерий, обеспечивающих адекватный ток крови для развития плаценты и плода [5]. Благодаря способности хелатировать железо МК может ограничивать его токсическое действие.

*Щербаков В.И. – д.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии репродукции,  
e-mail: Shcherbakov\_VI@mail.ru*

*Поздняков И.М. – д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии, главный врач*

*Ширинская А.В. – врач-акушер-гинеколог, e-mail: anncharm2004@mail.ru*

Оценка степени тяжести ПЭ является важной задачей практического акушерства. Работ по изучению роли МК в комплексе с сывороточным железом при ПЭ в отечественной литературе крайне мало.

Цель исследования – определение содержания в сыворотке крови МК и железа как веществ с анти- и прооксидантными свойствами при ПЭ разной степени тяжести и анализ возможности использования этих показателей при оценке ее выраженности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи на базе Новосибирского городского клинического перинатального центра (НГКПЦ) обследованы 153 беременные третьего триместра с ПЭ разной степени тяжести, которые были разделены на три группы: 61 беременная с ПЭ средней степени тяжести, 41 беременная с тяжелой формой ПЭ и 51 женщина с физиологически протекающей беременностью (контроль). Обследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», на участие в нем все лица дали информированное согласие.

Всем женщинам выполнялось полное клинико-лабораторное и ультразвуковое исследование. Содержание МК и железа в сыворотке крови определяли с использованием стандартных наборов Bioson и Fluitest (Германия) на биохимическом анализаторе Architect C8000 (Abbott, США). Для разделения ПЭ на разные подгруппы (среднюю

и тяжелую) использовали критерии Pennington и соавт. [18], основанные на классификации Американского общества акушеров-гинекологов и МКБ-10.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), и представляли в виде  $M \pm m$ . Различия между группами оценивали с помощью критериев Стьюдента и  $\chi^2$ , достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Женщины исследуемых групп не различались по возрасту (табл. 1). Отеки наблюдались почти в половине случаев при ПЭ средней степени тяжести и более чем в половине случаев при тяжелой ПЭ. Уровень протеинурии и систолическое артериальное давление при тяжелой ПЭ были выше, чем при ПЭ средней степени тяжести, более чем в 6 раз, а количество естественных родов – меньше (см. табл. 1). Масса тела новорожденного была ниже, чем в контроле, при ПЭ средней степени тяжести (на 25 %) и, особенно, при тяжелой ПЭ (на 39 %). Отражением этого также является шкала Апгар, по которой регистрировалось снижение показателя как при средней, так и при тяжелой ПЭ. Масса плаценты при средней ПЭ имела тенденцию, а при тяжелой была достоверно снижена по сравнению с контролем.

Как видно из табл. 2, уровень общего белка в сыворотке крови при преэклампсии средней степени тяжести имел тенденцию к снижению, в то время как при тяжелой ПЭ был достоверно сни-

Таблица 1

Клинические характеристики исследуемых групп

Показатель	Контроль, $n = 30$	ПЭ средней степени тяжести, $n = 55$	Тяжелая ПЭ, $n = 42$
Возраст матери, лет	$27,20 \pm 1,00$	$29,96 \pm 0,82$	$28,88 \pm 0,92$
Срок гестации, недель	$40,00 \pm 0,50$	$35,14 \pm 0,45^*$	$33,68 \pm 0,37^*$
Естественные роды, %	100,0	55,9*	11,9*.#
Отеки, %	0,0	45,8*	57,1*
Протеинурия, г/л	0,00	$0,60 \pm 0,25^*$	$3,76 \pm 0,50^*.\#$
Систолическое давление, мм рт. ст.	$111,0 \pm 1,2$	$149,8 \pm 1,2^*$	$165,0 \pm 2,7^*.\#$
Диастолическое давление, мм рт. ст.	$69,0 \pm 2,8$	$96,7 \pm 0,7^*$	$101,0 \pm 1,6^*$
Масса тела ребенка, г	$3425 \pm 45$ ( $n = 20$ )	$2581 \pm 124^*$	$2091 \pm 123^*.\#$
Масса плаценты, г	$546,0 \pm 13,3$ ( $n = 20$ )	$536,8 \pm 29,4^*$	$457,0 \pm 19,4^*.\#$
Оценка по шкале Апгар:			
1-я минута	$8,00 \pm 0,00$	$7,08 \pm 0,17$	$7,16 \pm 0,07$
5-я минута	$8,00 \pm 0,00$	$7,47 \pm 0,18$	$7,54 \pm 0,09$

Примечание. Здесь и в табл. 2 на рисунке обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей группы контроля (\*) группы пациенток с преэклампсией средней степени тяжести (#).

Таблица 2

## Биохимические показатели исследуемых групп

Показатель	Контроль	ПЭ средней степени тяжести	Тяжелая ПЭ
Содержание общего белка, г/л	63,86 ± 0,67 (n = 25)	62,08 ± 0,88 (n = 56)	59,86 ± 0,96* (n = 43)
Содержание глюкозы, ммоль/л	4,58 ± 0,10 (n = 10)	4,73 ± 0,10 (n = 52)	4,77 ± 0,10 (n = 44)
Содержание креатинина, мкмоль/л	49,93 ± 1,80 (n = 10)	62,28 ± 2,81* (n = 50)	67,83 ± 4,25* (n = 40)
Содержание кальция, ммоль/л	2,22 ± 0,10 (n = 12)	2,05 ± 0,08 (n = 33)	2,07 ± 0,04 (n = 33)
Содержание магния, ммоль/л	0,79 ± 0,17 (n = 10)	1,02 ± 0,09 (n = 27)	1,30 ± 0,15 (n = 31)
Содержание мочевины, ммоль/л	3,016 ± 0,122 (n = 30)	4,430 ± 0,224* (n = 55)	5,059 ± 0,270* (n = 42)
Активность щелочной фосфатазы, ЕД/л	223,42 ± 13,33 (n = 12)	322,94 ± 18,85* (n = 47)	333,42 ± 22,57* (n = 33)
Активность АлАТ, ЕД/л	16,70 ± 2,67 (n = 10)	27,50 ± 4,30* (n = 55)	20,91 ± 2,80 (n = 44)
Активность АсАТ, ЕД/л	25,39 ± 1,74 (n = 10)	35,02 ± 2,82* (n = 55)	36,15 ± 3,91* (n = 44)
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	7,45 ± 0,543 (n = 28)	8,02 ± 0,785 (n = 55)	7,62 ± 1,02 (n = 42)

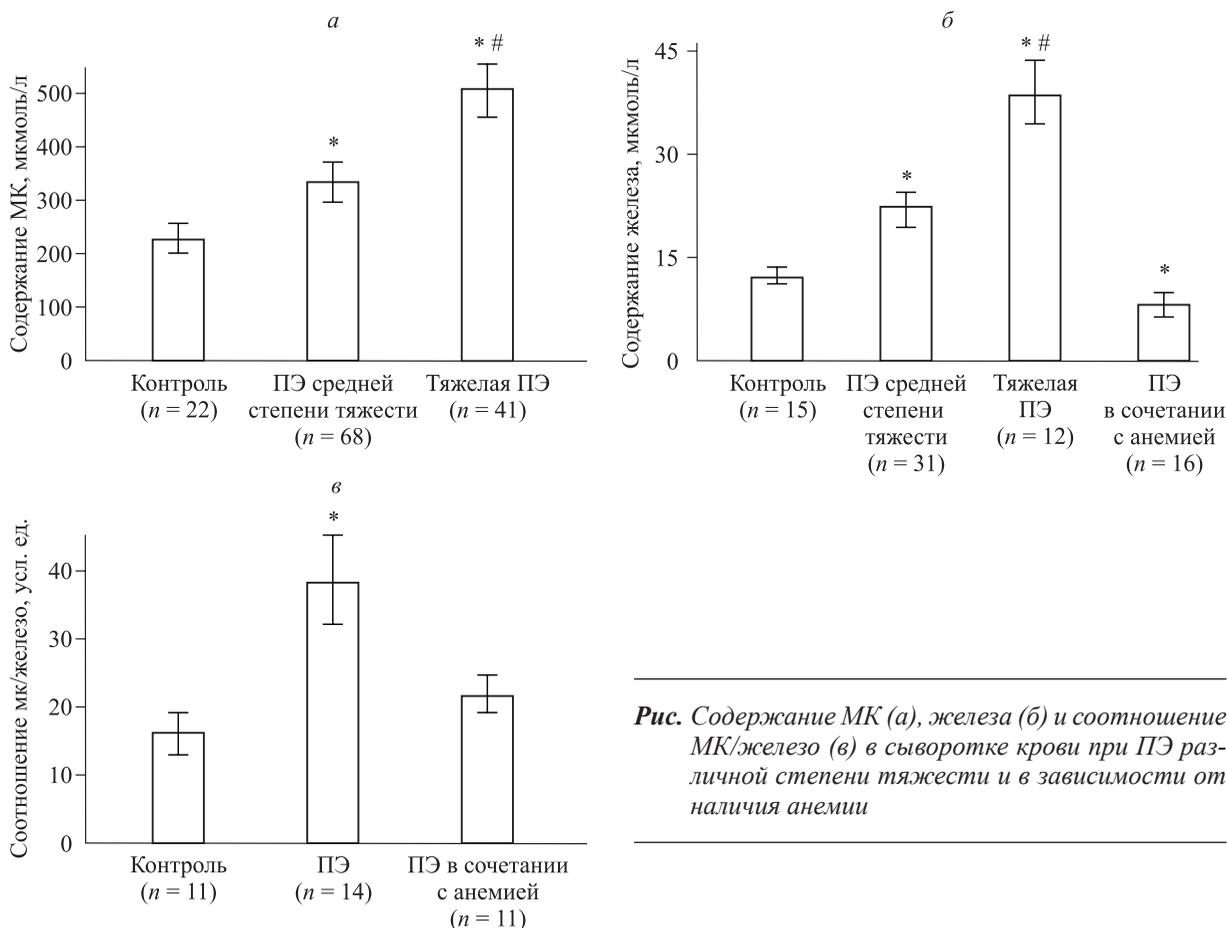
жен по сравнению с контролем. Уровень глюкозы был примерно одинаков во всех группах. Содержание креатинина и мочевины повышалось как при средней, так и при тяжелой ПЭ. Концентрация кальция уменьшалась в обоих случаях относительно контроля, при этом индивидуальные показатели при ПЭ средней степени тяжести в 30,3 %, а при тяжелой ПЭ – в 42,8 % случаев были меньше референсных значений нижней границы диапазона нормы, заданной для анализатора (2,10–2,55 ммоль/л). Такие показатели функционального состояния гепатоцитов, как активность щелочной фосфатазы и трансаминаз, также были повышены при ПЭ.

Как видно из рисунка *a*, уровень МК при ПЭ средней степени тяжести был повышен по сравнению с контролем. При тяжелой ПЭ этот показатель был еще больше, превышая содержание МК как при нормально протекающей беременности, так и при ПЭ средней степени тяжести. Таким образом, степень увеличения концентрации МК в сыворотке крови может быть связана с тяжестью ПЭ. Подтверждением этому служит выявленный нами факт, что только при тяжелой ПЭ отмечалась тяжелая гиперурикемия (содержание МК более 714 мкмоль/л [17]). Наиболее вероятно, что увеличение концентрации МК в сыворотке крови связано с нарушением функции почек, через

которые выводится этот продукт пуринового обмена. Несомненно и то, что образование МК при ПЭ усилено из-за повышенного уровня АТФ при этом состоянии. Важно также, что классическая гипоурикемия, когда уровень МК составляет менее 120 мкмоль/л, сравнительно редко встречается при беременности – менее чем в 2 % случаев (анализ 101 случая беременности, неопубликованные данные).

Изучение содержания сывороточного железа показало аналогичную МК динамику параметра (рисунок, *б*). Анализ индивидуальных показателей выявил, что в наиболее высоких концентрациях (> 50 мкмоль/л) железо обнаруживалось в сыворотке крови только пациенток, страдающих ПЭ в тяжелой форме. Выявленное нами нарушение обмена железа при ПЭ может вести к развитию окислительного стресса. Известно, что ПЭ часто осложняется анемией [9]. В рамках настоящего исследования установлено, что ПЭ средней степени тяжести осложнялась анемией в 40 % случаев, в то время как при тяжелой ПЭ этот показатель достигал 60 %. Как видно из рисунка *б*, уровень сывороточного железа у матерей с ПЭ в сочетании с железodefицитной анемией был почти в 2 раза ниже контроля.

Работа в течение нескольких лет на базе НГКПЦ с параллельным определением МК и же-



**Рис.** Содержание МК (а), железа (б) и соотношение МК/железо (в) в сыворотке крови при ПЭ различной степени тяжести и в зависимости от наличия анемии

железа показала полезность вычисления соотношения МК/железо при учете того, что МК действует как хелатор железа [12]. Как видно из рисунка в, величина данного индекса у пациенток с ПЭ без анемии почти в 2 раза меньше, чем у женщин, страдающих ПЭ в сочетании с анемией. Очевидно, нагрузка на МК как хелатор железа при анемии меньше, чем без анемии. Увеличение соотношения МК/железо говорит также о том, что в условиях дефицита Fe соотношение между ним и МК нарушено. Это, с одной стороны, может служить механизмом утяжеления тяжести течения ПЭ, а с другой – являться предиктором ее тяжести. Остается открытым вопрос – развитие анемии при ПЭ представляет собой протективный механизм (как защита от окислительного стресса) или осложнение?

Анализ индивидуальных данных показывает, что даже при тяжелой форме ПЭ в 30 % случаев уровень железа находится в пределах референсных значений диапазона нормы, заданной для анализатора. Это, вероятно, указывает на протекание в организме двух противоположно направленных процессов: во-первых, при ПЭ как системном воспалении тормозится всасывание железа в 12-перстной кишке, во-вторых, под влиянием

провоспалительных цитокинов происходит высвобождение железа из связывающих его структур, и преобладание того или иного процесса сопровождается снижением либо повышением содержания железа в сыворотке крови. Наши данные также показывают, что анемию, развившуюся на фоне тяжелой ПЭ, нельзя отнести к железодефицитным, так как концентрация сывороточного железа при этом состоянии не снижена. Другими словами, механизм развития анемии при ПЭ более сложен и, вероятно, связан с нарушением обмена железа, обусловленного преобладанием провоспалительных цитокинов при этой патологии.

Возможен и другой механизм нарушения обмена железа при ПЭ, обусловленный поляризацией макрофагов, которые играют ключевую роль в гомеостазе железа. Известно, что физиологическая беременность связана с альтернативно активированными макрофагами (M2), в то время как при ПЭ идет переключение на классическую активацию макрофагов (воспалительные M1-клетки). Известно, что в состоянии M2 макрофаги способны эффективно осуществлять рецилинг железа, в то время как в состоянии M1 – в меньшей степени [11].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При ПЭ в сыворотке крови повышается уровень антиоксиданта – МК, и прооксиданта – железа. Используя данные показатели, а также их соотношение, можно оценивать степень тяжести ПЭ. Исследование содержания МК, железа и их соотношения в сыворотке крови полезно для определения тактики ведения беременности, осложненной ПЭ, в совокупности с другими клинико-лабораторными критериями.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макаров О.В., Ткачева О.Н., Волкова Е.В. Преэклампсия и хроническая артериальная гипертензия. Клинические аспекты. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 130 с.
2. Поздняков И.М., Ширинская А.В. Мочевая кислота и железо сыворотки крови при беременности, осложненной артериальной гипертензией // Бюл. СО РАМН. 2013. 33. (4). 85–88.
3. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунные факторы в этиологии и патогенезе осложнений беременности // Акушерство и гинекология. 2012. (1). 128–136.
4. Титов В.Н., Дмитриев В.Н., Гущина О.В. и др. Физико-химическая активность мочевой кислоты. Гиперурикемия – нарушение биологических функций эндоекологии и адаптации, биологических реакций и гидродинамического артериального давления // Успехи соврем. биологии. 2011. 131. (5). 483–502.
5. Щербаков В.И. Плацента и ее роль в патогенезе преэклампсии. Новосибирск: Изд-во СГУПС, 2012. 200 с.
6. Щербаков В.И., Рябиченко Т.И., Скосырева Г.А., Трунов А.Н. Механизмы внутриутробного программирования ожирения у детей // Рос. вестн. перинатол. и педиатрии. 2013. (5). 8–14.
7. Alvarez-Lario B., Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution // Rheumatology. 2010. 49. (11). 2010–2015.
8. Bainbridge S.A., Roberts J.H., von Versen-Hoynck F. et al. Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009. 297. (2). C440–C450.
9. Bilano V.L., Ota E., Ganchimeg T. et al. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: a WHO secondary analysis // PLoS One. 2014. 9. (3). e91198.
10. Chappell L.C., Enye S., Seed P. et al. Adverse perinatal outcomes and risk factors for preeclampsia in women with chronic hypertension // Hypertension. 2008. 51. (4). 1002–1009.
11. Corna G., Campana L., Pignatti E. et al. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages // Haematologica. 2010. 95. (1). 1814–1822.
12. Davies K.J.A., Sevanian A., Muakkassan-Kelly S., Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid // Biochem. J. 1986. 235. (3). 747–754.
13. Ghaemi-Oskonie F., Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation // Curr. Rheumatol. Rep. 2001. 13. (2). 160–166.
14. Giardina J.B., Green G.H., Cockrell K.L. et al. TNF- $\alpha$  enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. 283. (1). R130–R143.
15. Laresgoiti-Servitje E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia // J. Leukoc. Biol. 2013. 94. (2). 247–257.
16. Martinon F. Detection of immune danger signal by NALP3 // J. Leukoc. Biol. 2008. 83. (3). 507–511.
17. Messerli F.H., Frohlich E.D., Dreslinski G.R. et al. Serum uric acid in essential hypertension: an indicator of renal vascular involvement // Ann. Intern. Med. 1980. 93. (6). 817–821.
18. Pennington K.A., Schlitt J.H., Jackson D.L. et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease // Dis. Model. Mech. 2012. 5. (1). 9–18.

## **ANALYSIS OF CONTENT OF ENDOGENOUS PRO- AND ANTIOXIDANTS OF IRON AND URIC ACID IN BLOOD SERUM AT PREECLAMPSIA**

**Vladimir Ivanovich SHCHERBAKOV<sup>1</sup>, Ivan Mikhaylovich POZDNYAKOV<sup>2,3</sup>,  
Anna Vladimirovna SHIRINSKAYA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Research Institute of Experimental and Clinical Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

<sup>3</sup> *Novosibirsk Perinatal Center  
630089, Novosibirsk, Adrien Lezhen str., 32*

---

The complex biochemical analysis of content of uric acid, serum iron, ratio uric/ iron and other markers at preeclampsia of different severity has been conducted. The level of proteinuria, systolic arterial pressure, content of creatinin and calcium, transaminase activity in blood serum are the main markers to detect the severity of preeclampsia. The level of uric acid and serum iron depends on severity of preeclampsia. Severe hyperuricemia, when crystallization of uric acid is possible, has been observed only at severe preeclampsia. This factor can yet more complicate the work of kidney, broken at such pathology. The data obtained show that the simultaneous detection of uric acid and iron levels is more informative for definition of preeclampsia severity extent than separate research of these factors.

---

**Key words:** uric acid, preeclampsia, serum iron.

*Shcherbakov V.I. – doctor of medical sciences, researcher of laboratory of immunology,  
e-mail: Shcherbakov\_VI@mail.ru*

*Pozdnyakov I.M. – doctor of medical sciences, professor of the chair for obstetrics and gynecology, the chief doctor  
Shirinskaya A.V. – obstetrician-gynecologist, e-mail: anncharm2004@mail.ru*

## СВЯЗАННЫЕ СО СТАРЕНИЕМ ИЗМЕНЕНИЯ ПОЛУШАРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ У МУЖЧИН И ЖЕНЩИН

Нина Валерьевна ВОЛЬФ<sup>1,2</sup>, Елизавета Владимировна ШИН<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ физиологии и фундаментальной медицины  
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Проведено исследование эффективности полушарных процессов памяти, выраженности ориентировочной реакции и их взаимосвязей у молодых и пожилых испытуемых. Обнаружено связанное со старением снижение эффективности процессов памяти и увеличение выраженности ориентировочной реакции. Наибольшие изменения этих показателей были связаны с правым полушарием мозга. Половые различия проявлялись в большей сохранности левополушарных вербальных функций у женщин по сравнению с мужчинами в пожилом возрасте. Только у пожилых женщин выявлена взаимосвязь между воспроизведением дихотически предъявленных слов с левого уха и правополушарной ориентировочной реакцией.

**Ключевые слова:** старение, кратковременная память, дихотический тест, ориентировочная реакция.

В настоящее время опубликовано большое количество данных, касающихся снижения памяти при старении. Наряду с этим показана значительная гетерогенность этих изменений, существование больших межиндивидуальных различий между людьми одного и того же возраста [2]. Увеличивающаяся с возрастом вариативность связывают с влиянием генетических, средовых факторов, уровня здоровья и различием процедур, применяемых для тестирования памяти. Исследование пожилых испытуемых без клинических нарушений дает более однородные результаты. Однако и среди них наблюдается значительные различия в эффективности процессов памяти и внимания [20]. Стремительно увеличивающееся количество экспериментальных данных, документирующих различия в организации когнитивных функций у мужчин и женщин [5, 11], указывает на необходимость учета половых различий при изучении ментального старения.

Наиболее четко половые различия проявляются при анализе эффективности выполнения ряда вербальных и образно-пространственных заданий. С применением электрофизиологических методов, позитронной эмиссионной томографии, функциональных магнитно-резонансных исследований обнаружены качественные различия у мужчин и женщин в нейрофизиологических основах этих когнитивных функций. Важным

является факт обнаружения половых различий в организации фронтальной коры [8], которая в настоящее время рассматривается как структура, имеющая ключевое значение для процессов памяти [12]. При изучении изменений мозга в ходе старения показано, что фронтальная кора и связанные с ней функции наиболее подвержены возрастным изменениям [4] и являются основными факторами возрастных проявлений когнитивного дефицита [16, 19]. Учитывая, что при выполнении речевых заданий наблюдается активация преимущественно левого полушария у мужчин и билатеральная активация у женщин, основанием для изучения половых различий в возрастных изменениях вербальной и образной памяти являются данные об опережающей деградации функций правого полушария при старении, а также о разных показателях возрастной редукции мозолистого тела, обеспечивающего межполушарную коммуникацию, у мужчин и женщин.

Исследование эффективности запоминания дихотически предъявленной вербальной информации дает возможность охарактеризовать не только возрастные изменения эффективности этого процесса, но и определить его полушарные особенности. В настоящее время имеются лишь единичные исследования половых различий в эффективности процессов полушарной обработки вербальной информации в пожилом возраст-

*Вольф Н.В.* – д.б.н., зав. лабораторией физиологии когнитивной деятельности, e-mail: [volf@physiol.ru](mailto:volf@physiol.ru)  
*Шин Е.В.* – студентка, e-mail: [liza.sheen@gmail.com](mailto:liza.sheen@gmail.com)

те. Джэгер с соавторами [14] обнаружили, что при идентификации дихотически предъявленных предложений в пожилом возрасте происходит ухудшение воспроизведения как с правого, так и с левого уха, однако в последнем случае эффект более значителен. Половые различия характеризовались большей выраженностью правополушарного дефицита у пожилых мужчин по сравнению с женщинами. Однако половые различия были лишь близки к уровню достоверности. Данные Беллиса и Вилбера [3], полученные с предъявлением цифровых стимулов, в значительной степени согласуются с этими результатами, однако в их исследовании установлено, что половые различия характеризуются более ранним проявлением правополушарного дефицита в ходе старения у мужчин и затем исчезают в преклонном возрасте. В то же время при предъявлении слогов не обнаружено половых и даже возрастных различий в их воспроизведении [10, 13]. Таким образом, при старении наиболее четко возрастные изменения и половые различия проявляются при предъявлении списков цифр и предложений, т.е. заданий, подразумевающих включение процессов сохранения и обработки информации в кратковременной памяти. Показано, что эффективность процессов кратковременной памяти связана со способностью противостоять проявлению безусловной ориентировочной реакции [15] и игнорировать значимую информацию, поступающую по иррелевантному каналу при направленном внимании в дихотическом тесте [6, 7].

В задачу настоящего исследования входило изучение половых различий в связанных со старением изменениях полушарной организации вербальной и образной памяти и их взаимосвязей с латерализованными показателями ориентировочной реакции.

## МЕТОДИКА

*Испытуемые.* В исследовании принимали участие молодые (МИ,  $n = 216$ : 91 мужчина и 125 женщин) и пожилые (ПИ,  $n = 142$ : 67 мужчин и 75 женщин) испытуемые – студенты, аспиранты и сотрудники новосибирских университетов и научно-исследовательских институтов Сибирского отделения РАН. В первую группу входили люди в возрасте 19–35 лет, во вторую – старше 55 лет. Испытуемые не имели нарушений слуха, психических нарушений, травматических или иных поражений головного мозга. Для участия в исследовании не допускались лица с перенесенными инфарктами и диабетом. Все испытуемые дали информированное согласие на участие в исследовании, которое было одобрено Этическим

комитетом НИИ физиологии и фундаментальной медицины.

*Дихотическое тестирование.* Для определения латеральных характеристик запоминания слов использовали процедуру дихотического тестирования. Синхронно по одному слову в каждое ухо со скоростью одна пара в секунду предъявляли 10 пар одно- или двухсложных существительных с инструкцией распределения внимания. Использовали 7 списков слов, после каждого из них следовал период (1 мин) свободного письменного воспроизведения запомненных слов. Определяли количество запомненных слов, подававшихся в левое ухо (адресованных правому полушарию) и правое ухо (адресованных левому полушарию).

*Определение эффективности вербальной и образной кратковременной памяти.* Применяли компьютеризированную методику: в одной серии последовательно на экране монитора предъявляли для запоминания 10 трехбуквенных слогов, в другой – 10 простых геометрических фигур (время предъявления 1 с, интервал между стимулами 1 с). В каждой серии сразу после предъявления следовало определить, были ли эти целевые стимулы в случайной последовательности из 20 – соответственно слогов или фигур, среди которых 10 не предъявлялись ранее для запоминания. Испытуемые должны были нажимать на клавиши «да» и «нет» при появлении на экране соответственно знакомого или нового стимула. Регистрировали количество ошибок и среднее время реакции для слогов и фигур.

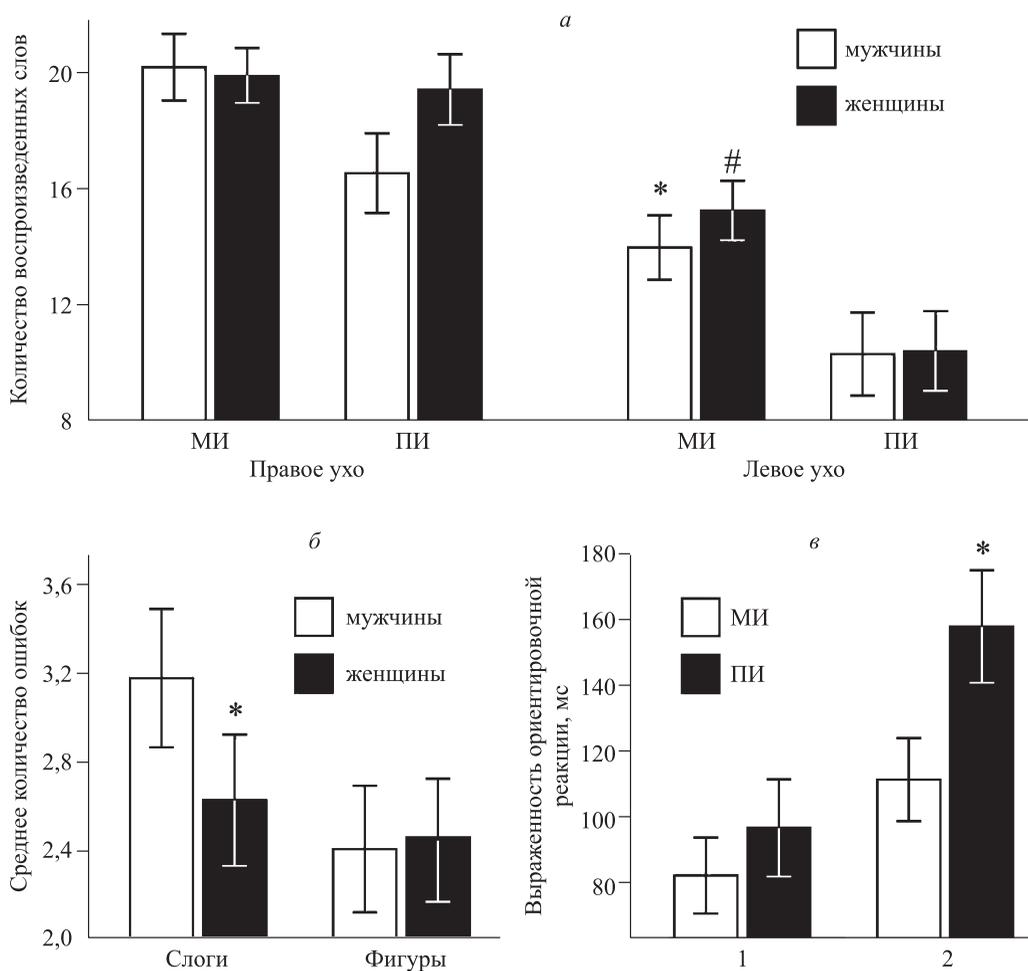
*Исследование латеральных характеристик ориентировочной реакции.* Для тестирования полушарных особенностей ориентировочной реакции использовали модифицированную задачу «odd ball» с латерализованным (справа или слева от центральной точки фиксации взгляда) предъявлением на экране монитора повторяющихся или новых объектов (предъявленных один раз). Испытуемые должны были нажимать на клавиатуре клавишу, обозначенную «да», при предъявлении кролика (по 15 предъявлений с каждой стороны) и клавишу, обозначенную «нет», при предъявлении любого другого стимула, среди которых был повторяющийся стимул «яблоко» (по 15 предъявлений с каждой стороны) и неожиданные новые стимулы (по 3 с каждой стороны). Задание выполняли последовательно правой и левой рукой. Латерализованные показатели ориентировочной реакции определяли как разность времени реакции «нет» на редкие и повторяющиеся стимулы отдельно для ситуаций предъявления стимула справа при реакции правой рукой и слева при реакции левой рукой.

Для оценки статистической достоверности результатов использовали дисперсионный анализ. Корреляции определяли по методу Спирмена.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Воспроизведение дихотически предъявленных списков слов. Дисперсионный анализ воспроизведения дихотически предъявленных списков слов, проведенный с учетом факторов ПОЛ, ВОЗРАСТ и ЛАТЕРАЛЬНОСТЬ, выявил значимость всех рассмотренных факторов: ПОЛ –  $F(1,333) = 5,46$ ,  $p = 0,020$ , ВОЗРАСТ –  $F(1,333) = 58,52$ ,  $p = 0,000$ , ЛАТЕРАЛЬНОСТЬ –  $F(1,333) = 201,48$ ,  $p = 0,000$ , а также взаимодействие факторов ВОЗРАСТ и

ЛАТЕРАЛЬНОСТЬ –  $F(1,333) = 5,48$ ,  $p = 0,020$ , ПОЛ, ВОЗРАСТ и ЛАТЕРАЛЬНОСТЬ –  $F(1,333) = 5,60$ ,  $p = 0,018$ . Половые различия были обусловлены более эффективным воспроизведением слов женщинами, возрастные – лучшим воспроизведением у МИ по сравнению с ПИ. Слова с правого уха воспроизводились лучше, чем слова с левого. Анализ взаимодействий показал, что в целом для испытуемых при старении характерно достоверное более значительное снижение эффективности запоминания слов с левого уха. Половые различия выявляются при сравнении влияния возраста на воспроизведение слов с правого уха: снижение у мужчин при отсутствии возрастных изменений у женщин (см. рисунок а).



**Рис.** Воспроизведение дихотически предъявленных слов с правого и левого уха молодыми и пожилыми мужчинами и женщинами (а: \*, # – отличие от величины соответствующего показателя у ПИ статистически значимо при  $p < 0,05$ ); половые различия в количестве ошибок при воспроизведении запомненных слогов и фигур (б: \* – отличие от величины соответствующего показателя у мужчин статистически значимо при  $p < 0,05$ ); возрастные различия в выраженности ориентировочной реакции при адресации стимулов левому и правому полушариям мозга (в: 1 – предъявление стимула справа и реакция правой рукой, 2 – предъявление стимула слева и реакция левой рукой; \* – отличие от величины соответствующего показателя у МИ статистически значимо при  $p < 0,05$ )

Полученные результаты согласуются с данными, свидетельствующими о большем влиянии процесса старения на функции правого полушария, в том числе более значительном дефиците при запоминании вербальной информации, предъявлявшейся в левое ухо при дихотическом тестировании [9, 14]. Тот факт, что возрастное снижение вербальной памяти, выявленное нами и Роуп с соавторами [17] при запоминании списков слов, наблюдается также при дихотическом тестировании с использованием списков цифр [3] и предложений [9, 14], но отсутствует при предъявлении слогов [10, 13], подтверждает точку зрения, согласно которой для выявления изменений памяти, связанных со способностями, предъявляемые задания должны включать когнитивную обработку запоминаемого материала [7].

Что касается данных о половых различиях в возрастных изменениях полушарных вербальных функций, то они немногочисленны и в основном не выявляют таких различий [10, 13, 14]. Лишь в работе [3] по результатам дихотического тестирования показано более раннее возникновение правополушарного дефицита у мужчин по сравнению с женщинами. В отличие от этого обнаруженные нами различия были связаны с эффективностью воспроизведения слов, адресованных левому полушарию, и характеризовались снижением этого показателя при старении у мужчин при отсутствии возрастных изменений у женщин. Ранее нами показано, что в применяемой в настоящем исследовании модели дихотического тестирования с предъявлением списков существительных женщины применяют более разнообразные стратегии обработки информации, широко используя способ объединения нескольких слов в структурные единицы [1]. Возможно, такая стратегия оказывается продуктивной в противостоянии возрастному снижению вербальной памяти, связанной с доминирующим в речевых функциях левым полушарием.

*Анализ узнавания ранее предъявленных для запоминания слогов и фигур.* Анализ ошибок при узнавании был проведен с выделением факторов ПОЛ, ВОЗРАСТ и ТИП ЗАДАНИЯ (вербальное, образное). В целом воспроизведение у МИ было более эффективным, чем у ПИ (ВОЗРАСТ –  $F(1,347) = 4,06$ ,  $p = 0,045$ ), а воспроизведение фигур эффективнее, чем воспроизведение слогов (ТИП ЗАДАНИЯ –  $F(1,347) = 16,925$ ,  $p = 0,000$ ). Значимым было также взаимодействие факторов ПОЛ и ТИП ЗАДАНИЯ –  $F(1,347) = 7,20$ ,  $p = 0,008$ . При воспроизведении фигур мужчины и женщины не различались по количеству допущенных ошибок. При воспроизведении слогов количество ошибок у мужчин существенно превы-

шало количество ошибок, сделанных женщинами (рисунок б). Анализ показателя скорости узнавания слогов и фигур выявил, что среднее время короче у ПИ, чем у МИ (ВОЗРАСТ –  $F(1,347) = 24,71$ ,  $p = 0,000$ ) и для слогов по сравнению с фигурами (ТИП ЗАДАНИЯ –  $F(1,347) = 15,74$ ,  $p = 0,000$ ). Однако от типа задания зависит скорость реакции только у МИ, и она одинакова для слогов и фигур у ПИ (взаимодействие факторов ВОЗРАСТ и ТИП ЗАДАНИЯ –  $F(1,347) = 15,33$ ,  $p = 0,000$ ). Полученные результаты в целом согласуются с данными о преимуществе женщин над мужчинами в вербальных функциях и свидетельствуют о сохранении этого преимущества на фоне связанного со старением угасания вербальной памяти, что соответствует теории когнитивного резерва [18]. Вопреки многочисленным данным об увеличении при старении времени реакции при выполнении различных заданий, при правильном распознавании слов и фигур нами выявлены более быстрые реакции у ПИ. Это может быть связано с возрастным снижением возможностей дополнительной когнитивной обработки последовательности быстро поступающих стимулов, что приводит к худшему сохранению, но более доступному извлечению из кратковременной памяти непреобразованной исходной информации.

*Анализ ориентировочной реакции.* Обнаружено, что ориентировочная реакция более выражена у ПИ (значимость фактора ВОЗРАСТ  $F(1,302) = 16,55$ ,  $p = 0,000$ ) и при адресации стимулов правому полушарию (ЛАТЕРАЛЬНОСТЬ  $F(1,302) = 41,19$ ,  $p = 0,000$ ). Выявлено также взаимодействие факторов ВОЗРАСТ и ЛАТЕРАЛЬНОСТЬ ( $F(1,302) = 5,11$ ,  $p = 0,024$ ). Последующий анализ взаимодействия показал, что возрастное усиление ориентировочной реакции наблюдалось только при адресации стимулов правому полушарию (рисунок в). Этот факт вновь свидетельствует в пользу влияния старения на функции преимущественно правого полушария. Анализ корреляций между показателями памяти и выраженностью ориентировочной реакции с поправкой на множественные сравнения выявил только одну значимую корреляцию: между воспроизведением слов, адресованных правому полушарию в дихотическом тесте, и правополушарной ориентировочной реакцией у пожилых женщин ( $r = 0,38$ ,  $p < 0,01$ ). Ранее показано, что при направленном внимании лучшее запоминание ассоциируется с игнорированием значимой информации, поступающей по иррелевантному каналу [6, 15]. Однако в ситуации распределенного внимания усиление правосторонней ориентировочной реакции может способствовать контра-

стированию поступающей в правое полушарие информации и быть позитивным фактором для повышения эффективности этого в наибольшей степени подверженного старению полушария.

Таким образом, старение сопровождается снижением эффективности процессов памяти и увеличением выраженности ориентировочной реакции. Наибольшие изменения были связаны с правым полушарием мозга. Половые различия проявлялись в большей сохранности левополушарных вербальных функций у женщин в пожилом возрасте. Полученные результаты имеют значение для разработки персонализированных программ когнитивного тренинга пожилых людей.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Черемисиной Елене Петровне, которая проводила инструктаж испытуемых и осуществляла контроль правильности выполнения ими процедур психометрического тестирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ, проект 15-06-10052.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вольф Н.В. Половые различия функциональной организации процессов полушарной обработки речевой информации. Ростов н/Д., 2000. 238 с.
2. Ardila A. Normal aging increases cognitive heterogeneity: Analysis of dispersion in WAIS-III scores across age // Arch. Clin. Neuropsychol. 2007. (22). 1003–1011.
3. Bellis T.J., Wilber L.A. Effects of aging and gender on interhemispheric function // J. Speech Lang. Hear. Res. 2001. (44). 246–263.
4. Cabeza R., Dennis N.A. Frontal lobes and aging: Deterioration and compensation // Principles of Frontal Lobe Function. N.Y., 2001. 628–652.
5. Cahill L. Why sex matters for neuroscience // Nat. Rev. Neurosci. 2006. (7). 477–484.
6. Conway A.R., Cowan N., Bunting M.F. The cocktail party phenomenon revisited: the importance

of working memory capacity // Psychon. Bull. Rev. 2001. (8). 331–335.

7. Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? // Prog. Brain Res. 2008. (169). 323–338.

8. Goldberg E. The new executive brain: frontal lobes in a complex world. N.Y., 2009. 352 p.

9. Golding M. The development of two speech based tests of central auditory function for Australian use // Austr. N. Z. J. Audiol. 2001. (23). 1–9.

10. Hagar B. A preliminary examination of aging and sex on dichotic listening performance. Christchurch, 2013. 166 p.

11. Halpern D.F. Sex differences in cognitive abilities. N. Y., 2000. 420 p.

12. Head D., Rodrigue K.M., Kennedy K.M., Raz N. Neuroanatomical and cognitive mediators of age-related differences in episodic memory // Neuropsychology. 2008. (22). 491–507.

13. Hirnstein M., Westerhausen R., Korsnes M.S., Hugdahl K. Sex differences in language asymmetry are age-dependent and small: A large-scale, consonant–vowel dichotic listening study with behavioral and fMRI data // Cortex. 2013. (49). 1910–1921.

14. Jerger J., Chmiel R., Allen J., Wilson A. Effects of age and gender on dichotic sentence identification // Ear Hear. 1994. (15). 274–286.

15. Kane M.J., Bleckley M.K., Conway A.R., Engle R.W. A controlled-attention view of working-memory capacity // J. Exp. Psychol. Gen. 2001. (130) 169–183.

16. Moscovitch M., Winocur G. The neuropsychology of memory and aging // The Handbook of Aging and Cognition. Hillsdale, 1992. 315–372.

17. Roup C.N., Wiley T.L., Wilson R.H. Dichotic word recognition in young and older adults // J. Am. Acad. Audiol. 2006. (17). 230–240.

18. Stern Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept // J. Int. Neuropsychol Soc. 2002. (8). 448–460.

19. West R.L. An application of prefrontal cortex function theory to cognitive aging // Psychol. Bull. 1996. (120). 272–292.

20. Wilson R.S., Beckett L.A., Barnes L.L. et al. Individual differences in rates of change in cognitive abilities of older persons // Psychol. Aging. 2002. (17). 179–193.

## **ASSOCIATED WITH AGING CHANGES IN HEMISPHERIC ORGANIZATION OF SHORT-TERM MEMORY IN MALES AND FEMALES**

**Nina Valerievna VOLF<sup>1,2</sup>, Elizaveta Vladimirovna SHIN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Research Institute of Physiology and Basic Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2*

---

The effectiveness of hemispheric memory processes and the intensity of the orienting reaction and their relationships were studied in young and elderly subjects. A decreased overall performance in all memory tests and increase in the intensity of the orienting reaction were observed in the older group. The greatest changes in these characteristics were associated with the right hemisphere of the brain. Gender differences were shown in the greater safety of verbal left hemisphere functions in women compared to men in old age. Only in older women the relationship between the memory for words from the left ear with orientating reaction to the left lateralized stimuli has been found.

---

**Key words:** aging, short-term memory, dichotic testing, orienting.

*Volf N.V. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of cognitive physiology, e-mail: volf@physiol.ru  
Shin E.V. – student, e-mail: liza.sheen@gmail.com*

## СВЯЗЬ ФАКТОРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО РИСКА С ВИДОМ СОСУДИСТОГО СОБЫТИЯ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Елена Владимировна УСАЧЕВА, Лариса Викторовна МИХАЙЛОВА,  
Анастасия Владимировна НЕЛИДОВА, Ольга Владимировна ЗАМАХИНА,  
Ирина Юрьевна МОГИЛЕВСКАЯ

Омский государственный медицинский университет Минздрава России  
644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

Цель исследования – установить распространенность факторов сердечно-сосудистого риска у пациентов с артериальной гипертензией в зависимости от наличия в анамнезе сосудистого события (инфаркта миокарда/инсульта). **Материал и методы.** В одномоментное исследование включено 60 пациентов с артериальной гипертензией в возрасте  $59,2 \pm 9,0$  года. 1-ю группу составили 20 пациентов, перенесших инфаркт миокарда, 2-ю группу – 21 пациент, перенесший инсульт, 3-ю группу – 19 пациентов без сосудистого события в анамнезе. **Результаты и их обсуждение.** Среди перенесших инфаркт миокарда больше, чем среди перенесших инсульт, доля мужчин (соответственно 80 и 20 %,  $p = 0,05$ ), курящих (65 и 48 %,  $p = 0,054$ ), имеющих сахарный диабет (40 и 24 %,  $p = 0,026$ ), являющихся инвалидами в трудоспособном возрасте (20 и 0 %,  $p = 0,014$ ), имеющих высокий уровень стресса (30 и 19 %,  $p = 0,049$ ). Пациенты, перенесшие инсульт, имеют более высокую степень артериальной гипертензии по сравнению с лицами, перенесшими инфаркт миокарда (соответственно 80 и 60 % пациентов с III степенью,  $p = 0,036$ ); они старше по возрасту, чем пациенты без сосудистого события в анамнезе (соответственно  $62,5 \pm 10,0$  и  $56,1 \pm 10,0$  года,  $p = 0,039$ ), имеют низкую приверженность к гипотензивной терапии (соответственно 14 и 42 % высокоприверженных,  $p = 0,05$ ). Причинами сохраняющегося высокого суммарного сердечно-сосудистого риска у пациентов с артериальной гипертензией являются: недостаточный контроль уровня артериального давления, содержания общего холестерина и недостаточно высокая приверженность к гипотензивной терапии. В статье описаны клинические фенотипы больных с артериальной гипертензией, при использовании которых можно предположить вероятность развития того или иного сосудистого события и разработать индивидуальные мероприятия по предотвращению его развития путем целенаправленной коррекции факторов сердечно-сосудистого риска.

**Ключевые слова:** факторы сердечно-сосудистого риска, артериальная гипертензия, сосудистое событие, инфаркт миокарда, инсульт, стресс, приверженность к гипотензивной терапии.

Артериальная гипертензия (АГ) является одним из самых распространенных заболеваний. В развитых странах она встречается у 15–20 % населения, а в России, согласно материалам исследования, проведенного в рамках целевой Федеральной программы «Профилактика и лечение артериальной гипертензии в Российской Федерации», распространенность АГ среди населения в 2009 г. составила 40,8 % [3]. Актуальность проблемы АГ определяется непосредственным влиянием этого заболевания на развитие сердечно-сосудистых осложнений и, как следствие, повышение сердечно-сосудистой смертности [8, 11]. Научной основой для снижения заболеваемо-

сти и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) служит концепция факторов риска (ФР) и суммарного сердечно-сосудистого риска (ССР). Суммарный ССР – это обобщенное значение сочетания тех или иных ФР, показывающее уровень прогнозируемого риска развития смертельных и несмертельных сердечно-сосудистых осложнений, выраженного в процентах [9]. Суть концепции состоит в том, что лишь у небольшой части лиц с АГ имеется изолированное повышение артериального давления (АД), у большинства же обнаруживаются другие сердечно-сосудистые ФР, которые могут потенцировать друг друга, что в совокупности дает более высокий суммарный

*Усачева Е.В.* – к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, e-mail: ElenaV.Usacheva@yandex.ru  
*Михайлова Л.В.* – к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней  
*Нелидова А.В.* – к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней  
*Замахина О.В.* – ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней  
*Могилевская И.Ю.* – студентка 6-го курса педиатрического факультета

ССР, чем сумма его компонентов, взятых по отдельности [8]. Результаты многих проспективных исследований показывают высокую распространенность этих ФР и доказывают их влияние на показатели и динамику смертности от ССЗ [2].

В РФ АГ – доминирующий ФР [9]. Уровень АД находится в независимой непрерывной связи с частотой таких сердечно-сосудистых событий, как инсульт (острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК)), инфаркт миокарда (ИМ), внезапная смерть, сердечная недостаточность и др. [8]. Считается, что все ФР являются общими для развития ИМ и ОНМК, при этом значимость отдельных ФР остается недостаточно изученной [1].

Цель исследования – установить распространенность факторов сердечно-сосудистого риска у пациентов с артериальной гипертензией в зависимости от наличия в анамнезе сосудистого события (инфаркта миокарда/инсульта).

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено одномоментное когортное клиническое исследование, в котором обследовано 60 пациентов с АГ в возрасте  $59,2 \pm 9,0$  года, поступивших в порядке неотложной помощи в терапевтическое и неврологическое отделения Городской клинической больницы № 1 им. А.Н. Кабанова г. Омска в период 2013–2014 гг. с диагнозом «Артериальная гипертензия». В 1-ю группу отобрали 20 пациентов с АГ, перенесших ИМ, во 2-ю группу – 21 пациент с АГ, перенесший инсульт (ОНМК), в 3-ю группу – 19 пациентов с АГ без сосудистого события в анамнезе. Давность сосудистого события в 1 и 2 группах была более 6 месяцев.

Кроме общеклинического обследования проводилось анкетирование с целью определения модифицируемых и немодифицируемых факторов ССР [9]. Индекс курящего человека (ИКЧ) рассчитывался по формуле: количество выкуренных в день сигарет  $\times$  число месяцев в году, во время которых человек курил (как правило, 12). Для получения сведений об уровне общего холестерина и креатинина сыворотки крови проанализирована первичная медицинская документация пациентов. Наличие избыточной массы тела определяли в соответствии с существующими рекомендациями ВОЗ, индекс массы тела рассчитывали по формуле: вес (кг)/рост ( $m^2$ ). Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) определяли по формуле СКД-ЕРИ (мл/мин/ $1,73 m^2$ ) [15].

Для контроля приверженности к гипотензивной терапии использовался опросник Мориски – Грин (шкала комплаентности) [7] –

клинико-психологическая тестовая методика, предназначенная для предварительной оценки комплаентности и скринингового выявления недостаточно комплаентных больных. Она состоит из четырех пунктов, касающихся отношения пациента к приему препаратов. В оригинальной шкале Мориски – Грин каждый пункт оценивается по принципу «Да-Нет», при этом ответ «Да» оценивается в 0 баллов, а ответ «Нет» – в 1 балл. Комплаентными (приверженными) считаются больные, набравшие 4 балла. Больные, набравшие 2 балла и менее, считаются не приверженными, а набравшие 3 балла – недостаточно приверженными и находящимися в группе риска по развитию неприверженности.

Для определения уровня психосоциального стресса использовался опросник Ридера [10], который подразумевает оценку 7 утверждений в баллах: 1 балл – да, согласен, 2 балла – скорее согласен, 3 балла – скорее не согласен, 4 балла – нет, не согласен. Для анализа рассчитывался средний балл, интерпретированный следующим образом: для мужчин 1–2 балла – высокий уровень стресса, 2,01–3 балла – средний уровень стресса, 3,01–4 балла – низкий уровень стресса; для женщин 1–1,82 балла – высокий уровень стресса, 1,83–2,82 балла – средний уровень стресса, 2,83–4 балла – низкий уровень стресса.

Количественные данные на предварительном этапе статистического анализа оценивали на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка [5]. Непрерывные переменные представлены при нормальном распределении в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ( $M \pm \sigma$ ), при распределении, отличном от нормального, – в виде медианы и межквартильных интервалов ( $Me$ , 25 %; 75 %). Номинальные данные представлены в виде относительных частот объектов исследования ( $n$ , %). Для оценки различий количественных данных использовали критерий Манна–Уитни, для номинальных данных – точный критерий Фишера и критерий Мак–Нимара при анализе соответственно несвязанных и связанных выборок. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе распределения пациентов по степеням АГ установлено, что больных с III степенью АГ было больше, чем с I и II: соответственно 41 (68,4 %), 5 (8,3 %) и 14 (23,3 %). Распределение пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп в зависимости от степени АГ представлено на рис. 1. Статистически значимых различий по степени АГ между

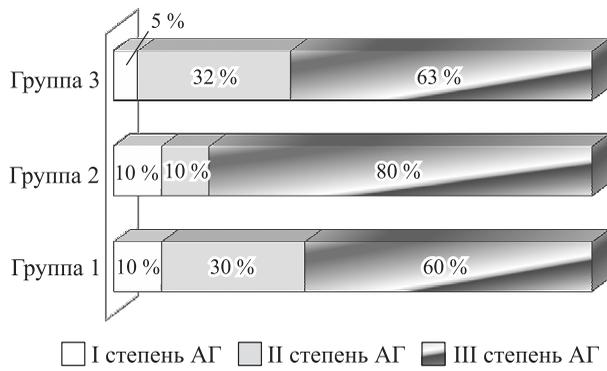


Рис. 1. Распределение пациентов в зависимости от степени артериальной гипертензии

1-й, 2-й и 3-й группами не выявлено, однако имелась тенденция к тому, что во 2-й группе пациентов с III степенью АГ было больше, чем в 1-й и 3-й группах (см. рис. 1). Это свидетельствует о том, что тяжесть АГ у пациентов, перенесших ОНМК, выше, чем у перенесших ИМ и у пациентов с АГ без сосудистого события в анамнезе. Из этого следует, что при более высокой степени АГ наиболее вероятно развитие ОНМК, нежели ИМ.

Именно своими осложнениями, которые часто приводят к инвалидизации и смерти больных, и опасна АГ [8]. Однако кроме достижения оптимального уровня АД для предотвращения сосудистых событий у пациентов с АГ требуется коррекция других факторов ССР [9]. Из *немодифицируемых* факторов сердечно-сосудистого риска мы проанализировали возраст, пол и отягощенный наследственный анамнез.

*Возраст* является хорошим маркером распространенности известных и неизвестных ФР ССЗ. Риск ССЗ возрастает с возрастом почти линейно: относительно молодые люди находятся в группе низкого абсолютного риска ССЗ, несмотря на то, что у них могут быть все другие ФР [14]. Средний возраст пациентов с АГ, включенных в наше исследование, составил  $59,2 \pm 9,0$  года. Средний возраст пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп составил  $58,7 \pm 5,0$ ,  $62,5 \pm 10,0$  и  $56,1 \pm 10,0$  года соответственно, при этом статистически значимые различия по возрасту выявлены только между 2-й и 3-й группами ( $p = 0,039$ ). Таким образом, пациенты с АГ, перенесшие ОНМК, были значимо старше пациентов с АГ без сосудистого события в анамнезе. Пациенты с АГ, перенесшие ИМ, по возрасту занимают промежуточное положение между пациентами с АГ, перенесшими ОНМК, и пациентами с АГ без сосудистого события в анамнезе. Следовательно, с возрастом увеличивается вероятность развития сначала ИМ, затем ОНМК, и чем старше пациент с АГ, тем выше у него риск развития такого сосудистого события, как ОНМК.

*Пол.* Половые гормоны играют определяющую роль в биологических различиях развития ССЗ у мужчин и женщин, в том числе в эпидемиологии, лечении и прогнозе [12]. Известно, что именно мужской пол является одним из значимых факторов ССР [6]. По данным нашего исследования, в совокупности пациентов, страдающих АГ, доля мужчин была выше (63 %). В 1-й группе доля мужчин была статистически значимо выше, чем во 2-й и 3-й группах ( $p = 0,05$ ). Так, соотношение мужчин и женщин в 1-й группе составило 80 и 20 %, во 2-й группе – 52 и 48 %, в 3-й группе – 58 и 42 % соответственно. То есть у пациентов мужского пола с АГ риск развития ИМ выше, чем ОНМК.

*Отягощенный наследственный анамнез.* Установлено, что наследственными факторами определяется 30–50 % всех случаев АГ в популяции, а родственники пациентов с АГ в среднем имеют более высокие уровни АД в любом возрасте в сравнении с родственниками нормотензивных лиц [13]. В нашем исследовании у пациентов с АГ отягощенный наследственный анамнез по сердечно-сосудистой патологии имело большинство (87 %) исследуемых, при этом статистически значимых различий по отягощенному наследственному анамнезу между пациентами 1-й, 2-й и 3-й групп не выявлено. Так, отягощенный по ССЗ наследственный анамнез имел место у 80, 91 и 89 % пациентов 1-й, 2-й и 3-й группы соответственно ( $p = 0,25$ ).

Если возраст, пол и наследственная отягощенность не поддаются коррекции, то существует большая группа ФР, которые пациенты должны если не ликвидировать, то свести их воздействие на развитие сосудистых событий к минимуму. Так, из *модифицируемых* ФР нами была изучена распространенность у пациентов с АГ *курения, дислипидемии, избыточной массы тела, сахарного диабета 2 типа (СД)* [9].

*Курение.* Всего курили 28 человек (47 %), среди пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп курящие составили соответственно 13 (65 %), 10 (48 %) и 5 человек (26 %), ИКЧ равнялся 34,5, 31,3 и 23,6, при этом статистически значимые различия по наличию курения были выявлены только между 1-й и 3-й группами ( $p = 0,017$ ), а также обнаружена тенденция к более высокому ИКЧ в 1-й группе ( $p = 0,054$ ) по сравнению со 2-й и 3-й группами. Пациенты с АГ, перенесшие ОНМК, курили чаще, чем пациенты с АГ без сосудистого события в анамнезе, но реже, чем пациенты с АГ, перенесшие ИМ. Таким образом, курение при АГ в большей степени повышает риск развития ИМ, нежели ОНМК.

**Дислипидемия.** У всех исследуемых с АГ содержание общего холестерина в сыворотке крови составляло 5,2 (4,2; 6,2) ммоль/л, в 1-й группе этот показатель составил 5,3 (4,1; 6,2) ммоль/л, во 2-й группе – 5,0 (4,1; 5,5) ммоль/л, в 3-й группе – 5,7 (5,0; 7,1) ммоль/л. В целом различий между группами не выявлено ( $p = 0,23$ ), в то время как при раздельном анализе установлено, что в 3-й группе уровень общего холестерина сыворотки крови был статистически значимо выше, чем во 2-й группе ( $p = 0,004$ ). Содержание холестерина в сыворотке крови обследованных пациентов зависит от приема ими статинов. В 1-й группе принимали статины 12 пациентов (60 %), тогда как во 2-й группе – только 4 (19 %). Обращает на себя внимание то, что пациенты 3-й группы статины не принимали, несмотря на наличие у части из них высокого уровня общего холестерина и, соответственно, высокого ССР. А пациенты 1-й и 2-й групп, которые обязаны принимать статины практически в 100 % случаев, врачебные рекомендации в полном объеме не выполняли, подвергая себя, таким образом, риску возникновения повторного сосудистого события.

Показатели липидного спектра крови контролировал 31 (52 %) пациент с АГ, в том числе 15 (75 %) лиц 1-й группы, 10 (48 %) – 2-й группы и только 6 (32 %) – 3-й группы. Можно предположить, что если бы все пациенты с АГ контролировали липидный спектр крови и, таким образом, могли своевременного его корректировать, то и вклад данного модифицируемого фактора ССР в развитие сосудистого события можно было свести к минимуму.

**Избыточная масса тела** является одним из самых распространенных факторов ССР в мире [3]. И если известно, что смертность от сосудистых событий, в частности от ИМ, растет пропорционально степени ожирения и ассоциируется с риском развития ИБС [9], то относительно ОНМК таких данных нет. В целом у исследуемых с АГ индекс массы тела составил 29,8 (26,0; 32,1) кг/м<sup>2</sup> (при норме от 18,5 до 25 кг/м<sup>2</sup>), в 1-й группе – 29,8 (26,4; 31,3) кг/м<sup>2</sup>, во 2-й группе – 31,6 (26,1; 32,6) кг/м<sup>2</sup>, в 3-й группе – 28,7 (24,7; 30,5) кг/м<sup>2</sup>. Доля лиц с ожирением среди пациентов с АГ составила 53 %, при этом в 1-й группе избыточная масса тела была у 12 (60 %) пациентов, во 2-й группе – у 13 (62 %), в 3-й группе – у 7 (37 %). Статистически значимых различий между 1-й, 2-й и 3-й группами по наличию ожирения не найдено ( $p = 0,27$ ), тем не менее прослеживается тенденция к несколько более высоким показателям ожирения у пациентов 1-й и 2-й групп по сравнению с 3-й группой. Это указывает на то, что избыточная масса тела является предраспола-

гающим фактором развития любого сосудистого события у пациентов с АГ, как ИМ, так и ОНМК.

**Сахарный диабет.** Медико-социальная значимость СД определяется развитием ранней инвалидизации и высокой смертностью вследствие как макро-, так и микрососудистых осложнений. СД начинается как болезнь обмена веществ, а заканчивается как сосудистая патология [6]. Среди всех исследуемых с АГ СД 2 типа страдало 18 (30 %) пациентов, при этом в 1-й группе СД имело 8 (40 %) человек, во 2-й группе – 5 (24 %), в 3-й группе – 5 (26 %). Таким образом, в 1-й группе пациентов с СД было почти в 2 раза больше, чем во 2-й и 3-й группах ( $p = 0,026$  и  $p = 0,05$  соответственно), и, следовательно, у пациентов с АГ в сочетании СД риск развития ИМ выше, чем ОНМК.

Наряду с классическими ФР в развитии сосудистого события важную роль играют *психосоциальные факторы*, в том числе стресс [9]. Из социальных факторов нами были оценены утрата трудоспособности (инвалидность), в том числе в трудоспособном возрасте, образование, вид трудовой деятельности, одинокое проживание (табл. 1).

Сосудистые события приводят к инвалидизации населения, в том числе людей трудоспособного возраста, что сопровождается значительными социальными потерями [5]. В нашем исследовании пациентов с АГ, имеющих инвалидность, было 28 (47 %) человек, при этом в 1-й и 2-й группах их было статистически значимо больше, чем в 3-й группе ( $p = 0,001$  и  $p = 0,01$  соответственно). В 1-й группе инвалидность имели 11 (55 %) пациентов, во 2-й группе – 14 (67 %). Стоит отметить, что основной вклад в инвалидизацию пациентов трудоспособного возраста вносит ИМ. Так, только в 1-й группе имеются пациенты, ставшие инвалидами в трудоспособном возрасте, причем они составляют достаточно высокую долю – 1/5 всех больных с АГ, перенесших ИМ (см. табл. 1). По остальным показателям, отражающим социальный статус пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп, статистически значимых различий не выявлено.

Выявлено, что высокий уровень стресса (от 1 до 2 баллов) имеют 12 (20 %) пациентов с АГ, из них 6 (30 %) больных 1-й группы, 4 (19 %) – 2-й группы, 2 (11 %) – 3-й группы (рис. 2). В 1-й группе пациентов с высоким уровнем стресса было в 3 раза больше, чем в 3-й группе ( $p = 0,049$ ), что подтверждает роль стресса в развитии ИМ [15].

В настоящее время является установленным фактом, что даже самые ранние субклинические нарушения функции почек независимо повышают риск сердечно-сосудистых осложнений и

Таблица 1

Характеристика социальных факторов у пациентов с артериальной гипертензией, n (%)

Социальный фактор	1-я группа, n = 20	2-я группа, n = 21	3-я группа, n = 19	Всего, n = 60	Статистический уровень значимости различий между группами
Утрата трудоспособности (инвалидность)	11 (55 %)	14 (67 %)	3 (16 %)	28 (47 %)	p1/2 = 0,449 p2/3 = 0,001 p1/3 = 0,012
Инвалиды трудоспособного возраста	4 (20 %)	0	0	4 (6,7 %)	p1/2 = 0,014 p2/3 = 1,0 p1/3 = 0,014
Высшее образование	7 (35 %)	5 (23,8 %)	5 (26,3 %)	17 (28,3 %)	p1/2 = 0,325 p2/3 = 0,931 p1/3 = 0,318
Физический вид трудовой деятельности	11 (55 %)	14 (67 %)	12 (63 %)	37 (62 %)	p1/2 = 0,449 p2/3 = 0,818 p1/3 = 0,609
Одинокое проживание	2 (10 %)	3 (14 %)	2 (11 %)	7 (12 %)	p1/2 = 1,00 p2/3 = 0,095 p1/3 = 0,082

смерти, а также повторных осложнений у больных с ССЗ [5]. Для уточнения функционального состояния почек рекомендовано [5] исследование уровня креатинина в сыворотке крови и определения СКФ. Небольшое повышение содержания сывороточного креатинина (115–133 мкмоль/л для мужчин или 107–124 мкмоль/л для женщин) рассматривают как признак нарушения функционального состояния почек [5]. По результатам нашего исследования концентрация креатинина в сыворотке крови пациентов с АГ не превышала референтных значений и составила 89,0 (76,0; 105,0) мкмоль/л. При этом в 1-й и 2-й группах уровень креатинина был статистически значимо выше, чем в 3-й группе ( $p_{2/3} = 0,045$ ,  $p_{1/3} = 0,049$ , рис. 3).

СКФ – наиболее точный показатель, отражающий функциональное состояние почек.

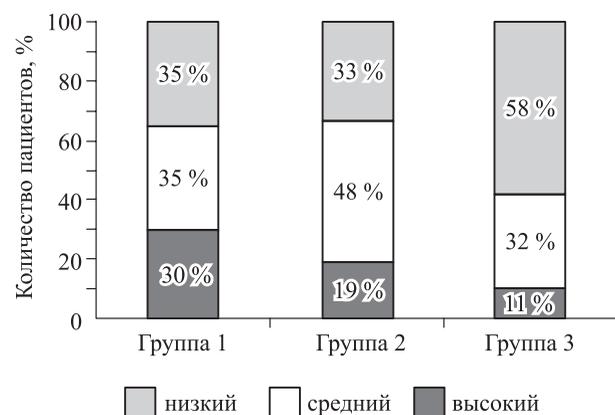


Рис. 2. Распределение пациентов с АГ в зависимости от уровня стресса

Известно, что у 40 % людей с нормальным уровнем креатинина в сыворотке крови СКФ снижена, причем как признак поражения почек рассматривают СКФ менее 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> [5]. В нашем исследовании СКФ, рассчитанная по формуле СКР-ЕРІ, в исследуемой группе пациентов с АГ в среднем составила 77,0 (62,0; 87,0) мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, при этом у пациентов 1-й и 2-й групп она была статистически значимо ниже, чем в 3-й группе ( $p_{2/3} = 0,03$ ,  $p_{1/3} = 0,04$ , см. рис. 3), что свидетельствует о более низкой фильтрационной способности почек у пациентов, перенесших сосудистое событие.

Факторы ССР в изолированном виде встречаются в 10–15 % случаев [6]. Сочетание ФР обуславливает более высокий риск развития сосудистых событий. По этому поводу были разработаны различные варианты шкал, обобщающие

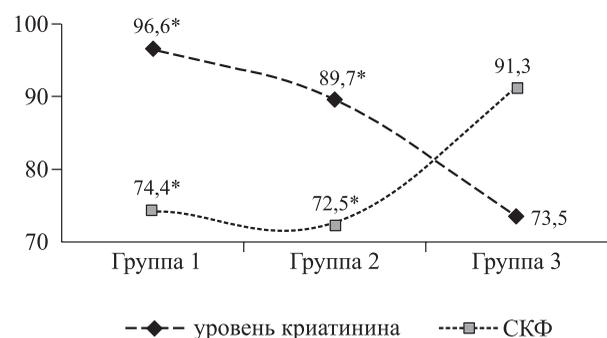


Рис. 3. Уровень креатинина (мкмоль/л) и скорость клубочковой фильтрации (СКФ, мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>) у пациентов с АГ, в том числе перенесших сосудистые события

сочетания тех или иных ФР и показывающие уровень прогнозируемого риска развития сосудистого события, выраженный в процентах [4]. Одной из них является шкала SCORE, позволяющая оценить десятилетний риск развития фатальных событий, связанных с атеросклерозом. Риск смерти по шкале SCORE у исследуемых пациентов с АГ нами оценивался на момент включения в исследования, т.е. в 1-й и 2-й группе – на момент уже состоявшегося сосудистого события. В целом у всех исследуемых с АГ риск смерти по шкале SCORE составил 8,7 (3,7; 16,8) % (высокий риск). Среди пациентов 1-й группы риск по шкале SCORE составил 11,5 (8,2; 19,2), у пациентов 2-й группы – 7,8 (4,1; 12,6), у пациентов 3-й группы – 2,7 (1,4; 8,5) %, при этом различия между группами были статистически значимыми ( $p = 0,04$ ). Сохраняющийся после состоявшегося сосудистого события высокий риск по шкале SCORE отражает недостаточную коррекцию факторов ССР и, следовательно, сохраняющийся высокий риск развития повторного сосудистого события, в первую очередь у пациентов, перенесших ИМ. При этом обращает на себя внимание следующий факт: несмотря на то, что пациенты 2-й группы были старше пациентов 1-й группы, риск по шкале SCORE у больных, перенесших ИМ, был выше, чем у перенесших ОНМК.

В связи с тем, что у пациентов с АГ сохраняется высокий риск развития повторного сосудистого события, в качестве причин недостаточной коррекции факторов ССР мы рассмотрели наличие диспансерного учета у участкового терапевта, ведение дневника контроля АД и приверженность к лечению.

**Диспансерный учет.** При анализе результатов анкетирования пациентов выявлено, что на диспансерном учете у участкового терапевта состоят 55 (92 %) пациентов с АГ. При этом среди перенесших сосудистое событие состоят на учете

у участкового терапевта практически все: 20 человек (100 %) в 1-й группе и 20 (95 %) – во 2-й группе. Пациенты с АГ, не имевшие сосудистого события в анамнезе, состояли на учете участкового терапевта только в 79 % случаев (15 пациентов). Следует предположить, что увеличение количества лиц 3-й группы, состоящих на диспансерном учете у участкового терапевта с 79 до 100 %, позволит своевременно выявить ФР еще у 21 % пациента с АГ и предотвратить развитие у большинства из них сосудистого события.

**Дневник контроля АД** среди всех пациентов ведут только 17 (28 %) человек, из них 6 (30 %) – из 1-й группы, 6 (29 %) – из 2-й группы, 5 (26 %) – из 3-й группы. Поскольку на момент состоявшегося сосудистого события дневник контроля АД ведет только треть пациентов с АГ, то вероятно, что до сосудистого события доля пациентов, контролируемых уровнем АД и, соответственно, эффективность назначенной гипотензивной терапии, была еще ниже.

**Приверженность к лечению.** Данные о приверженности к гипотензивной терапии представлены в табл. 2, из которой видно, что пациенты с АГ, перенесшие ОНМК (2-я группа), до развития сосудистого события имели самую низкую приверженность к гипотензивной терапии. При этом любое сосудистое событие, как ИМ, так и ОНМК, статистически значимо повышает приверженность к лечению в несколько раз. В группе пациентов с АГ без сосудистого события высокую приверженность к лечению имеют 42 % пациентов, видимо, именно этот факт обуславливает отсутствие у них сосудистого события. Таким образом, только состоявшееся сосудистое событие, которое в большинстве случаев является инвалидизирующим, заставляет пациентов, страдающих АГ, выполнять рекомендации врача по медикаментозной терапии и коррекции факторов ССР.

Таблица 2

*Приверженность к гипотензивной терапии пациентов с артериальной гипертензией и сосудистыми событиями в анамнезе, n (%)*

Сведения о приверженности к гипотензивной терапии		1-я группа, n = 20	2-я группа, n = 21	3-я группа, n = 19	Всего, n = 60	Статистический уровень значимости различий между группами
Количество пациентов с высокой приверженностью к лечению	до СС	5 (25 %)	3 (14 %)	8 (42 %)	16 (27 %)	p1/2 = 0,39 p2/3 = 0,05 p1/3 = 0,26
	после СС	15 (75 %)	18 (86 %)	0	33	p1/2 = 0,38
$p^{\#}$		0,031	0,0001			

*Примечание.* СС – сосудистое событие,  $p^{\#}$  – уровень значимости различий в 1 и 2 группах до и после СС (тест Мак-Нимара).

На основании результатов проведенного исследования мы предлагаем рассмотреть клинический фенотип двух «типичных» пациентов с АГ, перенесших сосудистое событие:

– пациент 1-й группы (пациент с АГ, перенесший ИМ): курящий мужчина с избыточным весом, сахарным диабетом и испытывающий стресс;

– пациент 2-й группы (пациент с АГ, перенесший ОНМК): пожилая женщина с избыточным весом, высокой степенью АГ и низкой приверженностью к гипотензивной терапии.

## ВЫВОДЫ

Среди перенесших инфаркт миокарда больше, чем среди перенесших ОНМК, доля мужчин (соответственно 80 и 20 %,  $p = 0,05$ ), курящих (65 и 48 %,  $p = 0,054$ ), имеющих сахарный диабет (40 и 24 %,  $p = 0,026$ ), являющихся инвалидами в трудоспособном возрасте (20 и 0 %,  $p = 0,014$ ), имеющих высокий уровень стресса (30 и 19 %,  $p = 0,049$ ).

Пациенты с АГ, перенесшие ОНМК, имеют более высокую степень АГ по сравнению с лицами, перенесшими инфаркт миокарда (соответственно 80 и 60 % пациентов с III степенью  $p = 0,036$ ); они старше по возрасту, чем пациенты без сосудистого события в анамнезе (соответственно  $62,5 \pm 10,0$  и  $56,1 \pm 10,0$  года,  $p = 0,039$ ), имеют крайне низкую приверженность к гипотензивной терапии (соответственно 14 и 42 % пациентов с высокой приверженностью,  $p = 0,05$ ).

Причинами сохраняющегося высокого суммарного ССР у пациентов с АГ, перенесших сосудистое событие, являются: недостаточный контроль уровня АД, содержания общего холестерина и недостаточно высокая приверженность к гипотензивной терапии.

Использование описанного клинического фенотипа больного с АГ позволяет предположить развитие того или иного сосудистого события у пациента с АГ и, соответственно, разработать индивидуальные мероприятия по предотвращению его развития путем целенаправленной коррекции факторов сердечно-сосудистого риска.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.А., Кравцова Н.Н., Шашина Н.Б. и др. Диагностика хронической болезни почек у лиц с факторами риска сердечно-сосудистых осложнений, наблюдаемых в поликлинике // Клин. нефрология. 2014. (6). 28–31.

2. Дзизинский А.А., Шпрах В.В., Синьков А.В. и др. Прогнозирование риска развития инфаркта миокарда и мозгового инсульта у больных артериальной гипертензией // Сиб. мед. журн. 2010. (6). 25–27.

3. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (четвертый пересмотр) // Системные гипертензии. 2010. (3). 5–26.

4. Европейские клинические рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний (пересмотр 2012 г.) // Рос. кардиол. журн. 2012. (4, Прил. 2). 84 с.

5. Кардиология. Национальное руководство: краткое издание / ред. Ю.Н. Беленков, Р.Г. Оганов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 848 с.

6. Люсов В.А., Евсиков Е.М., Николаева Э.И. и др. Основные факторы патогенеза артериальной гипертензии у больных с наследственной отягощенностью // Рос. кардиол. журн. 2007. (1). 6–15.

7. Мамедов М.Н., Дидигова Р.Т., Булгачева З.З. Оценка психологического статуса пациентов со стенокардией напряжения // Кардиология. 2012. 52. (1). 20–25.

8. Мамедов М.Н., Чепурина Н.А. Суммарный сердечно-сосудистый риск: от теории к практике: пособие для врачей / ред. Р.Г. Оганов. М., 2007. 23 с.

9. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Развитие профилактической кардиологии в России // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. 2004. (3). 10–14.

10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиасфера, 2003. 305 с.

11. Рекомендации по лечению артериальной гипертензии. ESH/ESC 2013 // Рос. кардиол. журн. 2014. (1). 7–94.

12. Усачева Е.В., Бунова С.С., Зуева И.М. и др. Значение оценки массы тела как одного из факторов сердечно-сосудистого риска у пациентов, перенесших инфаркт миокарда // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. 2013. 12 (6). 9–14.

13. Чеченин Г.И., Орехова Е.Н., Жилина Н.М. Анализ инвалидизации взрослого населения вследствие сосудистых заболеваний населения г. Новокузнецка на основе электронной базы данных за период 2004–2007 гг. // Соц. аспекты здоровья населения. 2009. (3). 3–8.

14. Юренева С.В., Ильина Л.М. Предикторы сердечно-сосудистого риска у женщин: роль половых гормонов и образа жизни // Эффектив. фармакотерапия. 2013. (55). 14–24.

15. Morisky D.E., Green L.W., Levine D.M. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence // Med. Care. 1986. 24. 67–74.

## **THE CONNECTING FACTORS OF CARDIOVASCULAR RISK IN APPEARANCE OF VASCULAR EVENTS IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION (MYOCARDIAL INFARCTION/STROKE)**

**Elena Vladimirovna USACHEVA, Larisa Viktorovna MIKHAYLOVA,  
Anastasiya Vladimirovna NELIDOVA, Olga Vladimirovna ZAMAKHINA,  
Irina Yuryevna MOGILEVSKAYA**

*Omsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
644099, Omsk, Lenin str., 12*

---

The aim of the study was to establish the prevalence of the factors of cardiovascular risk in patients with arterial hypertension, depending on the availability of the anamnesis of vascular events (myocardial infarction / stroke). Materials and methods. The cross-sectional study included 60 patients with arterial hypertension aged  $59.2 \pm 9$  years. The group 1 consisted of 20 patients with myocardial infarction, the group 2 was composed of 21 patients with stroke, the group 3 consisted 19 patients without vascular events in anamnesis. Results and discussion. Among the patients with myocardial infarction, the proportion of men (80 % vs. 20 %,  $p = 0.05$ ), the proportion of smokers (65 % vs. 48 %,  $p = 0.054$ ), the proportion of people who have diabetes (40 % vs. 24 %,  $p = 0.026$ ), the proportion of non-disabled people of working age (20 % vs. 0 %,  $p = 0.014$ ), the proportion of individuals who have high levels of stress (30 % vs. 19 %,  $p = 0.049$ ) were higher compared to the patients with stroke. Patients underwent stroke, have the higher degree of arterial hypertension (patients have grade III 80 % vs. 60 %,  $p = 0.036$ ) compared with patients with myocardial infarction; they are older ( $62.5 \pm 10$  years vs.  $56.1 \pm 10$  years,  $p = 0.039$ ), have a very low adherence to antihypertensive therapy (14 % vs. 42 % of patients with high adherence,  $p = 0.05$ ) compared with patients without vascular events in anamnesis. The reasons for the continued high total cardiovascular risk in patients with arterial hypertension are: inadequate control of blood pressure, cholesterol and inadequate adherence to antihypertensive therapy. This article describes the clinical phenotypes of patients with arterial hypertension, while using which we can assume the probability of development of the vascular event and develop individual measures to prevent its development by targeting the correction factors of cardiovascular risk.

---

**Key words:** factors of cardiovascular risk, arterial hypertension, cardiovascular events, myocardial infarction, stroke, stress, adherence to therapy.

*Usacheva E.V. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for diagnosis of internal diseases,  
e-mail: ElenaV.Usacheva@yandex.ru*

*Mikhaylova L.V. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for diagnosis of internal diseases*

*Nelidova A.V. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for diagnosis of internal diseases*

*Zamakhina O.V. – assistant of the chair for diagnosis of internal diseases*

*Mogilevskaya I.Yu. – 6-year student of pediatric faculty*

## ТЕПЛОВИЗИОННЫЙ ИНТРАОПЕРАЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ ПОВЕРХНОСТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ТКАНЕЙ ПРИ УДАЛЕНИИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ МЕНИНГИОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗЛУЧЕНИЯ НЕОДИМОВОГО ЛАЗЕРА

Вячеслав Владимирович СТУПАК<sup>1</sup>, Валерий Яковлевич БЕЛЕНЬКИЙ<sup>2</sup>,  
Сергей Григорьевич СТРУЦ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

<sup>2</sup> ООО Хелс-сервис  
630117, г. Новосибирск, ул. Арбузова, 1/1

<sup>3</sup> Институт лазерной физики СО РАН  
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 15Б

Целью исследования явилось изучение поверхностной температуры в зоне воздействия неодимового лазера при удалении церебральных парасагиттальных менингиом. **Материал и методы.** Для анализа использован тепловизор ТКВр-ИФП «СВИТ». Исследования проведены интраоперационно у 20 больных с парасагиттальными менингиомами при их удалении. **Результаты и их обсуждение.** Преимуществом тепловизионного контроля температуры ткани являются неинвазивность и безопасность. Тепловизор позволял оптимизировать время лазерной коагуляции, вапоризации, не превышать уровень безопасного нагрева и избегать термического поражения окружающей мозговой ткани. Использование в клинической практике температурного контроля обрабатываемых тканей позволило уточнить оптимальные параметры лазерного воздействия при удалении данного вида новообразований. При этом было продемонстрировано прецизионное воздействие лазерного излучения. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности его применения для удаления церебральных менингиом при соблюдении разработанных нами методик.

**Ключевые слова:** лазерное излучение, температурный контроль, тепловизор, церебральные менингиомы, неодимовый лазер.

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения на ткани головного мозга и опухолей как глиального, так и оболочечного характера выявили основные зависимости характера морфологических изменений обрабатываемых и прилегающих фрагментов тканей от параметров лазерного света и режимов облучения [1–10]. В 2002 г. Т.А. Соловьевой [4] был завершен цикл экспериментов по исследованию объемного нагрева тканей головного мозга подопытных животных при обработке выбранного участка излучением неодимового лазера (ИАГ-лазер) в режимах коагуляции и вапоризации, проводимых с регистрацией температуры непосредственно в точке воздействия, прилегающих участках и в глубинных слоях. Температу-

ра измерялась инвазивным методом с помощью миниатюрного датчика, закрепленного в канале пункционной иглы возле острия. Измерения в подлежащих тканях ограничивались глубиной в 2 см, где их нагрев практически отсутствовал. Результаты экспериментов позволили сформулировать научно обоснованные практические рекомендации по использованию излучения с длиной волны 1,06 мкм для удаления менингиом головного мозга и послужили основой для разработки ряда методик применения лазерного излучения при хирургическом лечении церебральных менингиом сложной локализации, предотвращающих нежелательное и опасное распространение тепла в прилегающие здоровые участки мозга. Важным результатом экспериментальных исследований было выявление сходства распростра-

*Ступак В.В.* – д.м.н., главный научный сотрудник отделения нейрохирургии, e-mail: VStupak@niito.ru

*Беленький В.Я.* – академик Медико-технической академии наук РФ, директор, e-mail: t3361740@yandex.ru

*Струц С.Г.* – ведущий инженер, e-mail: sgs@laser.nsc.ru

нения нагрева тканей по поверхности и вглубь от точки воздействия излучения, что наводило на мысль о возможности ограничиться во время операции только поверхностным контролем температуры.

Цель исследования – обеспечение безопасности лазерных операций путем интраоперационного контроля температуры поверхности опухоли и прилегающих к зоне облучения участков мозга и твердой мозговой оболочки.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели мы использовали компьютерный тепловизор ТКВр-ИФП «СВИТ» с температурным разрешением 0,025 °С и функцией термофильмирования (скорость регистрации 100 кадров/с), разработанный в Институте физики полупроводников СО РАН и предназначенный для регистрации статических и меняющихся во времени температурных полей на поверхности исследуемых объектов. Приемным элементом служит двухмерная матрица полупроводниковых ИК-фотодиодов на основе арсенида индия, установленная в плоскости изображения объектива, наводимого на обследуемую поверхность, и регистрирующая собственное инфракрасное излучение любых нагретых тел.

Инфракрасная матрица, имеющая параметры, близкие к рекордным (на площади чуть более 25 мм<sup>2</sup> находится свыше 15 000 фоточувствительных ячеек, изготовленных по специальной сверхточной технологии), помещена в тепловизионную камеру, работающую в режиме реального времени. В большинстве предшествующих разработок тепловизионных систем использованы фотоприемники с максимальной чувствительностью на длине волны ~10 мкм, т.е. в дальнем ИК-диапазоне. В тепловизоре «СВИТ» применен фотоприемник, чувствительный к излучению среднего ИК-диапазона – на длинах волн от 2,8 до 3,05 мкм, что позволило избавиться от многих технических проблем. Тепловизор обеспечивал регистрацию с высокой точностью абсолютных значений температуры выбранных участков поверхности операционного поля. Полученные данные отображались на мониторе компьютера в виде высококонтрастных цветных термограмм в режиме реального времени или графика, с индикацией точных значений температуры (рис. 1, 2).

Температурный мониторинг в режиме реального времени был проведен у 20 больных при удалении парасагиттальных менингиом с использованием неодимового лазера. В общей сложности выполнено 194 замера температурных параметров. Такие измерения позволяли, наряду

с визуальными наблюдениями эффектов взаимодействия лазерного излучения с тканью опухоли во время ее фотокоагуляции и vaporизации, подбирать оптимальные параметры лазерного воздействия (мощность и продолжительность облучения). При регистрации температур тепловизионная камера располагалась на специальном штативе рядом с оперирующим хирургом. Штатив позволял подстраивать положение камеры по высоте и углу наклона и тем самым обеспечивать постоянный обзор операционного поля.

Для удаления церебральных менингиом использовалось лазерное излучение мощностью 40–45 Вт, приводящее к эффективной фотокоагуляции ее паренхимы, и 20–25 Вт – при воздействии на предварительно коагулированную и дегидратированную ткань для ее vaporизации. Для защиты от нежелательного термического влияния прилегающие участки нормальной мозговой ткани перед началом обработки лазером закрывали ватниками, смоченными кровью больного.

После вскрытия твердой мозговой оболочки (ТМО) перед облучением регистрировалась исходная температура поверхности доступного для обработки фрагмента менингиомы и прилегающих к ней участков головного мозга. Все последующие этапы операции, во время которых применялся лазер, сопровождались тепловизионным контролем. При обработке высокоинтенсивным лазерным излучением поверхности менингиомы, фотокоагуляции сосудов, паренхимы и стромы опухоли, vaporизации матрикса новообразования и костного лоскута в случае вовлечения его в опухолевый процесс регистрировались абсолютные значения и динамика температуры в точке воздействия лазерного луча. Одновременно в режиме реального времени измерялась температура окружающих тканей опухоли и мозга. Такой контроль позволял вовремя остановить лазерную обработку при повышении температуры ткани мозга до критических значений. Имеется ввиду предельно допустимый прирост температуры, равный 4,5 °С и полученный следующим образом. Задав температурный резерв в полтора градуса, отсчитанные от величины температуры, при которой у человека начинают проявляться денатурация белков и необратимые изменения в тканях (42,5 °С), получаем значение максимальной безопасной температуры нагрева зон мозга, прилегающих к обрабатываемому участку, равное 41 °С. Значение 4,5 °С – разность между максимальной безопасной и нормальной температурой (36,6 °С) для мозга человека.

Орошение раны прохладным (18 °С) физиологическим раствором и удаление коагулированного фрагмента опухоли с помощью ультразвуко-



Рис. 1. Тепловизор ТКВр-ИФП «СВИТ»

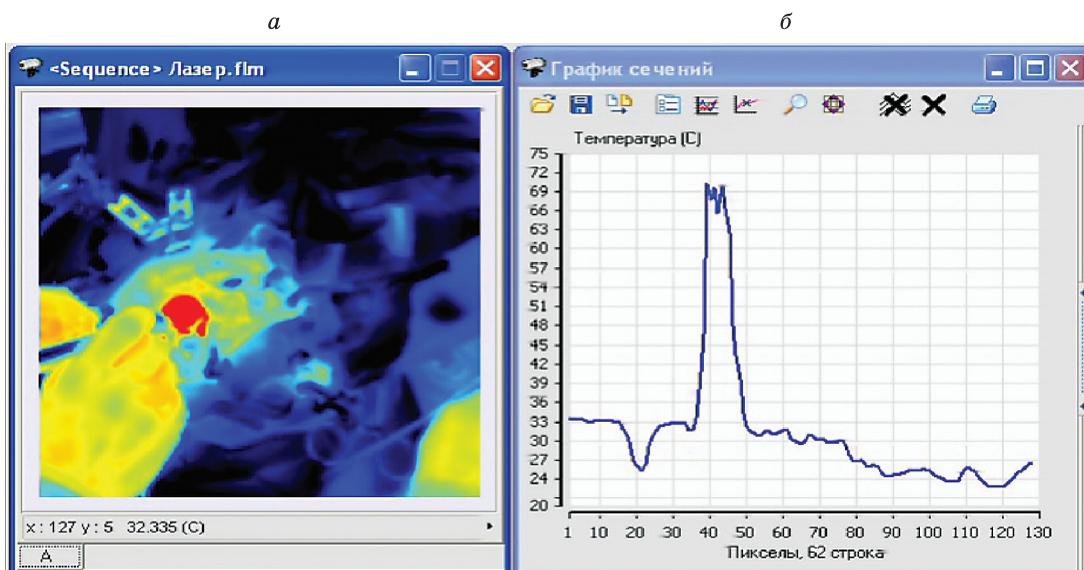


Рис. 2. Температурное поле на раневой поверхности пациента, отображаемое в режиме реального времени (а); график изменения температуры в точке воздействия луча лазера (б)

вого аспиратора быстро, в течение 0,5–2,0 мин, приводило к снижению температуры облученной поверхности до исходного уровня. Это также фиксировал тепловизор.

Дополнительно у ряда пациентов (20 человек) мы контролировали температуру ткани новообразования на глубинах 0,5–1,0 см под зоной воздействия лазерного луча первоначально при удалении конвексимальных менингиом, а позднее и при операциях по поводу менингиом других локализаций. С этой целью было проведено 100 измерений температурных параметров. Регистрация температуры с помощью игольчатого термодатчика осуществлялась в глубине ткани опухоли во время ее поверхностной обработки расфокусированным лазерным лучом в режиме коагуляции, а также, при необходимости, вапоризации.

Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение,  $m$  – ошибка среднего.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Температурные параметры при лазерной коагуляции паренхимы опухоли представлены в табл. 1, из которой видно, что начальная температура поверхности ткани опухоли у разных пациентов лежала в диапазоне от 33,2 до 35,5 °C. При осуществлении поверхностной обработки опухоли расфокусированным лазерным лучом в режиме коагуляции (диаметр луча на поверхности 3–4 мм, мощность 40–45 Вт) тепловизионная термометрия показала быстрое повышение температуры обрабатываемой поверхности (см.

Таблица 1

Температурные параметры при коагуляции паренхимы менингиомы излучением неодимового лазера

Пациент	Температура на поверхности опухоли до начала использования лазера, °С	Температура в точке воздействия лазерного луча, °С		Температура на поверхности опухоли на расстоянии 0,5 см от точки воздействия лазера через 2 мин, °С	Приращение температуры на поверхности опухоли на расстоянии 0,5 см от точки воздействия лазера, °С
		по истечении 20–30 с	по истечении 2 мин		
1	33,20	42,50	72,60	36,30	3,10
2	34,30	44,65	71,55	37,0	2,70
3	33,60	45,40	73,80	36,50	2,90
4	34,90	42,80	74,75	37,30	2,40
5	35,20	44,55	71,80	37,10	1,90
6	35,30	47,35	72,10	37,40	2,10
7	33,90	45,30	71,75	35,80	1,90
8	34,70	43,10	72,35	37,30	2,60
9	33,80	44,40	73,15	36,60	2,80
10	34,60	43,75	71,55	36,40	1,80
11	33,40	44,90	72,25	35,80	2,40
12	35,50	42,75	73,15	38,40	2,90
13	35,10	41,95	74,35	38,40	3,30
14	33,70	44,70	75,10	37,20	3,50
15	34,10	43,55	69,75	35,20	1,10
16	33,90	43,80	70,15	36,00	2,10
17	33,40	42,95	72,20	36,10	2,70
18	34,20	43,20	70,70	36,40	2,20
19	33,50	43,70	69,90	35,30	1,80
20	33,80	44,90	71,45	36,30	2,50
<i>M ± m</i>	34,2 ± 0,15	44,01 ± 0,28	72,22 ± 0,33	36,64 ± 0,19	2,43 ± 0,13

табл. 1). Визуально облученная ткань бледнела, сосуды заустевали, поверхность стягивалась, а в месте лазерного воздействия возникала зона коагуляционного некроза. Температура окружающей ткани опухоли на расстоянии 0,5 см от точки облучения по прошествии 2 мин повышалась незначительно. Подчеркнем, что не наблюдалось ни одного случая превышения критического уровня нагрева тканей на вышеуказанном расстоянии от зоны воздействия: даже при продолжительном, намного превышающем 2 мин, облучении участка опухоли приращение температуры прилегающих тканей составляло в среднем  $2,43 \pm 0,13$  °С. Каждый цикл облучения завершался орошением раны физиологическим раствором комнатной температуры для снятия избыточного тепла.

После удаления основной массы менингиомы приступали к обработке матрикса, которым являлась стенка верхнего сагиттального синуса (ВСС) или фалькса, чередуя последовательно коагуляцию и вапоризацию. Значения температуры тканей для данного этапа операции приведены в табл. 2.

Коагуляция матрикса менингиомы лучом лазера мощностью 40–45 Вт в течение двух минут приводила к повышению температуры обрабатываемой поверхности. Лазерная обработка проводилась до появления признаков обугливания ткани. На расстоянии 0,5 см от обрабатываемой поверхности температура ТМО повышалась в безопасном диапазоне (см. табл. 2). Такой невысокий подъем температуры ТМО по сравнению с паренхимой опухоли можно объяснить морфологическими свойствами стенки синуса или фалькса. Они представлены дубликатурой ТМО, в которой имеется небольшое содержание свободной межклеточной жидкости.

На данном этапе операции также проводилось периодическое охлаждение раны физиологическим раствором комнатной температуры. После того как температура обрабатываемой поверхности матрикса опухоли, расположенной в стенке ВСС, возвращалась к исходной, облучение продолжалось сфокусированным лучом лазера мощностью 20–25 Вт (режим вапоризации) до появления минимального венозного кровотечения из

Таблица 2

Температурные параметры матрикса опухоли при лазерной коагуляции и вапоризации

Пациент	Температура на поверхности ТМО до начала лазерной обработки, °С	Температура в точке приложения лазерного луча, °С		Температура ТМО на расстоянии 0,5 см от точки воздействия лазера, °С		Приращение температуры ТМО на расстоянии 0,5 см от точки воздействия лазера, °С	
		режим коагуляции в течение 2 мин	режим вапоризации в течение 2 мин	при коагуляции	при вапоризации	после коагуляции	после вапоризации
1	33,20	68,50	104,50	35,70	36,60	2,50	3,40
2	34,30	71,75	102,55	37,0	31,51	2,70	3,20
3	33,60	69,90	98,90	36,0	36,52	2,40	2,90
4	34,90	67,30	100,95	37,50	37,70	2,60	2,80
5	35,20	72,55	101,70	38,00	38,32	2,80	3,10
6	35,30	70,15	105,60	38,20	38,01	2,90	2,70
7	33,90	68,80	104,95	36,90	36,80	3,0	2,90
8	34,70	69,80	105,45	37,40	37,80	2,70	3,10
9	33,80	70,80	101,85	35,80	37,11	3,00	3,30
10	34,60	72,15	103,80	37,50	37,81	2,90	3,20
11	33,40	66,90	106,15	35,90	36,32	2,50	2,90
12	35,50	71,75	102,55	37,90	38,90	2,40	3,40
13	35,10	68,75	101,85	37,60	37,41	2,50	2,30
14	33,70	70,90	98,50	36,0	40,23	2,30	2,90
15	34,10	71,55	109,75	36,20	36,93	2,10	2,80
16	33,90	69,40	108,25	36,30	37,40	2,40	3,50
17	33,40	67,95	107,50	36,10	37,13	2,70	3,70
18	34,20	70,80	104,60	36,80	37,40	2,60	3,20
19	33,50	71,70	105,30	35,90	36,30	2,40	2,80
20	33,80	71,30	101,95	36,0	36,90	2,20	3,10
<i>M ± m</i>	34,2 ± 0,15	70,13 ± 0,37	103,83 ± 0,65	36,73 ± 0,18	37,16 ± 0,21	2,58 ± 0,05	3,06 ± 0,07

синуса. С помощью такого приема достигалось тотальное удаление менингиомы даже в случаях ее вставания в просвет синуса.

На фальксе матрикс опухоли при обработке лазером в режиме вапоризации также практически выжигался вместе с остатками опухолевой ткани, происходила своеобразная шлифовка поверхности ТМО лазерным излучением. При этом температура в точке воздействия лазера при облучении в течение 2 мин достигала 109,75 °С, а окружающей ТМО на расстоянии 0,5 см в среднем составляла  $37,16 \pm 0,21$  °С. Мы видим, что и в этом случае приращение температуры ТМО в зоне матрикса опухоли, на расстоянии 0,5 см от точки воздействия лазерного луча, при вапоризации было невысоким, т. е. также не приводило к нежелательным термическим эффектам (см. табл. 2).

На заключительном этапе операции в случаях вовлечения костного лоскута в опухолевый процесс (7 пациентов из 20) проводилась его последовательная лазерная обработка в режимах коагуляции и вапоризации. При этом костный лоскут во всех случаях удалялся, и данные манипуляции

производились на столике операционной сестры без риска термического поражения головного мозга пациента. Обработка сканирующим лучом лазера мощностью 30–35 Вт и диаметром 4–3 мм приводила первоначально к обезвоживанию и коагуляции обрабатываемой поверхности. Температура в зоне воздействия лазерного луча составляла в среднем  $80,87 \pm 0,57$  °С. Далее проводилась вапоризация этого же участка сфокусированным лучом мощностью 20–25 Вт. Облучаемая поверхность ярко светилась, дымила, наблюдались случаи появления мелких очагов открытого пламени. Тепловизор регистрировал повышение температуры до 115,70 °С при среднем значении  $106,24 \pm 2,03$  °С. Этим достигалось полное удаление опухоли из костного лоскута, который после охлаждения зоны воздействия устанавливался на место.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, преимуществами тепловизионного контроля температуры ткани являются

ся неинвазивность и безопасность. Он позволял оптимизировать время лазерной вапоризации, не превышать уровень безопасного нагрева и избежать термического поражения окружающей мозговой ткани. Лазерное излучение мощностью 40–45 Вт приводит к эффективной фотокоагуляции паренхимы опухоли, а воздействие излучением мощностью 20–25 Вт на предварительно коагулированную и дегидратированную ткань – к ее вапоризации. Использование в клинической практике тщательного температурного контроля обрабатываемых тканей при коагуляции стромы опухоли, коагуляции и вапоризации ее матрикса в зоне ВСС и фалькса, а также костного лоскута позволило уточнить оптимальные параметры лазерного воздействия на эти анатомические образования. При этом была продемонстрирована возможность прецизионного воздействия лазерного излучения. Ни в одном из случаев приращение температуры на расстоянии 0,5 см от места приложения лазерного луча не превышало установленного нами значения – 4,5 °С. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности применения высокоинтенсивного лазерного излучения для удаления церебральных менингиом при соблюдении разработанных нами методик.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калиновский А.В. Nd-YAG-лазер в хирургии менингиом основания черепа: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2009.
2. Розуменко В.Д. Проблемные вопросы применения лазерных технологий в нейрохирургии // Применение лазеров в биологии и медицине. Хабаровск, 1997. 113–117.
3. Соловьева Т.А. Nd-YAG лазер в хирургии менингиом головного мозга: дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2002.
4. Ступак В.В., Струц С.Г., Садовой М.А., Майоров А.П. Неодимовый лазер в хирургии церебральных менингиом. Новосибирск, 2013. 267 с.
5. Чернов С.В. Микрохирургия парасагитальных менингиом головного мозга с использованием хирургического лазера: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2008.
6. Beck O.J. Use of the Nd-YAG laser in neurosurgery // Neurosurg. Rev. 1984. 7. (2-3). 151–157.
7. Desgeorges M., Sterkers O., Ducolombier A. et al. La microchirurgie au laser des meningiomes. Analyse d'une serie consecutive de 164 cas operas avec differents lasers // Neurochirurgie. 1992. 38. (4.) 217–225.
8. Fasano V.A. The use of laser in neurosurgery // J. Neurosurg. 1982. 26. 245–264.
9. Roux F.X., Leriche B., Cioloca C. et al. Combined CO<sub>2</sub> and Nd-YAG laser in neurosurgical practice. A 1st experience apropos of 40 intracranial procedures // Neurochirurgie. 1992. 38. (4). 235–237.
10. Whittle I.R., Smith C., Navoo P. et al. Meningiomas // Lancet. 2004. 363. 1535–1544.

## THERMAL IMAGING FOR INTRAOPERATIVE MONITORING OF SURFACE TEMPERATURE DURING REMOVAL OF CEREBRAL MENINGIOMAS USING RADIATION OF NEODYMIUM LASER

Vyacheslav Vladimirovich STUPAK<sup>1</sup>, Valeriy Yakovlevich BELENKIY<sup>2</sup>,  
Sergey Grigor'evich STRUTS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n. a. Ya. L. Tsivyan  
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

<sup>2</sup> *«Health-service» Ltd.  
630017, Novosibirsk, Arbusov str., 1/1*

<sup>3</sup> *Institute of Laser Physics of SB RAS  
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 15B*

---

**Purpose.** To study surface temperature in the zone of influence of a neodymium laser during removal of cerebral parasagittal meningiomas. **Material and methods.** The thermal imaging camera DVR-IFP «SVIT» was used. A total of 20 patients with parasagittal meningiomas have been examined during the removal surgery. **Results and discussion.** Noninvasiveness and safety are the advantage of thermal image for tissue temperature monitoring. It is possible to optimize laser coagulation time, vaporization, not to exceed the safe level of heating and to avoid thermal destruction of the surrounding brain tissue. Using temperature monitoring of treated tissue in clinical practice clarified the optimal values of laser radiation during removal of this type of tumors. Precision laser radiation impact was demonstrated. The obtained results testify to its safety for removal of cerebral meningiomas in compliance with our developed methods.

---

**Key words:** laser radiation, temperature monitoring, thermal imaging camera, cerebral meningiomas, neodymium laser.

*Stupak V.V. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher of clinic of neurosurgery,  
e-mail: VStupak@niito.ru*

*Belentkiy V.Ya. – academician of the Medico-Technical Academy of Sciences of Russia, director,  
e-mail: t3361740@yandex.ru*

*Struts S.G. – leading engineer, e-mail: sgs@laser.nsc.ru*

## РОЛЬ СОЦИАЛЬНО-ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТРЕССА У РАБОТНИКОВ НЕФТЕХИМИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Зульфья Фиданевна ГИМАЕВА<sup>1,2</sup>, Ахат Бариевич БАКИРОВ<sup>1,2</sup>,  
Валерий Александрович КАПЦОВ<sup>3</sup>, Лилия Казымовна КАРИМОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека  
450106, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России  
450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3

<sup>3</sup> Всероссийский НИИ железнодорожной гигиены Роспотребнадзора  
125438, г. Москва, Пакгаузное шоссе, 1/1

Цель исследования – изучение значимости психосоциальных факторов в развитии профессионального стресса у работников нефтехимических производств и разработка комплекса профилактических мероприятий. **Материал и методы.** Проведены социально-психологические исследования, включающие анонимное анкетирование по специально разработанным анкетам и психологическое тестирование (тестовый метод) с использованием Госпитальной шкалы тревоги и депрессии – Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS). **Результаты и их обсуждение.** На основании оценки результатов гигиенических и социально-психологических исследований выявлены факторы, вызывающие формирование стрессового состояния у работников нефтехимических производств. Проведенные гигиенические исследования показали, что на организм работников этих производств воздействует комплекс вредных производственных факторов, включающих химический, шум, неблагоприятный микроклимат, тяжесть и напряженность труда. Наиболее значимыми психосоциальными факторами для работников изученных производств являлись работа в условиях дефицита времени с повышенной ответственностью за конечный результат и социальная нестабильность в обществе. На здоровье работников могут оказывать влияние низкая физическая активность, нерациональное питание, вредные привычки. Данные опроса свидетельствовали об удовлетворительной оценке деятельности работодателя в части сохранения и укрепления здоровья работников. Для преодоления социального стресса необходимо создание безопасных условий труда на рабочих местах, повышение трудовой мотивации, основанной на возможности карьерного роста. По результатам проведенного исследования обоснован комплекс профилактических мероприятий по повышению стрессоустойчивости работников на корпоративном и индивидуальном уровнях, что обеспечит значительный социальный, а в перспективе и экономический эффект.

**Ключевые слова:** работники нефтехимических производств, профессиональный стресс, социальный стресс, сердечно-сосудистые заболевания, факторы риска, стрессоустойчивость, профилактика.

Сложившаяся в стране социально-экономическая ситуация, характеризующаяся спадом производств, экономическими санкциями, низкими доходами населения, несомненно оказывает негативное влияние на здоровье трудоспособного населения. Совокупность патологических процессов, воздействующих на трудоспособное население, носит название «социальный стресс» [3]. Психосоциальные факторы отягощают течение хронических заболеваний, в том числе сер-

дечно-сосудистых, ухудшают качество жизни людей, увеличивают риск инвалидизации и расходы системы здравоохранения [7]. По данным исследования INTERHEART (2005), вклад психосоциальных факторов в риск возникновения инфаркта миокарда составил 32,5 % [12]. В исследовании КОРДИНАТА было установлено негативное влияние психосоциальных факторов на прогноз при артериальной гипертензии/ишемической болезни сердца [8, 11]. С уровнем стресса независимо ас-

*Гимаева З.Ф.* – к.м.н., доцент кафедры терапии и клинической фармакологии, старший научный сотрудник, e-mail: gzf-33@mail.ru

*Бакиров А.Б.* – д.м.н., проф., академик АН РБ, директор

*Капцов В.А.* – д.м.н., проф., член-кор. РАН, e-mail: karpovva@rambler.ru

*Каримова Л.К.* – д.м.н., проф., главный научный сотрудник

социровались такие факторы риска, как возраст, пол, курение, физическая активность, потребление алкоголя, артериальная гипертензия и высокий риск ишемической болезни сердца [12].

Одной из основных причин возникновения «социального стресса» является утрата населением эффективной трудовой мотивации, низкая оплата труда, неуверенность в завтрашнем дне, боязнь потерять работу [3]. По данным ряда авторов, в настоящее время более 10 % работоспособного населения живет в условиях постоянного социального, а также производственного стресса [4, 10]. В современной литературе представлены объективные данные, характеризующие развитие производственного стресса у работников социальной сферы, служб правопорядка, профессий операторского труда [1, 2, 5, 6]. Вместе с тем отсутствуют сведения о психологическом статусе работников нефтехимических производств, условия труда которых характеризуются воздействием неблагоприятных факторов рабочей среды и трудового процесса.

Нефтехимическая промышленность является базовым сегментом Российской экономики, включает в себя производство полимеров, синтетических каучуков, смазочных масел, растворителей, красителей, присадок, моющих средств, а также сырья для производства большинства органических соединений. Крупнейшие предприятия отрасли расположены в Приволжском федеральном округе, в которых занято до 3,4–3,6 % всех работающих в промышленности этого региона. «План развития газо- и нефтехимии России на период до 2030 года» предусматривает в ближайшие годы развитие нефтегазохимии с акцентом на строительство шести нефтегазохимических производственных кластеров от Дальнего Востока до Балтики, что повлечет за собой увеличение численности работников в отрасли [9].

Вместе с тем отрасль является потенциально опасной для здоровья работников. Так, по данным Росстата за 2014 год удельный вес работников, занятых в условиях, не отвечающих санитарно-гигиеническим нормам в нефтехимических производствах, составляет 49,8 %, что превышает среднероссийские показатели (41,1 %). Уровень профессиональной заболеваемости также выше, чем в среднем по России (соответственно 2,78 и 1,74 случая на 10 тыс. работников).

Настоящее исследование проведено на двух динамично развивающихся, высокотехнологичных нефтехимических предприятиях Российской Федерации, расположенных в Республике Татарстан и Башкортостан, в состав которых входят производства мономеров, полимеров, пластиков

и синтетических каучуков. Производственный комплекс компаний включает в себя заводы основного производства, научно-технологические и проектно-конструкторские центры, а также вспомогательные цеха и структуры управления. Указанные предприятия, осуществляя производственно-хозяйственную деятельность, ориентируются не только на потребности рынка в высококачественных товарах и услугах, но и на общечеловеческие ценности, реализуют концепцию социальной ответственности бизнеса. В условиях рыночной экономики они не отказались, как большинство предприятий, от собственных социальных структур (здравпункты, медико-санитарные части, санатории-профилактории, дома отдыха), ориентированных на сохранение здоровья работников. По данным Росстата средняя заработная плата за 2014 г. у работников вышеуказанных производств варьировала от 36 218 до 75 517 рублей, что превысило среднероссийские показатели (32 495 рублей).

Исходя из изложенного, является актуальным анализ влияния экономических, социальных, гигиенических и психологических факторов на здоровье работников нефтехимических производств. Цель исследования – изучение значимости психосоциальных факторов в развитии профессионального стресса у работников нефтехимических производств и разработка комплекса профилактических мероприятий.

Нефтехимические производства занимают одно из ведущих мест в структуре отраслей хозяйства по потенциальной опасности химического воздействия. Химические вещества, являясь токсическими, обладают большим запасом потенциальной энергии (взрывоопасны), которая при аварийных ситуациях (взрывах), высвобождаясь, может привести к большим разрушениям и многочисленным человеческим жертвам, а также способствовать загрязнению огромных территорий. Проведенные гигиенические исследования показали, что на организм работников изученных производств воздействует комплекс вредных производственных факторов, включающих химический, шум, неблагоприятный микроклимат, тяжесть и напряженность труда. Работа в условиях непрерывных технологических процессов сопровождается повышенной ответственностью за конечный результат с риском для собственной жизни и жизни других людей, чрезмерным объемом работы, необходимостью принятия решений в условиях дефицита времени. В целом условия труда работников основных профессий, согласно Р2.2.2006-05, в большинстве случаев относятся к вредным и соответствуют параметрам классов условий труда 3.1–3.3.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для оценки потребностей работников в мероприятиях по укреплению здоровья и выявления наиболее значимых параметров общественного и индивидуального здоровья работников нефтехимических комбинатов был проведен опрос по стандартной анонимной анкете, предложенной экспертами ВОЗ. Дополнительно в анкету ВОЗ были включены специально разработанные вопросы, касающиеся морально-психологического климата в коллективе. Скрининг тревожных и депрессивных состояний проводился с помощью психологического тестирования (тестовый метод) с использованием Госпитальной шкалы тревоги и депрессии – Hospital Anxiety and Depression Scale – HADS.

Помимо общей характеристики респондентов (пол, возраст, стаж работы в организации), анкета предусматривала оценку респондентами условий труда, деятельности работодателя, проводимой им в части сохранения и укрепления здоровья своих работников, включая бытовое и медицинское обеспечение, а также наличие психосоциальных факторов стресса.

Кроме того, анкета содержала вопросы, направленные на выяснение представлений данной группы о «здоровом образе жизни», включая ряд вопросов по характеристике фактического питания опрашиваемых, особенностям проводимого отдыха и досуга, самооценки здоровья, знания ими жизненно важных медицинских показателей собственного организма, а также степени информированности работников о рациональном питании и необходимости коррекции избыточной массы тела, закаливании организма и профилактике болезней.

Состояние здоровья работающих было оценено по материалам самооценки здоровья, полученным в результате анкетирования, а также по результатам углубленных периодических осмотров работающих во вредных условиях труда.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего было опрошено 320 работников нефтехимических производств, в основном по профессии аппаратчик, в возрасте от 18 до 59 лет. Среди респондентов преобладала возрастная категория от 31 до 50 лет (67 %), средний возраст испытуемых – 37,4 года. Общий профессиональный стаж составил в среднем 24,4 года. Более половины респондентов (55 %) на момент исследования работали в данной организации 10 лет и более. Работники со стажем работы от года до 5 лет и от 6 до 10 лет распределились практически поров-

ну и составили 19 и 22 % соответственно. Доля работающих в организации не более одного года была менее 4,0 %. Представленные данные косвенно свидетельствуют об относительно низкой текучести кадров в организации и положительно характеризуют социально ориентированную деятельность работодателя.

Доля лиц со средним специальным образованием составила более половины (53 %) от общего числа опрошенных работников, 19 % имели среднее, 28 % – высшее образование. Абсолютное большинство работников (85 %) изученных производств проживали в отдельных квартирах со всеми удобствами, 10 % занимали комнаты в коммунальных квартирах и только 5 % рабочих жили в благоустроенных общежитиях. Обеспеченность жилплощадью у большинства работников достаточная. Так, 60 % от числа опрошенных имели 12 м<sup>2</sup> и более общей площади на каждого члена семьи, 35 % – 6–9 м<sup>2</sup> и только 5 % – менее 6 м<sup>2</sup>.

По семейному положению 82 % обследованных мужчин женаты, 18 % одиноки, из последних 3,5 % разведены. Наибольший удельный вес (55 %) среди опрошенных составляли работники, имевшие одного ребенка дошкольного или школьного возраста, 25 % – двоих детей, 5 % – троих и более детей. Доля бездетных рабочих составила 15 %.

Организацией труда на производстве удовлетворены 78 % работников, условиями труда – 84 %, обеспеченностью спецодеждой – 92 % работников. Необходимо отметить, что оплатой труда и моральным стимулированием удовлетворены менее двух третей опрошенных, тогда как 55 % работников недовольны отсутствием продвижения по служебной лестнице. При этом больше половины работников не считали возможности карьерного роста равными для всех. Морально-психологический климат в коллективе, взаимоотношения между членами коллектива устраивали 74 % респондентов. Профессиональной помощью руководителя и межличностными взаимоотношениями с ним удовлетворены 68 % опрошенных. По результатам опроса 18 % работников отмечали наличие конфликтов с коллегами на работе. Наиболее частыми причинами конфликтов являлись неудовлетворительная организация труда и производства, распределение премий, доплат, состояние трудовой дисциплины. Несмотря на это, только 9 % респондентов имели желание перейти в другой коллектив.

Вредной и опасной свою работу считали 89,9 % респондентов: 62 % опрошенных указали на интенсивный производственный шум, 25,7 % – на пожаро- или взрывоопасность, 18 % –

на повышенную или пониженную температуру воздуха, 13,4 % – на трехсменный режим работы. Наличием загазованности обеспокоены 54 % из числа обследованных. Другие опасные производственные факторы респондентами были отмечены реже. Только 12,1 % работников считают, что их условия труда являются безопасными.

Общеизвестно, что одним из главнейших факторов, оказывающих негативное влияние на здоровье, являются стрессовые ситуации. Как показали результаты исследования, 72,2 % работников отмечали наличие стресса на работе, при этом 38 % работников субъективно оценивали свою повседневную профессиональную деятельность как имеющую выраженный «стрессовый характер».

В анкете был предусмотрен вопрос «Что заставило Вас испытать тревогу в последние 6 месяцев на работе?». По результатам анкетирования работники отметили увеличение интенсивности труда, отметив в 28,5 % случаев «Слишком много перемен в моей работе», в 18,6 % – «Слишком напряженная работа», в 17,5 % – «Слишком большая ответственность», в 9,3 % – «Моя работа изматывает меня физически», в 6,1 % – «Вредные условия труда отрицательно сказываются на моем здоровье». Ранжирование производственных проблем, обуславливающих состояние тревоги у работников нефтехимической промышленности, выявило, что одной из немаловажных причин возникновения тревоги, нервозности или стресса на работе является работа в условиях дефицита времени с повышенной ответственностью за конечный результат (24,7 %). Указали на конфликты с сослуживцами лишь 1,3 %, не испытывали тревоги в производственных условиях 17,9 % респондентов.

По результатам опроса среди причин, вызывающих чувство нервозности или стресса в домашних условиях, лидировали тревога за будущее ребенка (16,2 %) и непредвиденные большие расходы (14,3 %). Немаловажную роль играли здоровье членов семьи (11,8 %), трудности, связанные с поступлением ребенка в ВУЗ (5,9 %), развод или разрыв отношений (3,6 %), переживание и страх одиночества (2,3 %), смерть близких родственников (1,8 %). Социальная нестабильность в обществе тревожила 47,2 % респондентов. Лишь 18,4 % анкетированных не испытывали тревоги в быту.

Сочетание стрессов на работе и в домашних условиях являлись причиной тревоги у 34,3 % работников. Респонденты отмечали, что напряженная обстановка в трудовом коллективе приводила к ухудшению взаимоотношений в семье и наоборот. Воздействие стресса на работе было более

значимым для работников, не имевших эмоциональной поддержки от близких родственников. Приведенные результаты опроса свидетельствовали о том, что несмотря на относительное благополучие на изученных предприятиях, экономический кризис в стране и вызванные им социальные проблемы в обществе в определенной мере могли повлиять на психическое состояние работников.

В анкете было уделено внимание вопросам здорового образа жизни. Большинство работников (75 %) изученных производств осознают необходимость занятий физической культурой для сохранения здоровья. Наличие физической нагрузки отметило 54,2 % опрошенных, причем только 13,0 % нефтехимиков занимались активным спортом, физическая нагрузка в виде утренней зарядки отмечалась у 24,7 % опрошенных, в виде лечебной гимнастики – у 9,3 %, в виде пеших прогулок – у 7,2 % респондентов. Из приведенных данных следует, что работники предпочитали занятия спортом в спортивных залах пешим прогулкам. Большинство опрошенных работников из числа тех, кто не занимался спортом, связывали это с отсутствием силы воли, 5 % – с нехваткой времени, 25 % не считали нужным. Для укрепления своего здоровья предпочло бы плавание в бассейне 34 %, отдых и лечение в санатории 29 %, массаж 18 % работников. Большинство (38,3 %) респондентов хотели бы заниматься спортивными играми, посещать тренажерный зал, кататься на лыжах или ездить на велосипеде.

Поскольку одно из центральных мест в сохранении здоровья, по оценке экспертов ВОЗ, занимает полноценное питание, изучался и этот аспект. По данным опроса, 85,4 % работников оценивали свое питание как достаточное. Только 12,0 % респондентов считали, что они мало потребляют овощей и фруктов, 2,6 % – мясных продуктов. Удовлетворены организацией общественного питания 68 % анкетированных. При уточнении причин нерационального питания работники чаще указывали на недостаток времени (14,2 %), нехватку денег (10,5 %), отсутствие доступных блюд в столовой (8,6 %).

С целью анализа вредных привычек вопросы анкеты включали отношение к курению и алкоголю. Как оказалось, больше половины опрошенных (55,1 %) не курили и еще 20,9 % выкуривали до 0,5 пачки в день. Среди курящих преобладали (23,2 %) лица, выкуривающие до одной пачки сигарет, а злостных курильщиков, курящих до двух пачек сигарет, оказалось лишь 0,8 %. Большинство работников (78,4 %) из числа курящих знали о вреде курения, однако 21,6 % не прекращали курить, считая, что курение успокаивает нервную систему, 56,8 % – из-за недостатка воли. Следу-

Таблица

Перечень интересующих вопросов о здоровом образе жизни

Информация, представляющая интерес	Количество людей	
	n	%
Формирование стрессоустойчивости	211	65,9
Рациональное питание и коррекция веса	184	57,5
Профилактика заболеваний	148	46,3
Лечебная физкультура	93	29,1
Правила оказания первой помощи	63	19,7
Правила закаливания	37	11,6

ет отметить, что при наличии стрессовых ситуаций на рабочих местах, отсутствии поддержки со стороны домочадцев (близких, родственников), часть работников могут реагировать так называемым дистрессом, который нередко сопровождается чрезмерным потреблением спиртных напитков. По результатам анкетирования среди работников, не находивших эмоциональной поддержки со стороны близких родственников, доля лиц, часто употребляющих алкоголь, была выше (28,2 %) по сравнению с работниками, имевшими благоприятный психологический климат в семье (9,1 %). Из алкогольных напитков 16,0 % респондентов употребляют пиво, 12,3 % – вино и 6,9 % – крепкие спиртные напитки. Мы считаем, что при ответе на данные вопросы респонденты по понятным причинам не всегда были искренне, в связи с чем полученные данные оцениваем как несколько заниженные.

Не менее важную роль в сохранении здоровья играет полноценный отдых и сон. Более 63 % опрошенных не имели проблем со сном, 26 % сталкивались с нарушениями сна не чаще одного раза в неделю, 11 % работников отмечали серьезные нарушения сна.

Одним из факторов поддержания и укрепления здоровья человека является уровень его медицинской активности. Материалы нашего исследования показали, что в случае заболевания более половины работников (64,1 %) не обращались в лечебно-профилактические учреждения. Из числа обратившихся за медицинской помощью 15,6 % работников старались выполнить рекомендации и советы врача полностью, 14,6 % – частично выполняли и 5,7 % не выполняли совсем. Качеством медицинской помощи предприятия удовлетворены 62 % работников. На позитивную же роль фельдшерского пункта на предприятии в сохранении и укреплении здоровья указало лишь 38,2 % опрошенных.

Как показали результаты исследования, под понятием «здоровый образ жизни» работники чаще подразумевали социально приемлемое общественное поведение, в связи с чем многие опрашиваемые сохраняли своего фактического здоровья не связывая с образом жизни. В результате опроса большинство работников (72 %) отнесли себя к группе, ведущих здоровый образ жизни. При этом как они, так и лица, не относящие себя к такой группе, испытывали недостаток информации, которая могла бы помочь им вести здоровый образ жизни. Это касается, прежде всего, сведений о формировании стрессоустойчивости (65,9 %), рациональном питании и коррекции веса (57,5 %), профилактических мероприятиях (46,3 %) (см. таблицу).

В результате анализа полученных материалов установлено, что более половины опрошенных (52 %) считали состояние своего здоровья «хорошим», 12 % – «отличным» и менее 7 % – «очень хорошим». Менее трети оценили свое здоровье как «удовлетворительное» и 3 % – как «очень плохое». При этом 83 % работников считали свое здоровье соответствующим требованиям, предъявляемым профессией. Однако по данным медицинских осмотров, проводимых сотрудниками ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», процент практически здоровых работников составлял лишь 20–35 %.

Меньшая часть работников удовлетворена своей жизнью полностью (33,6 %), скорее удовлетворены, чем нет, – 44,4 %, затруднились ответить – 22 % опрошенных. Большинство респондентов (72 %) связывали ухудшение материального положения за последний год с ростом цен на продукты и товары первой необходимости.

По результатам проведенного исследования обоснованы основные направления минимизации стресса на рабочем месте и сохранения здоровья работников.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Работники изученных нефтехимических производств подвергались воздействию вредных химических веществ, производственного шума, неудовлетворительных параметров микроклимата и испытывали психоэмоциональные и физические нагрузки. Условия труда работников основных профессий относились к вредным и соответствовали, согласно Р2.2.2006-05, классам условий труда 3.1–3.3. Субъективное восприятие работниками условий труда отражали объективные качественные и количественные характери-

стики. Большая часть респондентов удовлетворена организацией труда, взаимоотношениями в коллективе, вместе с тем работники отмечают низкую мотивацию к труду, связанную с отсутствием возможности карьерного роста и недостаточной заработной платой.

2. Наиболее значимыми психосоциальными факторами для работников нефтехимических предприятий являлись работа в условиях дефицита времени с повышенной ответственностью за конечный результат и социальная нестабильность в обществе.

3. На здоровье работников могут оказывать влияние низкая физическая активность, нерациональное питание, вредные привычки. Здорового образа жизни придерживались 72 % опрошенных, при этом физическая активность была достаточной лишь у 54,2 % опрошенных работников, не курили чуть больше половины опрошенных.

4. Большинство респондентов (71 %) оценили свое здоровье как «хорошее», «очень хорошее» или «отличное», 80 % опрошенных удовлетворены деятельностью работодателя в части сохранения и укрепления здоровья своих работников. Установлено, что показатели фактического состояния здоровья работников по данным медицинских осмотров не совпадали с данными опроса. Судя по всему, причиной несоответствия является боязнь работников быть признанными непригодными к работам во вредных и опасных условиях труда.

5. Данные опроса свидетельствовали об удовлетворительной оценке деятельности работодателя в части сохранения и укрепления здоровья работников.

6. Для преодоления социального стресса необходимо создание безопасных условий труда на рабочих местах, повышение трудовой мотивации, основанной на возможности карьерного роста. Эффективная трудовая мотивация необходима не только для успешного развития экономики, но и для минимизации риска нарушения здоровья работников.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биккинина Г.М., Кабышев В.Т. Оценка значимости психосоциальных факторов производственной и непроизводственной природы для сотрудни-

ков правоохранительных органов // Мед. труда и пром. экол. 2012. (1). 19–23.

2. Бухтияров И.В., Рубцов М.Ю., Чесалин П.В. Валидизация оценки профессионального стресса у работников офисов // Экол. человека. 2012. (11). 20–26.

3. Величковский Б.Т. Социальный стресс, трудовая мотивация и здоровье // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН. 2005. (2). 24–36.

4. Измеров Н.Ф., Матюхин В.В. Профессиональный стресс с позиции медицины труда: стрессоры, психофизиологические аспекты, здоровье, профилактика // II Всерос. съезд врачей-профпатологов. Ростов н/Д., 2006. 309–310.

5. Кушнерова Н.Ф., Мерзляков В.Ю., Фоменко С.Е. и др. Профилактика стрессовых нарушений у медицинских работников // Мед. труда и пром. экол. 2012. (6). 44–48.

6. Матюхин В.В., Шардакова Э.Ф., Юшкова О.И. и др. Воздействие факторов трудового процесса // Энциклопедия «Экометрия». Воздействие на организм человека опасных и вредных производственных факторов. М., 2004. Т. 1. 344–441

7. Национальные рекомендации по кардиоваскулярной профилактике // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011. 10. (6, Прил. 2). 1–64.

8. Оганов Р.Г., Погосова Г.В., Колтунов И.Е. и др. Депрессивная симптоматика ухудшает прогноз сердечно-сосудистых заболеваний и снижает продолжительность жизни больных артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца // Кардиология. 2011. (2). 59–66.

9. План развития газо- и нефтехимии России на период до 2030 года. М., 2010. <http://www.rupec.ru/download.php?url=%2Fupload%2Fiblock%2F266%2F26677f6a8b30c060080c018a69dba73c.doc>

10. Ушаков И.Б., Бухтияров И.В. Профессиональный стресс и психическое здоровье работающего населения // II Всерос. съезд врачей-профпатологов. Ростов н/Д., 2006. 316–318.

11. Чазов Е.И., Оганов Р.Г., Погосова Г.В. и др. Депрессивная симптоматика ухудшает прогноз у больных артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца: первые результаты проспективного этапа российского многоцентрового исследования КООРДИНАТА // Кардиология. 2007. (10). 24–30.

12. Hamer M, Stamatakis E., Steptoe A. Psychiatric hospital admissions, behavioral risk factors, and allcause mortality: the Scottish health survey // Arch. Intern. Med. 2008. 168. (22). 2474–2479.

## THE ROLE OF SOCIO-PSYCHOLOGICAL FACTORS FOR DEVELOPMENT OF OCCUPATIONAL STRESS AMONG PETROCHEMICAL WORKERS

Zulfiya Fidaievna GIMAEVA<sup>1,2</sup>, Akhat Barievich BAKIROV<sup>1,2</sup>,  
Valeriy Aleksandrovich KAPTSOV<sup>3</sup>, Liliya Kazymovna KARIMOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology  
450106, Ufa, Kuvykin str., 94*

<sup>2</sup> *Bashkirian State Medical University of Minzdrav of Russia  
450000, Ufa, Lenina str., 3*

<sup>3</sup> *All-Russian Institute of Railway Hygiene of Rospotrebnadzor  
125438, Moscow, Pakgauznoye highway, 1/1*

---

**Objective.** To study the importance of psychosocial risk factors for development of occupational stress among petrochemical workers and to initiate the complex of preventive programs. **Material and methods.** We conducted socio-psychological studies including specially designed anonymous questionnaires and psychological tests (a test method) using the Hospital Anxiety and Depression Scale – HADS. **Results and discussion.** Based on the assessment of results of hygienic and socio- psychological studies, factors causing stress in petrochemical workers were identified. Hygienic studies carried out have shown that a variety of hazardous work environment factors including chemical, noise, hazardous microclimate, work severity and strains have the negative impact towards the health of workers. The most significant psychosocial factors affecting the workers of the given enterprises were a lack of time with experienced responsibility and knowledge of outcomes as well as social instability in society. Low physical activity, malnutrition, bad habits may affect workers' health. Survey data confirmed adequate appreciation of the employer's activities in terms of workers' health maintenance and promotion. To effectively deal with social stress, it is necessary to provide security of the occupation, to increase work motivation related to career opportunities. Based on the studies conducted, the most useful approach to stress preventing at work and increasing workers' stress resistance at the corporate and individual levels contributing to considerable social and economic effects in the future has been made.

---

**Key words:** petrochemical workers, occupational stress, social stress, cardiovascular diseases, risk factors, stress resistance, prevention.

*Gimaeva Z.F. – candidate of medical sciences, associate professor of the department of therapy and clinical pharmacology, e-mail: e-mail: gzf-33@mail.ru*

*Bakirov A.B. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, director*

*Kaptsov V.A. – doctor of medical sciences, corresponding member of RAS, professor, e-mail: kapcovva@rambler.ru, тел. 8 (499) 153-27-37*

*Karimova L.K. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher*