

МОНОФЕНОЛ ТС-13 УВЕЛИЧИВАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУЛЕНТНЫМ ШТАММОМ *Mycobacterium tuberculosis*

Петр Михайлович КОЖИН¹, Анна Владимировна КОВНЕР¹,
Николай Константинович ЗЕНКОВ¹, Татьяна Игоревна ПЕТРЕНКО²,
Наталья Валерьевна КАНДАЛИНЦЕВА³, Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА¹

¹ НИИ экспериментальной и клинической медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Новосибирский НИИ туберкулеза
630040, Новосибирск, ул. Охотская, 81а

³ Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

Цель исследования – определить оптимальную для моделирования у мышей экспериментального туберкулезного гранулематоза дозу вирулентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и исследовать влияние оригинального индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE ТС-13 (3-(3'-мет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия) на выживаемость животных и динамику формирования гранулем. **Материал и методы.** Генерализованный туберкулезный гранулематоз моделировали однократным введением в хвостовую вену самцам мышей линии BALB/c двухмесячного возраста *M. tuberculosis* штамм H37Rv в дозах 10⁶, 10⁷ и 10⁸ микробных тел. Еще одна группа животных в день инфицирования *M. tuberculosis* (10⁷ микробных тел) начинала получать ТС-13 с питьевой водой (100 мг/кг массы тела). Ежедневно фиксировали выживаемость, через 5 недель мышей вывели из эксперимента и забирали образцы печени для гистологического исследования. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что при моделировании у мышей BALB/c туберкулезного гранулематоза, вызванного внутривенным введением вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, наиболее адекватной является доза 10⁷ микробных тел. На 36 сутки после введения 10⁷ микробных тел *M. tuberculosis* смертность была значительно меньше в группе мышей, получавших с питьевой водой индуктор сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE монофенол ТС-13 (выжило 44 и 15 % мышей соответственно). В то же время по количеству и диаметру гранулем в печени эти две группы не различались. Результаты показывают высокую перспективность изучения роли окислительного стресса и редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в туберкулезном гранулематозе.

Ключевые слова: синтетический монофенол ТС-13, туберкулез, H37Rv, система Keap1/Nrf2/ARE.

В современных условиях туберкулез представляет серьезную медико-социальную проблему для России. Несмотря на все прилагаемые усилия и наметившуюся положительную динамику, эпидемиологическая ситуация остается напряженной, и страна все еще входит в список государств с самым высоким бременем туберкулезной инфекции и туберкулезом с множествен-

ной лекарственной устойчивостью [1, 18]. В связи с недостаточной эффективностью этиотропного лечения остается актуальным поиск новых подходов для патогенетической терапии туберкулеза и создания фармакологических препаратов нового типа, предназначенных для патогенетической, организм-ориентированной (host-targeted) терапии туберкулеза и направленных как на эли-

Кожин П.М. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: kozhinpm@gmail.com

Ковнер А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний, e-mail: anya.kovner@gmail.com

Зенков Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru

Петренко Т.И. – д.м.н., главный научный сотрудник, e-mail: tpetrenko@nsk-niit.ru

Кандалинцева Н.В. – к.х.н., директор Института естественных и социально-экономических наук, e-mail: aquraphenol@mail.ru

Меньщикова Е.Б. – д.м.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru

минацию возбудителя, так и на профилактику деструктивных осложнений путем воздействия на функциональное состояние клеток иммунной системы. Наибольший интерес представляет перспектива использования таких препаратов в сфере лечения туберкулеза, вызванного устойчивыми к антибиотикам штаммами *Mycobacterium tuberculosis* (MDR, XDR) и сопряженного с нарушением иммунного ответа организма (например, ВИЧ-инфекцией).

Известно, что туберкулезное воспаление сопровождается развитием окислительного стресса и связанного с ним повреждения различных органов [9, 13, 15]. Для микобактерий показано усиление пролиферации в условиях окислительного стресса и продукции активированных кислородных метаболитов (АКМ) и ингибирование деления в присутствии антиоксидантов (например, имитатора супероксиддисмутазы MnTE-2-PyP) [12]. Обнаружено, что скэвенджеры АКМ, такие как MnTE-2-PyP и N-ацетил-L-цистеин, снижают микобактериальную нагрузку инфицированных макрофагов, область поражения и деструктивные изменения в органах [11, 13]. Предположительной причиной такого эффекта может быть влияние указанных антиоксидантов на процессы фаголизосомального слияния: вероятно, MnTE-2-PyP восстанавливает редокс-баланс в клетке и запускает сигнальные пути, которые усиливают эти процессы [11].

Система Keap1/Nrf2/ARE является главным защитным механизмом, противостоящим окислительному стрессу [2]. Показано, что фармакологическая индукция редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE способствует повышению резистентности к различным бактериальным агентам как *in vitro*, так и *in vivo* за счет повышения фагоцитарной активности макрофагов и последующей деградациии бактерий [7, 10]. На сегодняшний день мало известно, какую роль опосредованная ARE регуляторная система играет в механизмах развития и разрешения микобактериального гранулематозного воспаления, вызванного вирулентными штаммами *M. tuberculosis*. Анализ данных литературы позволяет предположить, что система Keap1/Nrf2/ARE может принимать участие в патогенезе туберкулезного гранулематозного воспаления, внося вклад в процесс формирования гранулем, а ее активация с помощью различных веществ и последующее снижение продукции АКМ за счет увеличения экспрессии эндогенных антиоксидантов может снижать деструктивные изменения в органах. Однако взаимосвязь и механизм этих изменений при туберкулезном гранулематозном воспалении остаются мало изученными.

Ранее нами показано, что монофенол ТС-13 (3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия) обладает способностью индуцировать редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE [17]. На модели внутривенного введения мышам линии BALB/c вакцины БЦЖ проведено исследование действия ТС-13 на формирование гранулем и активность свободно-радикальных процессов в печени [6]. На 30 сутки после инфицирования в печени животных, получавших с питьевой водой антиоксидант ТС-13, наблюдалось достоверное снижение численной плотности гранулем (в 2,5 раза) и их диаметра (на 30 %). В экспериментах на мышах и крысах показано, что ТС-13 обладает выраженным защитным эффектом *in vivo* в отношении острых воспалительных процессов, способствуя уменьшению продукции АКМ и выраженности окислительного стресса, увеличивая выживаемость животных (септический шок) [8].

Высокая перспективность изучения роли окислительного стресса и редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в туберкулезном гранулематозе обусловила цель настоящего исследования – на модели экспериментального туберкулезного гранулематоза у мышей, вызванного вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, исследовать влияние оригинального индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE ТС-13 (3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия) на выживаемость животных и динамику формирования гранулем.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ТС-13 синтезирован в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск) как описано ранее [3]. Исследование проводили на базе Новосибирской межобластной ветеринарной лаборатории на самцах мышей линии BALB/c двухмесячного возраста, полученных из вивария ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Генерализованный туберкулезный гранулематоз моделировали однократным введением в хвостовую вену *M. tuberculosis* H37Rv в 0,2 мл изотонического раствора NaCl. Животные были разделены на 5 групп по 10 особей в каждой: группа 1 – «контроль» (интактные мыши, которым вводили 0,2 мл изотонического раствора); группа 2 – мыши, которым вводили 10⁶ микробных тел *M. tuberculosis* H37Rv в 0,2 мл изотонического раствора NaCl; группа 3 – мыши, которым вводили 10⁷ микробных тел *M. tuberculosis* H37Rv; группа 4 – мыши, которым вводили 10⁷ микробных тел *M. tuberculosis* H37Rv, получавшие в

дальнейшем с питьевой водой ТС-13 из расчета 100 мг/кг массы тела в сутки; группа 5 – мыши, которым вводили 10^8 микробных тел *M. tuberculosis* H37Rv. После инфицирования мышей наблюдали в течение 5 недель, выживаемость фиксировали ежедневно. Из эксперимента животных выводили путем дислокации позвонков в шейном отделе, забирали образцы тканей для гистологического исследования.

Для светооптического исследования полученный материал после фиксации в 10%-м растворе нейтрального формалина обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилолов с последующим заключением в парафин. Из образцов печени изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином по методу ван Гизона, для визуализации возбудителя *M. tuberculosis* в органах применяли специфический гистохимический метод окраски по Цилю – Нильсену. Методом морфометрии с помощью закрытой тестовой системы площадью $3,64 \times 10^5$ мкм² и инструментов программы ImageJ (NIH, США) на микроскопе AxioImager A1 («Carl Zeiss», Германия) определяли численную плотность (Nai) и диаметр гранулем.

Для определения достоверности различий в группах между кривыми выживаемости животных, построенными по методу Каплана – Майера, использовали F-критерий Кокса. Данные морфологических исследований представлены в виде среднего арифметического значения и ошибки среднего арифметического ($M \pm m$), различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента с поправкой Бенъямини – Хохберга (FDR) для множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании генерализованного туберкулезного гранулематоза с помощью однократного введения в хвостовую вену *M. tuberculosis* H37Rv наблюдались дозозависимые межгрупповые различия в динамике смертности мышей (рис. 1). При введении *M. tuberculosis* в дозе 10^6 микробных тел падежа животных не наблюдалось на протяжении всего эксперимента. При введении 10^8 микробных тел гибель животных начинали регистрировать на 16 сутки, а гибель 90 % животных наблюдалась к 26 суткам. При введении 10^7 микробных тел смертность мышей была существенно меньшей (различие между кривыми выживаемости животных групп 3 и 5 статистически значимо, $p = 0,01$), при этом динамика смертности различалась в зависимости от того, получали мыши ТС-13 с питьевой водой или нет. Так, гибель животных группы 3 начинали регистрировать на 26 сутки, мышей группы 4, получавших с питьевой водой ТС-13, – на 27 сутки, а к концу наблюдения (36 суток) выжило соответственно 30 и 40 % мышей. После проведения гистологического исследования органов мышей стало очевидно, что часть животных не были инфицированы (отсутствие гранулем и отсутствие окраски при иммуногистохимическом исследовании на *M. tuberculosis*). С учетом этих данных динамика смертности мышей приобретает другой вид, различие между кривыми выживаемости животных групп 3 и 4 становится статистически значимым ($p = 0,05$) и изменяется процентное соотношение числа мышей, выживших к концу наблюдения (36 суток): 15 % в группе 3 и 44 % – в группе 4 (рис. 1, б).

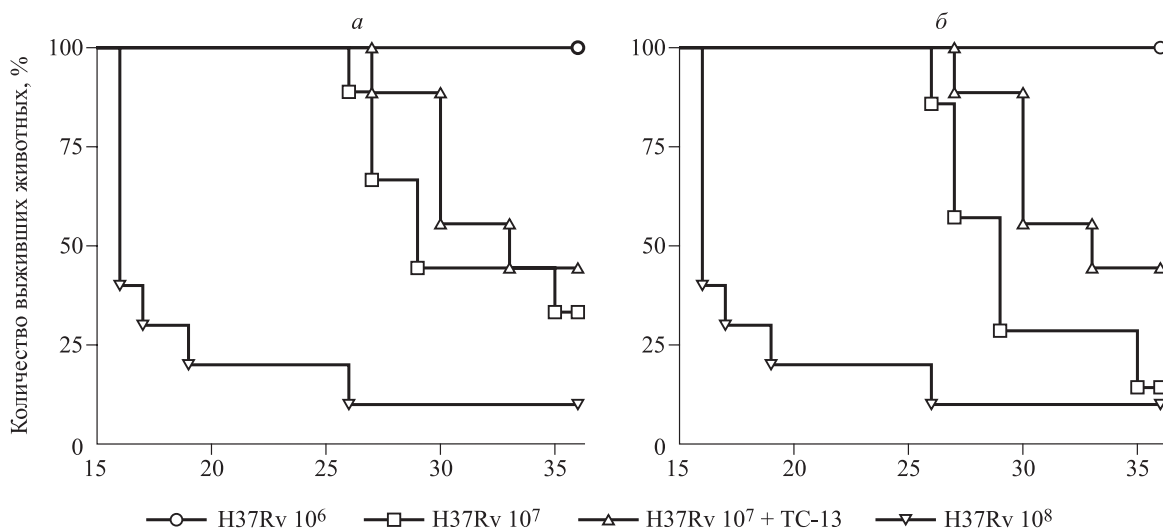


Рис. 1. Динамика выживаемости мышей после инфицирования *M. tuberculosis* штамм H37Rv

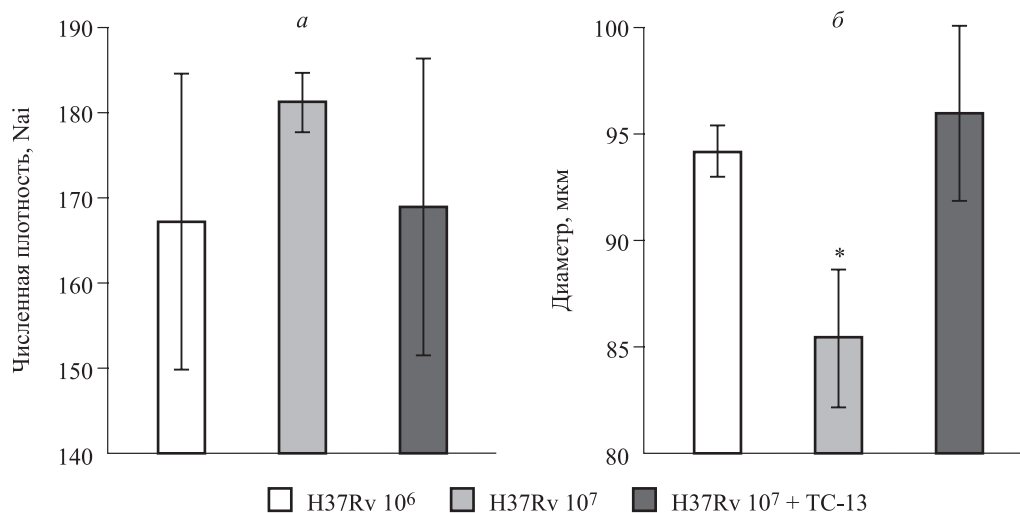


Рис. 2. Количество (а) и диаметр (б) гранул, образовавшихся в печени мышей после инфицирования *M. tuberculosis* штамм H37Rv; * – отличие от величины соответствующего показателя группы 2 статистически значимо при $p < 0,05$

При анализе гистологических срезов печени мышей, полученных на 36 сутки после инфицирования, выявлено наличие диффузно расположенных макрофагальных гранул. Их морфометрическое исследование показало, что гранулам при инфицировании дозой 10^7 микробных тел образовывалось несколько больше по сравнению с инокуляционной дозой 10^6 микробных тел ($p > 0,05$) (рис. 2, а), однако их диаметр был меньше ($p < 0,05$) (рис. 2, б). В группе мышей, инфицированных дозой 10^7 микробных тел и получавших ТС-13, количество и диаметр гранул не отличались от величин соответствующих показателей группы с инокуляционной дозой 10^6 микробных тел.

Снижение гибели животных, получавших ТС-13, согласуется с ранее полученными результатами. Сепсис является лидирующей причиной смертности, связанной с дисрегуляцией системного иммунного ответа в ответ на бактериальные инфекции, что влечет за собой множественную органную недостаточность и смерть. Существует общее мнение, что Nrf2 оказывает протективный эффект в отношении системных инфекций за счет влияния на NF-κB и модулирования экспрессии провоспалительных генов в макрофагах [16]. Ранее показано, что оригинальный синтетический монофенол ТС-13, индуцирующий Nrf2-зависимый сигнальный путь в экспериментах *in vitro* [3] и *in vivo* [8] и ингибирующий NF-κB-опосредованный сигналинг *in vivo* [14], обладает выраженным защитным эффектом *in vivo* в отношении острых воспалительных процессов, увеличивая выживаемость животных при септическом шоке [8].

Отсутствие положительного влияния ТС-13 на количество и размеры образовавшихся гранул не согласуется с нашей первоначальной гипотезой. Ранее на модели внутривенного введения мышам линии BALB/c вакцины БЦЖ проведено исследование действия ТС-13 на формирование гранул и активность свободнорадикальных процессов в печени [6]. На 30 сутки после инфицирования в печени животных, получавших с питьевой водой ТС-13 из расчета 100 мг/кг массы тела, наблюдалось достоверное снижение численной плотности гранул (в 2,5 раза) и их диаметра (на 30 %), а также активности свободнорадикальных процессов в печени. Хотя клеточный состав гранул был сходен, в гранулах мышей, получавших ТС-13, наблюдалось полное отсутствие гранулоцитов, являющихся главным деструктивным компонентом воспалительных процессов. Такие различия в динамике формирования гранул в зависимости от типа микобактерий, вероятно, связаны с их вирулентными свойствами. В случае инфицирования авирулентными микобактериями (БЦЖ) влияния индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE монофенола ТС-13 на активацию макрофагов достаточно для стимулирования элиминации возбудителя, что выражается в снижении количества и размеров гранул [4, 5]. В то же время вирулентный штамм сохраняет способность противостоять противомикобактериальной защите макрофагов, и инволюции гранулематозного процесса не наблюдается. О различии процессов гранулообразования говорит также следующий факт: если при инфицировании мышей вакциной БЦЖ зависимость между размерами и численной плотностью гранул в

печени была прямой (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,63$, $p = 0,0037$), то при инокуляции вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv – обр-атной ($r = -0,57$, $p = 0,0073$).

Возможно, влияние индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE монофенола ТС-13 на динамику формирования гранулем будет более выраженным при длительном сроке наблюдения (3–6 месяцев) или дополнительном воздействии противотуберкулезных препаратов (рифампицин, изониазид).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При моделировании у мышей BALB/c туберкулезного гранулематоза, вызванного внутривенным введением вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, наиболее адекватной является доза 10^7 микробных тел. Неинвазивное назначение животным оригинального монофенола ТС-13 способствует их лучшей выживаемости после инокуляции 10^7 микробных тел *M. tuberculosis*, что, возможно, связано с его способностью индуцировать редокс-зависимую систему Keap1/Nrf2/ARE, хотя не исключено опосредованное действие, через ингибирование провоспалительных сигнальных путей. Дальнейшее исследование возможности регуляции течения и инволюции гранулематозных воспалительных процессов индукторами редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE позволит разработать новые фармакологические средства и подходы к терапии туберкулеза.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят директора Новосибирской межобластной ветеринарной лаборатории В.В. Ларина за предоставление базы для проведения экспериментов с инфицированными животными. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» НИИЭКМ, при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00898).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева И.А., Белловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и

распространенность туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. 2017. 95. (6). 9–21.

2. Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Лабиринты регуляции Nrf2 // Биохимия. 2017. 82. (5). 757–767.

3. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Просенко А.Е., Гусаченко О.Н., Шкляева О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Биохимия. 2007. 72. (6). 790–798.

4. Кожин П.М., Зенков Н.К., Лемза А.Е., Чечушков А.В., Зайцева Н.С., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Влияние индукции редокс-чувствительной системы Keap1/Nrf2/ARE на классическую активацию макрофагов // Сиб. науч. мед. журн. 2015. 35. (6). 37–44.

5. Кожин П.М., Зенков Н.К., Чечушков А.В., Зайцева Н.С., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Редокс-чувствительная система антиоксидант-ре-спонсивного элемента как новая мишень для лечения туберкулеза // Acta Biomed. Sci. 2016. 1. (3-2). 92–95.

6. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В., Потапова О.В., Любимов Г.Ю., Любимова Г.А., Ягунов С.Е. Участие активированных кислородных метаболитов и редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в развитии гранулематозного воспаления // Сиб. науч. мед. журн. 2015. 35. (2). 31–36.

7. Harvey C.J., Thimmulappa R.K., Sethi S., Kong X., Yarmus L., Brown R.H., Feller-Kopman D., Wise R., Biswal S. Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model // Sci. Transl. Med. 2011. 3. (78). 78ra32.

8. Menshchikova E., Tkachev V., Lemza A., Sharkova T., Kandantseva N., Vavilin V., Safronova O., Zenkov N. Water-soluble phenol TS-13 combats acute but not chronic inflammation // Inflamm. Res. 2014. 63. (9). 729–740.

9. Menshchikova E., Zenkov N., Tkachev V., Potapova O., Cherdantseva L., Shkurupiy V. Oxidative stress and free-radical oxidation in BCG granulomatosis development // Oxid. Med. Cell. Longev. 2013. 2013. 452546.

10. Nairz M., Schleicher U., Schroll A., Sonnweber T., Theurl I., Ludwiczek S., Talasz H., Brandacher G., Moser P.L., Muckenthaler M.U., Fang F.C., Bogdan C., Weiss G. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in Salmonella infection // J. Exp. Med. 2013. 210. (5). 855–873.

11. Oberley-Deegan R.E., Lee Y.M., Morey G.E., Cook D.M., Chan E.D., Crapo J.D. The antioxidant

mimetic, MnTE-2-PyP, reduces intracellular growth of *Mycobacterium abscessus* // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2009. 41. (2). 170–178.

12. Oberley-Deegan R.E., Rebits B.W., Weaver M.R., Tollefson A.K., Bai X., McGibney M., Ovrutsky A.R., Chan E.D., Crapo J.D. An oxidative environment promotes growth of *Mycobacterium abscessus* // Free Radic. Biol. Med. 2010. 49. (11). 1666–1673.

13. Palanisamy G.S., Kirk N.M., Ackart D.F., Shanley C.A., Orme I.M., Basaraba R.J. Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in Guinea pigs with tuberculosis // PLoS One. 2011. 6. (10). e26254.

14. Shintyapina A.B., Vavilin V.A., Safronova O.G., Lyakhovich V.V. The gene expression profile of a drug metabolism system and signal transduction pathways in the liver of mice treated with tert-butylhydroquinone or 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)propylthiosulfonate of sodium // PLoS One. 2017. 12. (5). e0176939.

15. Shkurupiy V.A., Menshchikova E.B., Tkachev V.O., Zenkov N.K. Changes in activity of free radical oxidation processes in the early stages of BCG granulomatosis // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. 154. (2). 213–216.

16. Thimmulappa R.K., Lee H., Rangasamy T., Reddy S.P., Yamamoto M., Kensler T.W., Biswal S. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis // J. Clin. Invest. 2006. 116. (4). 984–995.

17. Tkachev V., Menshchikova E., Zenkov N., Zaitseva N., Lemza A., Sharkova T., Kandalintseva N., Yagunov S. Antioxidant response element activating sulfur-containing monophenols as novel anti-inflammatory agents // Free Radic. Biol. Med. 2010. 49. S149.

18. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. WHO, 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/259361/9789241565516-eng.pdf?ua=9789241565511> p.

MONOPHENOL TS-13 IMPROVES SURVIVAL IN MICE INFECTED WITH VIRULENT *Mycobacterium tuberculosis*

Peter Mikhaylovich KOZHIN¹, Anna Vladimirovna KOVNER¹,
Nikolay Konstantinovich ZENKOV¹, Tatyana Igorevna PETRENKO²,
Natal'ya Valer'evna KANDALINTSEVA³, Elena Bronislavovna MENSCHHIKOVA¹

¹ *Research Institute for Experimental and Clinical and Medicine*
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

² *Novosibirsk Research Institute for Tuberculosis*
630040, Novosibirsk, Okhotskaya str., 81a

³ *Novosibirsk State Pedagogical University*
630126, Novosibirsk, Viluyskaya str., 28

The aim of the study was to determine the dose of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv that is optimal for modeling experimental tuberculosis granulomatosis in mice and to investigate the effect of the original inductor of the Keap1/Nrf2/ARE system TS-13 (sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl) propylthiosulfonate) on animal survival and the dynamics of granuloma formation. **Material and methods.** Generalized tuberculosis granulomatosis was modeled by a single injection into the tail vein of male BALB/c mice of the 2-month-old *M. tuberculosis* strain H37Rv at doses of 10⁶, 10⁷ and 10⁸ microbial bodies. Another group of animals on the day of infection with *M. tuberculosis* (10⁷ microbial bodies) began to receive TS-13 with drinking water (100 mg/kg body weight). Survival was fixed daily; after 5 weeks, mice were euthanized and liver samples were taken for histological examination. **Results and discussion.** The dose of 10⁷ microbial bodies was found to be the most adequate when modeling in BALB/c mice the tuberculosis granulomatosis caused by the intravenous injection of virulent *M. tuberculosis* strain H37Rv. At the 36th day after the injection of 10⁷ microbial bodies, mortality was significantly lower in the group of mice receiving the inducer of the signal system Keap1/Nrf2/ARE monophenol TS-13 with drinking water (44 and 15% mice survived, respectively). At the same time, these two groups did not differ in the number and diameter of liver granulomas. The results show a high prospect of studying the role of oxidative stress and the redox-sensitive signal system Keap1/Nrf2/ARE in tuberculosis granulomatosis.

Key words: synthetic monophenol TS-13, tuberculosis, H37Rv, Keap1/Nrf2/ARE system.

Kozhin P.M. – candidate of medical sciences, researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: kozhinpm@gmail.com

Kovner A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, laboratory of structural bases of pathogenesis of socially significant diseases, e-mail: anya.kovner@gmail.com

Zenkov N.K. – doctor of biological sciences, leading researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru

Petrenko T.I. – doctor of medical sciences, chief researcher, e-mail: tpetrenko@nsk-niit.ru

Kandalintseva N.V. – candidate of chemical sciences, head, e-mail: aquaphenol@mail.ru

Menschchikova E.B. – doctor of medical sciences, head of the laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПЕГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2\text{-b}$

Дмитрий Николаевич КИНСИТ^{1,2}, Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{1,2},
Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА¹, Алексей Александрович ЧУРИН³,
Евгений Юрьевич ШЕРСТОБОЕВ³

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии»
630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 20

³ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН
634028, г. Томск, просп. Ленина, 3

Цель работы – изучение острой токсичности готовой лекарственной формы пегилированного интерферона $\alpha 2\text{-b}$ для перорального применения, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза. **Материал и методы.** Препарат вводился перорально мышам и крысам в расчетных терапевтических дозах и дозах, их превышающих. Регистрировались параметры: гибель животных, общее состояние и поведение, масса тела. **Результаты и их обсуждение.** Препарат не обладает токсическим действием при пероральном введении. Макроскопических признаков повреждения желудка не обнаружено. Определение LD не представляется возможным.

Ключевые слова: интерферон $\alpha 2\text{-b}$, пегилирование, иммобилизация, острая токсичность, доклинические исследования.

Рекомбинантные интерфероны в современной медицине применяются для терапии вирусных инфекций. В основном используется инъекционный путь введения интерферонов, который в ряде случаев недостаточно комплаентен для пациента, а также не всегда обеспечивает терапевтическую концентрацию в органах, поврежденных вирусами. Технология радиационного синтеза, основанная на облучении потоком ускоренных электронов раствора инертного полимера (например, полиэтиленгликоля (ПЭГ)) с белковыми молекулами (например, интерферона (ИФН)) позволяет синтезировать лекарственные средства, обладающие биодоступностью при пероральном приеме и сохраняющими фармакодинамические свойства исходных белковых молекул [1, 2]. Вместе с тем необходимо учитывать, что иммобилизация белковых молекул на инертных носителях изменяет фармакологические свойства исходных белков

[9]. Воздействие ионизирующего излучения также может изменять структуру протеинов вплоть до их разрушения. В связи с этим фармакологические свойства интерферонов, модифицированных иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, должны быть тщательно изучены. Ранее *in vitro* и *in vivo* было показано сохранение иммунотропных свойств модифицированного ПЭГ-ИФН $\alpha 2\text{-b}$ [7, 8]. Изучение токсикологической безопасности на животных в остром эксперименте является обязательной частью изучения токсичности новых лекарственных препаратов и химических соединений [5].

Цель данной работы – токсикологическая оценка безопасности готовой лекарственной формы для перорального применения ПЭГ-ИФН $\alpha 2\text{-b}$, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, на животных в остром эксперименте.

Кинсит Д.Н. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: kinsht@scpb.ru

Мадонов П.Г. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Тартынова Т.С. – клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Чурин А.А. – д.м.н., заведующий отделом лекарственной токсикологии

Шерстобоев Е.Ю. – д.м.н., проф., заведующий отделом иммунофармакологии

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Действующее вещество ПЭГ-ИФН α -2b получали с помощью облучения пучком электронов в дозе 1,5 Мрад предварительно замороженной при $-70\text{ }^\circ\text{C}$ смеси рекомбинантного ИФН α -2b с 5%-м раствором ПЭГ-1500. Состав готовой лекарственной формы (на 1 капсулу): ПЭГ-ИФН α -2b $1,2 \times 10^6$ МЕ, вспомогательные вещества – мальтодекстрин 0,3–0,36 г, декстран 0,03592–0,0898 г, полиэтиленгликоль 0,004–0,01 г, ЭДТА 0,08–0,2 мг. Изучаемое лекарственное средство защищено патентом РФ [3]. Животным перорально вводили готовую лекарственную форму в растворе фосфатно-солевого буфера.

Использовались аутбредные животные, 60 мышей CD-1, 60 крыс CD. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), ГОСТ Р 53434–2009, со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Определение острой токсичности ПЭГ-ИФН α -2b проведено в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [5]. В исследовании использованы животные одного возраста (2,5 мес.). Животные распределялись по группам случайным образом, так, чтобы их индивидуальная масса не отличалась более чем на 10 % средней массы животных одного пола. Время непрерывного наблюдения составляло 8 ч после введения вещества. Наблюдение общего состояния здоровья, выявление признаков токсичности, тяжелого состояния, смертности проводились один-два раза в день (в первой и во второй половине дня) во всех группах в течение всего периода наблюдения. Осмотр осуществлялся в клетке, на руках, а в случае необходимости – на открытой поверхности. Потребление корма регистрировалось ежедневно, визуально.

Оценивались характер экскреции, состояние шерсти, кожных покровов и слизистых оболочек, аппетит, дыхание, подвижность, нервно-мышечная возбудимость, походка, агрессивность, миез/мидриаз/экзофтальм и другие признаки отклонения от здоровья. Массу тела регистрировали во всех группах перед введением препарата, ежедневно в течение всего периода наблюдения, и выражали в граммах, прирост массы тела относительно первого дня исследования – в процентах.

В «остром» эксперименте были использованы следующие дозы: общепринятые терапевтические для человека в пересчете на мышей и крыс [6], а также дозы, их превышающие, – до пятикратной у мышей и девятикратной у крыс.

Препарат вводили внутрижелудочно, мышам (самцы и самки): 60×10^6 и 120×10^6 МЕ/кг – однократно, 200×10^6 МЕ/кг – двукратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых объемах, 250×10^6 МЕ/кг и 300×10^6 МЕ/кг – трехкратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых для мышей объемах (0,8–1 мл); крысы получали 12×10^6 МЕ/кг, 24×10^6 МЕ/кг и 36×10^6 МЕ/кг – однократно, 72×10^6 МЕ/кг – двукратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых объемах, 108×10^6 МЕ/кг – трехкратно с интервалом 4 ч в максимально допустимых для крыс объемах (5–8 мл).

Дозы препарата рассчитывали для каждого животного индивидуально, исходя из массы тела. В ходе исследования регистрировались:

- 1) гибель животных – ежедневно от начала до окончания периода наблюдения (14 дней);
- 2) общее состояние и поведение, тип токсических проявлений, их появление, развитие и/или прекращение их проявлений – ежедневно на протяжении 14-дневного периода наблюдения;
- 3) степень выраженности токсических проявлений (при их наличии) – ежедневно на протяжении 14-дневного периода наблюдения;
- 4) массу тела животных – в период проведения карантина и в ходе наблюдения.

После окончания эксперимента на 15 день животные были подвергнуты эвтаназии для осмотра внутренних органов. В случае гибели животных для определения LD_{10} , LD_{50} , и LD_{90} планировалось проведение пробит-анализа методом В.Б. Прозоровского [4].

Для количественных данных применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые представлены в итоговых таблицах. Для определения достоверности межгрупповых различий данные проанализированы с применением параметрических или непараметрических критериев в зависимости от типа распределения количественных данных. Нормальность распределения вариантов в группе определялась тестом Шапиро – Уилка при 5%-м уровне значимости, различия между группами определяли с помощью t -критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ выполнен для каждого пола отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При внутрижелудочном введении готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН α -2b мышам и крысам в различных дозах гибели животных не наблюдалось. При наблюдении в течение 14 дней

Таблица 1

Средние значения и прирост массы тела мышей при пероральном введении готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН α -2b в разных дозировках

День взвешивания	Пол, число в группе	Группа животных					
		Контроль	60×10 ⁶ МЕ/кг	120×10 ⁶ МЕ/кг	200×10 ⁶ МЕ/кг	250×10 ⁶ МЕ/кг	300×10 ⁶ МЕ/кг
Масса тела, г							
Карантин	♂, n = 5	24,14 ± 0,57	25,82 ± 0,86	24,92 ± 0,87	24,73 ± 0,52	26,08 ± 0,43	24,24 ± 0,69
	♀, n = 5	20,14 ± 0,26	20,02 ± 0,10	19,98 ± 0,16	19,87 ± 0,16	19,98 ± 0,07	20,26 ± 0,27
1 день	♂, n = 5	31,44 ± 1,80	31,52 ± 1,29	32,58 ± 1,44	31,70 ± 0,91	31,96 ± 0,97	32,50 ± 1,53
	♀, n = 5	22,80 ± 0,93	23,36 ± 0,70	22,28 ± 0,72	21,92 ± 0,69	22,78 ± 0,50	22,54 ± 0,80
8 день	♂, n = 5	34,94 ± 1,80	35,02 ± 1,29	36,18 ± 1,51	35,10 ± 1,01	35,50 ± 0,94	35,78 ± 1,52
	♀, n = 5	26,30 ± 0,93	26,42 ± 0,77	26,02 ± 0,90	25,44 ± 0,89	25,98 ± 0,76	25,98 ± 0,78
15 день	♂, n = 5	38,86 ± 1,91	39,00 ± 1,49	39,78 ± 1,59	38,50 ± 1,11	39,04 ± 0,91	39,06 ± 1,52
	♀, n = 5	30,22 ± 0,98	29,48 ± 0,92	29,76 ± 1,10	28,96 ± 1,14	29,18 ± 1,04	29,42 ± 0,86
Прирост массы тела, %							
8 день	♂, n = 5	11,30 ± 0,68	11,18 ± 0,45	11,10 ± 0,39	10,72 ± 0,10	11,12 ± 0,45	10,18 ± 0,66
	♀, n = 5	15,46 ± 0,66	13,14 ± 1,19	16,76 ± 0,72	16,03 ± 1,21	13,99 ± 1,14	15,40 ± 1,58
15 день	♂, n = 5	23,84 ± 1,82	23,84 ± 1,85	22,22 ± 0,79	21,44 ± 0,17	22,26 ± 0,93	20,38 ± 1,32
	♀, n = 5	32,75 ± 1,51	26,27 ± 2,37	33,52 ± 1,45	32,06 ± 2,42	27,98 ± 2,29	30,79 ± 3,17

Таблица 2

Средние значения и прирост массы тела крыс при пероральном введении готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН α -2b в разных дозировках

День взвешивания	Пол, число в группе	Группа животных					
		Контроль	12×10 ⁶ МЕ/кг	24×10 ⁶ МЕ/кг	36×10 ⁶ МЕ/кг	72×10 ⁶ МЕ/кг	108×10 ⁶ МЕ/кг
Масса тела, г							
Карантин	♂, n = 5	185,96 ± 7,47	183,03 ± 12,52	172,92 ± 7,18	176,04 ± 7,38	183,57 ± 5,01	183,10 ± 11,30
	♀, n = 5	169,43 ± 7,11	160,47 ± 4,06	163,32 ± 3,98	167,20 ± 6,05	159,77 ± 4,49	162,49 ± 10,75
1 день	♂, n = 5	234,00 ± 5,10	233,20 ± 2,60	233,40 ± 3,08	234,40 ± 3,87	235,00 ± 2,81	234,40 ± 3,01
	♀, n = 5	203,95 ± 5,57	202,98 ± 6,67	202,77 ± 7,48	204,24 ± 5,78	200,81 ± 5,99	202,74 ± 5,78
8 день	♂, n = 5	272,00 ± 5,51	269,60 ± 3,57	270,00 ± 3,69	272,80 ± 4,94	274,00 ± 3,16	270,40 ± 4,03
	♀, n = 5	236,15 ± 5,67	235,37 ± 6,18	235,17 ± 6,81	235,44 ± 6,97	233,81 ± 5,50	234,94 ± 6,18
15 день	♂, n = 5	308,00 ± 5,54	306,80 ± 3,51	305,60 ± 4,42	308,00 ± 6,26	310,60 ± 3,64	305,00 ± 4,42
	♀, n = 5	267,95 ± 6,23	267,34 ± 5,64	267,17 ± 7,12	266,04 ± 6,46	265,01 ± 5,29	266,74 ± 5,77
Прирост массы тела, %							
8 день	♂, n = 5	16,26 ± 0,71	15,60 ± 0,51	15,68 ± 0,62	16,37 ± 0,24	16,60 ± 0,58	15,35 ± 0,61
	♀, n = 5	15,83 ± 0,66	16,06 ± 0,77	16,11 ± 0,93	15,27 ± 0,59	16,53 ± 1,03	15,91 ± 0,30
15 день	♂, n = 5	31,70 ± 1,58	31,58 ± 1,03	30,93 ± 0,78	31,37 ± 0,58	32,17 ± 0,33	30,13 ± 1,06
	♀, n = 5	31,44 ± 0,77	31,91 ± 1,57	31,96 ± 1,41	30,33 ± 0,89	32,15 ± 1,86	31,67 ± 0,89

после внутрижелудочного введения препарата не было зафиксировано никаких отклонений общего состояния, внешнего вида и поведения животных. В этой ситуации проведение пробит-анализа для определения LD₁₀, LD₅₀, и LD₉₀ не представляется возможным.

При запланированной эвтаназии на 15 день наряду с общим осмотром проведен осмотр желуд-

ка (место введения). Никаких макроскопических признаков, свидетельствующих о повреждении желудка – гиперемии, нарушении целостности слизистой оболочки, не обнаружено. Результаты взвешивания животных, представленные в таблицах, свидетельствуют о том, что статистически значимых различий между контролем и группами наблюдения не наблюдается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена токсикологическая оценка безопасности готовой лекарственной формы для перорального применения ПЭГ-ИФН α -2b, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, на мышах и крысах в остром эксперименте. Установлено, что исследуемый препарат в расчетных терапевтических дозах и дозах, их превышающих (до пятикратной у мышей и девятикратной у крыс), не обладает токсическим действием при внутрижелудочном введении в течение 14 дней; у мышей и крыс не было зафиксировано никаких отклонений общего состояния, внешнего вида и поведения. Гибели животных не зафиксировано, статистически значимых различий массы тела между контролем и группами наблюдения не обнаружено. Макроскопическое исследование при вскрытии животных на 14 сутки после введения не выявило какой-либо патологии внутренних органов. Препарат не обладает местно-раздражающим действием.

Введение лекарственной формы крысам и мышам в максимально возможном объеме не позволило достигнуть гибели животных и, следовательно, применить пробит-анализ для вычисления LD_{10} , LD_{50} и LD_{90} . Таким образом, для мышей значение LD_{50} превышает 300×10^6 МЕ/кг, для крыс – 108×10^6 МЕ/кг. Используемые дозы многократно превышают максимально применяемые суточные дозы ИФН α -2b для человека в пересчете на массу тела при парентеральном введении (от 3 млн МЕ/сут или 43000 МЕ/кг); препарат при внутрижелудочном введении в дозах, максимально возможных для введения животным, может быть отнесен к 4 классу опасности (по классификации ГОСТ 12.1.007-76).

Таким образом, отсутствие токсичности в «остром» эксперименте при сохранении иммунотропных свойств и подтвержденной биодоступности при пероральном приеме позволяет рассматривать модифицированный иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза ИФН α -2b как препарат, расширяющий арсенал пероральных иммунотропных средств в практической медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа проведена в рамках исполнения Государственного контракта от 14 мая 2012 г. № 16.N08.12.1017, ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности

Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (шифр темы проекта «2012-2.5-16-N08-0001-001»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Святченко В.А., Терновой В.А. Экспериментальное обоснование применения пероральной формы пегилированного интерферона α 2-b для терапии энтеровирусной инфекции // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (3). 11–16.
2. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Запозецкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Мед. и образ. в Сибири. 2013. (4). Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115. Дата обращения: 13.09.2017.
3. Пат. № 2554761 РФ. Противоэнтеровирусное и иммуностимулирующее средство / А.В. Аргамонов, А.А. Бекарев, Н.В. Балданов, Д.Н. Киншт, П.Г. Мадонов, П.Н. Мирошников, А.М. Дыгай, М.Г. Данилец, А.А. Лигачева, Н.В. Масная, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, О.Г. Шитикова; Опубл. 13.05.2014.
4. Прозоровский В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности // Фармакология и токсикология. 1962. 25. (1). 115–119.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. А.Н. Миронов. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриев. М.: Медицина, 2005. 832 с.
7. Шерстобоев Е.Ю., Шитикова О.Г., Масная Н.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Ершов К.И., Шилова М.А. Иммунотропные свойства иммобилизованного интерферона α -2b // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2016. 161. (5). 637–641.
8. Шитикова О.Г., Шерстобоев Е.Ю., Масная Н.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Ершов К.И., Шилова М.А. Влияние иммобилизованного интерферона- α 2b на функциональную активность иммунокомпетентных клеток *in vitro* // Иммунология. 2016. 37. (3). 155–161.
9. Wang Y.S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D.F. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications // Adv. Drug Deliv. Rev. 2002. 54. (4). 547–570.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ACUTE TOXICITY OF THE ORAL FORM OF PEGYLATED INTERFERON α 2-b

**Dmitriy Nikolaevich KINSHT^{1,2}, Pavel Gennad'evich MADONOV^{1,2},
Tatyana Sergeevna TARTYNOVA¹, Alexey Alexandrovich CHURIN³,
Eugeny Yur'evich SHERSTOBOEV³**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology
630056, Novosibirsk, Sofiyevskaya st., 20*

³ *Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center of RAS
634028, Tomsk, Lenin av., 3*

The aim of the study is to investigate the acute toxicity of the oral finished dosage form of pegylated interferon α -2b, obtained with the help of electron-beam synthesis technology. **Material and methods.** The preparation was orally administered to mice and rats at calculated therapeutic doses and doses exceeding them. Recorded parameters: animal death, general condition and behavior, weight of animals. **Results and discussion.** The drug has no toxic effect when administered orally. No macroscopic signs of gastric damage were found. The definition of LD is not possible.

Key words: interferon α -2b, pegylation, immobilization, acute toxicity, preclinical trials.

Kinsht D.N. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: kinsht@scpb.ru

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Tartynova T.S. – clinical resident of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Churin A.A. – doctor of medical sciences, head of the department of drug toxicology

Sherstoboev E. Yu. – doctor of medical sciences, professor, head of immunopharmacology department

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПЕГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА α -2b ПРИ ЕГО ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Алексей Александрович ЧУРИН¹, Евгений Юрьевич ШЕРСТОБОЕВ¹,
Дмитрий Николаевич КИНШТ^{2,3}, Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА²,
Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{2,3}

¹ *НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН 634028, г. Томск, просп. Ленина, 3*

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

³ *АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» 630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 20*

Цель работы – изучение хронической токсичности готовой лекарственной формы пегилированного интерферона α -2b для перорального применения, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза. **Материал и методы.** Препарат вводился перорально крысам и кроликам в расчетных терапевтических дозах и дозах, их превышающих. Изучалось влияние препарата на общее состояние и массу тела, гематологические показатели, миелограмму, биохимические параметры крови, выделительную и сердечно-сосудистую системы, ЦНС, проводилось патоморфологическое исследование. **Результаты и их обсуждение.** Препарат не обладает токсическим и местно-раздражающим действием при курсовом пероральном введении.

Ключевые слова: интерферон α -2b, пегилирование, электронно-лучевая иммобилизация, хроническая токсичность, доклинические исследования.

Несмотря на успехи в создании противовирусных препаратов прямого действия, в современной медицине сохраняется необходимость использования интерферонов (ИФН). Парентеральное введение не во всех случаях обеспечивает достижение их высокой концентрации в поврежденных органах и создает определенные неудобства для пациентов. Иммобилизация интерферонов на биологически инертном полимере (например, полиэтиленгликоле (ПЭГ)) с помощью ионизирующего излучения при одновременном обеспечении пероральной биодоступности препарата и сохранении фармакодинамических свойств исходных белковых молекул открывает новые возможности в терапии вирусных заболеваний [1, 2, 6]. В то же

время ионизирующее излучение может в значительной степени изменять структуру белков [8], что требует тщательного изучения фармакологических свойств полученных веществ. Изучение токсикологической безопасности на животных является неотъемлемой частью доклинических исследований, направленных на получение доказательств безопасности лекарственных средств [4].

Целью данной работы является характеристика степени повреждающего действия готовой лекарственной формы (ГЛФ) для перорального применения ПЭГ-ИФН α -2b, полученного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза, при его длительном введении крысам и кроликам.

Чурин А.А. – д.м.н., зав. отделом лекарственной токсикологии

Шерстобоев Е.Ю. – д.м.н., проф., зав. отделом иммунофармакологии

Киншт Д.Н. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: kinsht@scpb.ru

Тартынова Т.С. – клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Мадонов П.Г. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Действующее вещество ПЭГ-ИФН α -2b получали с помощью облучения пучком электронов в дозе 1,5 Мрад предварительно замороженной при -70 °С смеси рекомбинантного ИФН α -2b с 5%-м раствором ПЭГ-1500. Состав ГЛФ (на 1 капсулу): ПЭГ-ИФН α -2b $1,2 \times 10^6$ МЕ, вспомогательные вещества – мальтодекстрин 0,3–0,36 г, декстран 0,03592–0,0898 г, полиэтиленгликоль 0,004–0,01 г, ЭДТА 0,08–0,2 мг. Изучаемое лекарственное средство защищено патентом РФ [3].

Исследование хронической токсичности проводилось в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [4]. В эксперименте использовали аутбредные животные: 80 крыс CD, по 10 самцов и 10 самок в каждой группе (контрольная группа и три группы наблюдения), возраст 2,5 мес.; 12 кроликов породы шиншилла, по 2 самца и 2 самки в каждой группе (контрольная и две группы наблюдения), масса 2600–3100 г, возраст 2,5–3 мес. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), ГОСТ Р 53434–2009, со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Для эксперимента были использованы общепринятые терапевтические дозы для человека в пересчете на крыс и кроликов [5], а также дозы, превышающие их в 5 и 10 раз для крыс (соответственно 85 000, 425 000 и 850 000 МЕ/кг) и в 5 раз для кроликов (46 500 и 232 500 МЕ/кг). ГЛФ вводили внутривентрикулярно в растворе фосфатно-солевого буфера в течение 28 дней, контрольная группа получала фосфатно-солевой буфер. Крысы наблюдались в течение 14 дней после окончания курса введения ГЛФ.

Наблюдение общего состояния здоровья, выявление признаков токсичности, тяжелого состояния, смертности проводились один-два раза в день во всех группах в течение всего периода наблюдения. Осмотр осуществлялся в клетке, на руках, а в случае необходимости – на открытой поверхности. Масса тела регистрировалась во всех группах перед первым введением, еженедельно в течение всего периода наблюдения. Потребление корма регистрировалось еженедельно, визуально. Температуру тела измеряли ректально с помощью медицинского электротермометра ТПЭМ-1, у крыс по окончании введения ГЛФ и по окончании срока наблюдения, у кроликов – еженедельно.

Лабораторные исследования крови и костного мозга проводились у всех животных на 28 день эксперимента, у крыс также через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ. Гематологические показатели (количество эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, показатели лейкограммы, СОЭ) определялись с помощью гематологического анализатора Mythic 18 (Orphée, Швейцария). Состояние костно-мозгового кровотока у крыс оценивали путем подсчета общего количества миелокариоцитов на бедренную кость и миелограмм на мазках, приготовленных из гомогената фрагмента миелоидной ткани, взятой из сегмента грудины, и аутологичной сыворотки (1:1), комбинированно окрашенных фиксатором-красителем Май-Грюнвальда и азуром II и эозином по Нохту. У кроликов костный мозг получали из сегмента грудины.

Биохимические показатели сыворотки крови (активность АсАТ, АлАТ, щелочной фосфатазы; содержание глюкозы, общего белка, мочевины, креатинина, общего холестерина, билирубина, натрия, калия, хлоридов) определяли на полуавтоматических анализаторах (PZ S.A. Coema, Польша; ERBA Diagnostics Mannheim GmbH, Германия) с использованием стандартных наборов для биохимического анализа.

Почечный метаболизм у крыс изучали на 28 день эксперимента и через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ. Определяли суточный диурез, удельную плотность и pH мочи, наличие глюкозы, билирубина, кетонов, скрытой крови, белка, уробилиногена, нитритов и лейкоцитов. Исследование проводилось на автоматическом анализаторе мочи CLINITEK-50 на полосках URS-10 (Siemens, США). Сбор мочи проводили в индивидуальных обменных клетках, в которых крысы находились в течение суток после предварительной адаптации и водной нагрузки. Дистиллированную воду вводили животным внутривентрикулярно с помощью зонда из расчета 2 % от массы тела.

Для оценки влияния препарата на ЦНС изучалось ориентировочно-исследовательское поведение крыс в «открытом поле» (самцы и самки раздельно) на 28 день эксперимента и через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ. Экспериментальная установка «открытое поле» представляет собой камеру размером $100 \times 100 \times 60$ см с квадратным полом и стенками белого цвета. Пол камеры разделен на 16 квадратов, в каждом квадрате – круглое отверстие диаметром 6 см. Сверху камера освещена электрической лампой накаливания мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 1 м от пола камеры. Крыса помеща-

лась в один из углов камеры и в течение 5 мин регистрировалось количество пересеченных ею горизонтальных квадратов (горизонтальная активность), количество заглядываний в отверстия (норковый рефлекс), вставаний на задние лапы (вертикальная активность), умывание (груминг), актов дефекаций по количеству фекальных шариков. Затем все данные суммировались и определялась общая двигательная активность.

На 28 день эксперимента и через 14 дней после окончания курса введения ГЛФ у крыс проводили исследование сердечно-сосудистой системы. ЭКГ регистрировали во втором стандартном отведении при усилении $1 \text{ mv} = 20 \text{ мм}$ и скорости записи 50 мм/с на электрокардиографе Поли-Спектр-8В (программа анализа «Поли-Спектр») под эфирным наркозом в положении животных спиной вверх. По снятой электрокардиограмме рассчитывали частоту сердечных сокращений, измеряли амплитуду зубцов Р, R, Т и длительность интервалов PQ, QT, QRS. Показатели опытных групп сравнивались с соответствующими показателями для контрольных групп животных, для самок и самцов раздельно [7].

Эвтаназия осуществлялась ингаляцией CO_2 , кроликам – после 28 дней введения исследуемого препарата, крысам – через 28 дней введения и через 2 недели после отмены. При некропсии исследовали внешнее состояние тела животных, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, внутренние поверхности и проходы, шею с органами и тканями, скелетно-мышечную систему и каркас. Все отклонения от нормы документировались. Определялась масса головного мозга, тимуса, сердца, легких, печени, надпочечников, почек, селезенки, семенников/яичников. Коллекция органов производилась сразу после некропсии животных. Фиксированные ткани обезвоживали, пропитывали парафином и заливали в парафиновые блоки; с помощью микротомы изготавливали тонкие серийные (не более 5 мкм) срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили гистологическое исследование срезов с помощью световой микроскопии с оценкой и описанием состояния исследуемых тканей.

Для количественных данных применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые представлены в итоговых таблицах. Для определения достоверности межгрупповых различий данные проанализированы с применением параметрических или непараметрических критериев в зависимости от типа распределения количественных данных. Нормальность распределения вариантов в группе определялась тестом Шапиро

ро – Уилка при 5%-м уровне значимости, различия между группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ выполнен для каждого пола отдельно. Различия определялись при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование хронической токсичности на крысах. Во время введения препарата состояние крыс было удовлетворительным, гибели животных не наблюдалось. Все крысы равномерно прибавляли в массу, по окончании введения и через две недели после отмены препарата масса тела и ее прирост во всех экспериментальных группах не отличались от контроля. При измерении температуры тела крыс по окончании введения и через 2 недели после отмены приема ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b не выявлено патологических изменений и статистически значимых различий с контрольной группой. Анализ лабораторных показателей крови и результатов исследования костного мозга через 28 дней введения ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b и через 2 недели после отмены препарата не выявил изменений в экспериментальных группах по сравнению с контролем.

Результаты экспериментов показали, что введение ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b в течение 28 дней не приводит к изменению биохимических показателей крови крыс, а также показателей, отражающих функциональное состояние почек. Так, суточный объем мочи, рН, удельная плотность не различались в опытных и контрольной группах. Глюкоза, белок, билирубин, уробилиноген, нитриты, кетоны, лейкоциты скрытой крови, определяемые полуколичественным методом, не были выявлены в моче у животных во всех группах по окончании введения лекарственного средства и через 14 дней после окончания курса введения.

Курс введения ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b не влиял на показатели ориентировочно-исследовательского поведения у крыс в тесте «открытое поле», о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий между показателями опытных и контрольных групп животных. У крыс экспериментальных групп через 28 дней введения исследуемого препарата и через 14 дней после окончания курса не выявлено нарушений сердечного ритма и проводимости. Длительность интервалов и амплитуда зубцов электрокардиограммы также статистически достоверно не отличались от соответствующих значений у животных контрольной группы и не выходили за пределы физиологических норм, принятых для данного вида животных. При макроскопическом исследовании

довании на вскрытии у всех крыс, получавших ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b, не обнаружено какой-либо патологии внутренних органов и изменений в месте введения. Анализ полученных данных по массе и коэффициенту массы органов не выявил различий между контрольными и экспериментальными животными. Микроскопическое исследование внутренних органов всех крыс показало, что они имели обычное строение и не отличались от контрольных животных. Слизистая оболочка желудка без признаков гиперемии, отека и инфильтрации.

Исследование хронической токсичности на кроликах. Введение ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b кроликам в течение 28 дней внутрижелудочно в исследуемых дозах не вызывало патологических изменений общего состояния. Гибели животных не наблюдалось. При еженедельном взвешивании масса тела и ее прирост у животных опытных и контрольной групп статистически значимо не различались. Измерение температуры тела кроликов не выявило патологических изменений и статистически значимых различий с контрольными животными. Патологических изменений показателей форменных элементов крови, СОЭ и костного мозга не обнаружено. Биохимические показатели сыворотки крови не отличались у кроликов разных групп и не выходили за пределы физиологических норм. Макроскопическое исследование при вскрытии всех животных не выявило какой-либо патологии внутренних органов. Анализ полученных данных показывает отсутствие разницы в массе и коэффициенте массы внутренних органов кроликов контрольной и экспериментальных групп. Микроскопическое исследование внутренних органов экспериментальных животных показало, что практически все они имели обычное строение и не отличались от контроля. Слизистая оболочка желудка была без признаков гиперемии, отека и инфильтрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение хронической токсичности готовой лекарственной формы ПЭГ-ИФН α -2b для перорального применения на крысах и кроликах. Исследуемый препарат вводился крысам в терапевтической дозе и в дозах, превышающих терапевтическую в 5 и 10 раз (соответственно 85 000, 425 000, 850 000 МЕ/кг), кроликам – в терапевтической дозе и дозе, превышающей терапевтическую в 5 раз (соответственно 46 500 и 232 500 МЕ/кг). Проведенные эксперименты показали, что препарат в исследуемых дозах не оказывает влияния на общее состояние, массу тела и температуру тела крыс и кроликов, показатели

форменных элементов крови и СОЭ, показатели миелограммы, биохимические параметры сыворотки крови. При исследовании функции почек, ЦНС и сердечно-сосудистой системы у крыс не обнаружено патологических изменений после 28-дневного курса введения препарата и 14 дней после отмены курса.

Макро- и микроскопическое исследование внутренних органов не выявило каких-либо патологических изменений по сравнению с контролем у крыс и кроликов. Исследование слизистой оболочки желудка экспериментальных животных показало, что при внутрижелудочном введении ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b не обладает местно-раздражающим действием.

Проведенные исследования позволяют утверждать, что ГЛФ иммобилизованного с помощью электронно-лучевой технологии ИФН α -2b при пероральном приеме в течение 28 дней не оказывает токсического влияния на исследованные органы и системы экспериментальных животных в выбранных условиях экспериментального исследования. Отсутствие токсичности у ГЛФ ПЭГ-ИФН α -2b при сохранении иммунотропного эффекта, противовирусного действия, а также пероральной биодоступности дает возможность рассматривать разработанное лекарственное средство как перспективный иммунотропный и противовирусный препарат для перорального приема.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа проведена в рамках исполнения Государственного контракта от 14 мая 2012 г. № 16.N08.12.1017, ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (шифр темы проекта «2012-2.5-16-N08-0001-001»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кинит Д.Н., Мадонов П.Г., Святченко В.А., Терновой В.А. Экспериментальное обоснование применения пероральной формы пегилированного интерферона α 2-b для терапии энтеровирусной инфекции // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (3). 11–16.
2. Мадонов П.Г., Еришов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Кинит Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Мед. и образ. в Сибири. 2013. (4). Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115 (дата обращения: 13.02.2017).

3. Пат. № 2554761 РФ. Противоэнтеровирусное и иммуностимулирующее средство / А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, Н.В. Балданов, Д.Н. Киншт, П.Г. Мадонов, П.Н. Мирошников, А.М. Дыгай, М.Г. Данилец, А.А. Лигачева, Н.В. Масная, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, О.Г. Шитикова; Опубл. 13.05.2014.

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. А.Н. Миронов. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р.У. Хабриев. М.: Медицина, 2005. 832 с.

6. Шерстобоев Е.Ю., Шитикова О.Г., Масная Н.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Ершов К.И., Шилова М.А. Иммуотропные свойства иммобилизованного интерферона α -2b // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2016. 161. (5). 637–641.

7. Martin M. Small animal ECGs: an introductory guide, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2013. 136 p.

8. Wang Y.S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D.F. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications // Adv. Drug Deliv. Rev. 2002. 54. (4). 547–570.

PRECLINICAL STUDY OF THE TOXICITY OF THE ORAL FORM OF PEGYLATED INTERFERON α -2b UNDER ITS LONG-TERM USE

Alexey Alexandrovich CHURIN¹, Eugeny Yur'evich SHERSTOBOEV¹,
Dmitriy Nikolaevich KINSHT^{2,3}, Tatyana Sergeevna TARTYNOVA²,
Pavel Gennad'evich MADONOV^{2,3}

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
Tomsk National Research Medical Center of RAS
634028, Tomsk, Lenin av., 3

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

³ Siberian Center of Pharmacology and Biotechnology
630056, Novosibirsk, Sofiyskaya str., 20

The aim of the study is to investigate the chronic toxicity of the oral finished dosage form of pegylated interferon α -2b, obtained with the help of electron-beam synthesis technology. **Materials and methods.** The preparation was orally administered to rats and rabbits at the calculated therapeutic doses and doses exceeding them. The drug effect on the general condition and body weight, hematological parameters, myelogram, blood biochemical parameters, excretory and cardiovascular system, CNS were studied. As well as pathomorphological examination was carried out. **Results and discussion.** The drug has no toxic and locally irritating effect under its long-term use per os.

Key words: interferon α -2b, pegylation, electron-beam immobilization, chronic toxicity, preclinical trials.

Churin A.A. – doctor of medical sciences, the department of drug toxicology

Sherstoboev E. Yu. – doctor of medical sciences, professor, head of immunopharmacology department

Kinsht D.N. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: kinsht@scpb.ru

Tartynova T.S. – clinical resident of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

ОБРАТНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ МОНОФЕНОЛОВ СТРУКТУРНО ВЗАИМОСВЯЗАННОГО РЯДА И ИХ ТОКСИЧНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Павел Игоревич ГАЙНУТДИНОВ¹, Пётр Михайлович КОЖИН¹,
Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ¹, Григорий Григорьевич МАРТИНОВИЧ²,
Сергей Викторович ХОЛЬШИН³, Наталья Валерьевна КАНДАЛИНЦЕВА³,
Николай Константинович ЗЕНКОВ¹, Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА¹

¹ НИИ экспериментальной и клинической медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Белорусский государственный университет
220030, г. Минск, просп. Независимости, 4

³ Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

Целью настоящего исследования послужило изучение взаимосвязи между антиоксидантной активностью новых синтетических водорастворимых монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их влиянием на жизнеспособность опухолевых клеток *in vitro*. **Материал и методы.** Синтезированы пять оригинальных гидрофильных серо- и селен-содержащих монофенолов, различающихся длиной углеводородной цепи алкилтиосульфатного заместителя, находящегося в *para*-положении по отношению к гидроксильной группе, количеством *tert*-бутильных *ortho*-заместителей и варьированием фрагмента «S–S»: 3-(3'-*tert*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12), 3-(3'-*tert*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (С-13), 3-(3'-*tert*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилселеносульфат натрия (SeС-13), 3-(3'-*tert*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), 3-(3',5'-ди-*tert*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17). Антиоксидантную активность соединений определяли в бесклеточной модельной тест-системе по способности ингибировать люминол-зависимую хемилюминесценцию азоинициатора ААРН, противоопухолевую цитотоксичность – по влиянию на жизнеспособность моноцито/макрофагоподобных клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937 и клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в МТТ-тесте. **Результаты и их обсуждение.** Все использованные в настоящем исследовании фенольные соединения проявляли антиоксидантную активность в бесклеточной модельной системе (ингибирование радикала азоинициатора ААРН) и цитотоксичность в отношении клеток U937 и MCF-7, эффект зависел от дозы и структуры молекулы. Наблюдалась прямая зависимость между структурой монофенолов и их способностью угнетать жизнеспособность опухолевых клеток разных линий вне зависимости от происхождения последних, миелоидного (U937)

Гайнутдинов П.И. – аспирант лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов,
e-mail: pg@centercem.ru

Кожин П.М. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов,
e-mail: kozhinpt@gmail.com

Чечушков А.В. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов,
e-mail: achechushkov@gmail.com

Мартинович Г.Г. – д.б.н., зав. кафедрой биофизики, e-mail: martinovichgg@bsu.by

Хольшин С.В. – старший преподаватель кафедры химии, e-mail: s.kholshin@gmail.com

Кандалинцева Н.В. – к.х.н., директор Института естественных и социально-экономических наук,
e-mail: aquarphenol@mail.ru

Зенков Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru

Меньщикова Е.Б. – д.м.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов,
e-mail: lemen@centercem.ru

или эпителиального (MCF-7), и типа роста (соответственно неприкрепленных и прикрепленных), а также диапазона концентраций соединений (соответственно от 100 до 500 мкМ и от 2 до 150 мкМ). В то же время зависимость между антиоксидантной активностью монофенолов и их цитотоксичностью была реципрокной (при исключении из анализа СеС-13), что может быть связано как со способностью опухоли к самозащите от активированных кислородных метаболитов, так и с непрямым прооксидантным эффектом фенольных соединений.

Ключевые слова: монофенольные антиоксиданты, клетки MCF-7, клетки U937, жизнеспособность, токсичность, антиоксидантная активность.

История исследований терапевтического потенциала антиоксидантов берет свое начало с 40–50-х годов XX в., с открытия роли цепных свободнорадикальных процессов в биологических системах. Как это нередко бывает, бурный всплеск интереса к ним в 60–70-х годах и оптимизм в решении проблем терапии и профилактики заболеваний, связанных с развитием окислительного стресса, соблазнительно простым путем (с помощью антиоксидантов) сменился пессимизмом 1990–2000-х годов, когда в результате проведения большого количества когортных исследований с назначением различных комбинаций антиоксидантов не всегда удавалось добиться снижения риска развития сердечно-сосудистых, злокачественных, нейродегенеративных и других патологий [9, 15]. Однако в настоящее время маятник начинает закономерное движение в обратную сторону, и выясняется, что во многих случаях либо задача исследования была поставлена неадекватно [2], либо его результаты были неверно обсчитаны и интерпретированы [14].

Вообще ни в одной области биологии нет такого количества прямо противоречащих друг другу точек зрения и экспериментальных результатов, как в области редокс-биологии [10], что объясняется самой природой ее составляющих: в определенных условиях прооксидант может стать антиоксидантом и наоборот. Нет и единой точки зрения на роль активированных кислородных метаболитов при многих патологиях, и прежде всего опухолевых процессах. Считается, что на начальной стадии антиоксиданты тормозят опухолевую трансформацию клеток, во многих ретроспективных исследованиях показана обратная зависимость между потреблением антиоксидантов и риском развития различных неоплазий, особенно много таких работ по фенольным антиоксидантам. Так, например, установлено, что меньший риск заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у приверженцев средиземноморской диеты обусловлен, в частности, высоким содержанием в их рационе оливкового масла, фенольные компоненты которого оказывают антиканцерогенное действие бла-

годаря своим антиоксидантным свойствам и влиянию на передачу сигнала в опухолевых клетках, клеточный цикл и пролиферацию [7]; при увеличении потребления витамина Е снижается риск развития колоректального рака [11], рака легкого [19], при повышении поступления коэнзима Q₁₀ – рака молочной железы [16]. В то же время многие исследователи обоснованно утверждают, что на поздних стадиях роста злокачественных новообразований антиоксиданты могут провоцировать метастазирование и развитие химиорезистентности опухолевых клеток [1, 6, 8].

Целью настоящего исследования послужило изучение взаимосвязи между антиоксидантной активностью новых синтетических водорастворимых фенольных антиоксидантов структурно взаимосвязанного ряда и их влиянием на жизнеспособность опухолевых клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для целей настоящего исследования синтезированы пять оригинальных гидрофильных сера- и селен-содержащих фенольных антиоксидантов, различающихся длиной углеводородной цепи *para*-алкилтиосульфатного заместителя, находящегося в *para*-положении по отношению к гидроксильной группе – 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12) и 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), количеством *трет*-бутильных *орто*-заместителей – 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17), заменой атома бивалентной серы на атом селена в *para*-пропильном заместителе – 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилселеносульфат натрия (СеС-13), а также его отсутствием – 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13).

Исследованные соединения получали из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по последовательности превращений, представленной на рис. 1. Синтезы соединений С-13, ТС-13, ТС-17 и их предшественников ранее были описаны в [3], алканол **1** – в [4]. Термолизом алканол **1** получали

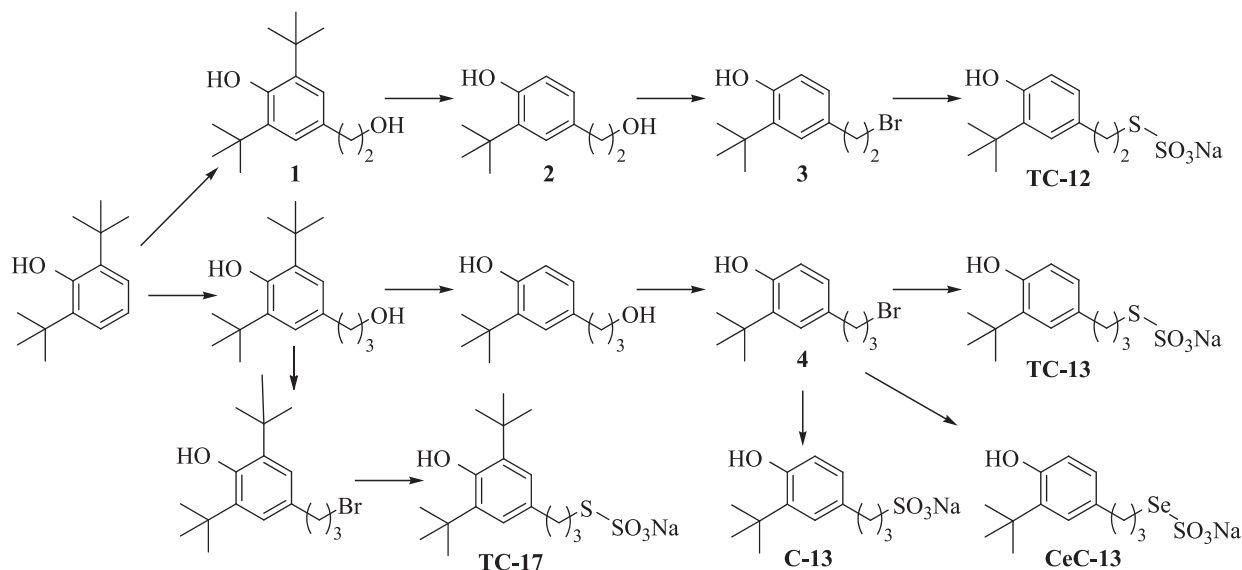


Рис. 1. Схема синтеза соединений

его моно-орто-замещенный гомолог **2**, нагреванием последнего с PBr_3 был синтезирован соответствующий бромид **3**, взаимодействие которого с $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ приводило к целевому TC-12 с выходом 90 %. Селеносульфонат CeC-13 получали по реакции бромида **4** с Na_2SeSO_3 , образующимся *in situ* из селена и Na_2SO_3 . Строение синтезированных соединений подтверждалось данными элементного анализа, ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии. Спектры ЯМР ^1H записывались на спектрометре Bruker DRX-500 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 500,13 МГц в D_2O , ИК-спектры – на Фурье-спектрометре Vector 22 (Bruker) в KBr (150:1), УФ-спектры – на спектрофотометре Specord HP-8453 (Hewlett Packard, Германия) в H_2O (табл. 1). Температуры плавления определяли в капилляре на приборе ПТП (Химлаборприбор, Россия) и на нагревательном столике конструкции Кофлера (Россия).

Для определения антиоксидантной активности соединений использовали метод Alho и Leinonen в собственной модификации [5], в его основе лежит способность азосоединений подвергаться спонтанному термолизу с образованием алкильных радикалов, при взаимодействии которых с люминолом возникает хемилюминесценция (ХЛ). В кюветы вводили бесцветную среду Хенкса, 100 мкМ раствора люминола (Serva, Германия) и тестируемые соединения в концентрациях от 2 до 40 мкМ, термостатировали в течение 5 мин, индуцировали радикалообразование путем добавления 10 мМ раствора 2,2'-азобис(2-амидинопропана) дигидрохлорида (Sigma-Aldrich) и регистрировали ХЛ. Результа-

ты представлены в долях от единицы, за единицу принимали среднее значение ХЛ контрольных клеток. Для полученных данных выполняли приближение с помощью кривых, из уравнений аппроксимации рассчитывали IC_{50} (концентрация соединения, в которой оно подавляет интенсивность ХЛ на 50 %).

В работе использовали моноцит/макрофагоподобные клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937 и клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, которые культивировали в среде, приготовленной на основе среды RPMI-1640 (для клеток MCF-7 – среды DMEM), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS), 1 % пенициллина, 1 % стрептомицина, 1 % глутамина. Тестируемые соединения вводили в среду культивирования в концентрациях от 0 до 500 мкМ, через 1 сут (клетки U937) или 4 сут (клетки MCF-7) определяли жизнеспособность клеток по их способности восстанавливать бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, Sigma-Aldrich, США) до гранул формазана образующимся в дыхательной цепи митохондрий супероксидным анион-радикалом (МТТ-тест) [13]. Результаты представлены в долях от единицы, за единицу принимали среднее значение оптической плотности ($\text{OD}_{540-620}$) контрольных клеток; для полученных данных выполняли приближение с помощью кривых, из уравнений аппроксимации рассчитывали IC_{50} (концентрация соединения, в которой оно подавляет жизнеспособность клеток на 50 %).

Результаты представлены в виде диаграмм рассеяния.

Таблица 1

Характеристика синтезированных соединений

Соединение	$T_{\text{пл}}^{\text{пр}}$, °С	Элементный анализ, найдено/вычислено, %			Брутто-формула	ЯМР ^1H спектр, δ , м.д.	ИК-спектр, ν_{max} , cm^{-1}	УФ-спектр, λ , нм ($\lg \epsilon$)
		C	H	S				
ТС-12	130	46,01/ 46,14	5,40/ 5,49	20,28/ 20,53	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}$	1,30 с (9H, <i>t</i> -Bu), 2,94 т (2H, ArCH ₂), 3,24 т (2H, CH ₂ S, $J = 7,5$ Гц), 6,77 д (1H, $J = 8$ Гц, H _{аром}), 6,99 дд (1H, $J = 8$ Гц, $J = 2$ Гц, H _{аром}), 7,19 д (1H, $J = 2$ Гц, H _{аром})		
C-13	235	53,00/ 53,05	6,10/ 6,51	10,50/ 10,89	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{SNa}$	1,43 с (9H, <i>t</i> -Bu), 2,10 м (2H, Ar-CH ₂ -CH ₂), 2,66 т (2H, Ar-CH ₂ , $J = 7,5$ Гц), 2,98 т (2H, CH ₂ -S, $J = 7,5$ Гц), 6,92 д (1H, $J = 8$ Гц, H _{аром}), 7,06 дд (1H, $J = 8$ Гц, $J = 2$ Гц, H _{аром}), 7,18 д (1H, $J = 2$ Гц, H _{аром})	3512 (PhOH), 2958 (CH), 1196 и 1056 (-SO ₃)	198 (2,81), 277 (0,16)
ТС-13	206–207	47,80/ 47,84	5,60/ 5,87	19,77/ 19,65	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}$	1,43 с (9H, <i>t</i> -Bu), 2,37 м (2H, Ar-CH ₂ -CH ₂), 3,02 т (2H, Ar-CH ₂ , $J = 7,5$ Гц), 2,98 т (2H, CH ₂ -S, $J = 7,5$ Гц), 7,18 д (1H, $J = 8$ Гц, H _{аром}), 7,36 дд (1H, $J = 8$ Гц, $J = 2$ Гц, H _{аром}), 7,55 д (1H, $J = 2$ Гц, H _{аром})	3513 (PhOH), 2957 (CH), 1196 и 1056 (-SO ₃)	203 (3,28), 278 (0,28)
ТС-17	153–155	53,02/ 53,38	7,80/ 7,11	16,00/ 16,77	$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}$	1,43 с (18H, <i>t</i> -Bu), 2,12 м (2H, Ar-CH ₂ -CH ₂ -), 2,71 т (2H, Ar-CH ₂ , $J = 8$ Гц), 3,22 т (2H, CH ₂ -S, $J = 7$ Гц), 7,11 с (2H, H _{аром})	3640 (PhOH), 2957 (CH), 1215 и 1043 (-SO ₃)	200 (2,88), 275 (0,12)
CeC-13	276–278	41,91/ 41,83	5,06/ 5,13	8,90/ 8,59	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{SSeNa}$	1,39 с (9H, <i>t</i> -Bu), 2,03 м (2H; CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2,70 т (2H; ArCH ₂ ; $J = 7,8$ Гц), 2,93 т (2H; CH ₂ SeSO ₃ ; $J = 7,8$ Гц), 6,95 д (1H; ArH; $J = 7,8$ Гц), 7,05 дд (1H; ArH; $J = 7,8$ Гц, $J = 2,4$ Гц), 7,26 д (1H; ArH; $J = 2,4$ Гц)	3532 (PhOH), 2956 (CH), 1199 и 1038 (-SO ₃)	228 (3,83), 280 (3,32)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наибольшую антирадикальную активность в использованной системе проявили ТС-13 и его селен-содержащий аналог СеС-13 (табл. 2, рис. 2, а, б). В целом по своей антиоксидантной активности исследуемые соединения расположились в следующем порядке: СеС-13 ≈ ТС-13 > ТС-12 > С-13 > ТС-17 (см. табл. 2, рис. 2).

При инкубировании с клетками линии как U937, так и MCF-7 селен-содержащий СеС-13 оказался наиболее токсичным (см. табл. 2, рис. 3, е, рис. 4, е). Остальные соединения по способности угнетать жизнеспособность клеток линии U937 выстроились практически в том же порядке, в котором падала их антиоксидантная активность; наименьшую токсичность проявлял частично экранированный тиосульфат ТС-13, при этом в концентрациях 100 и 200 мкМ достоверно повышая жизнеспособность клеток (возможно, увеличивая их пролиферацию, см. рис. 3, а, б). При инкубировании с клеточной линией MCF-7 наименьшее влияние на жизнеспособность показал С-13 (см. рис. 4, а), IC₅₀ которого определялась далеко за пределами использованных диапазонов концентраций (см. табл. 2); при исключении этого вещества из анализа наблюдалась прямая корреляция между величинами IC₅₀ в отношении использованных линий опухолевых клеток, коэффициент корреляции Пирсона 0,99, p = 0,007.

Таким образом, можно заключить, что использованная в данном исследовании линейка препаратов схожим образом угнетает жизнеспособность опухолевых клеток разных линий вне зависимости от их происхождения, миелоидного (U937) или эпителиального (MCF-7) [18], и типа роста (соответственно неприкрепленных и прикрепленных [17]), а также диапазона концентраций веществ (соответственно от 100 до 500 мкМ и от 2 до 150 мкМ). Наименьшую токсичность проявляет несимметрично экранированный пропилтиосульфат ТС-13, укорочение *para*-алкильного заместителя на одно метиленовое звено, полное экранирование ОН-группы *трет*-бутильными заместителями и замена атома «активной» серы на селен последовательно увеличивают способность соединения подавлять рост клеток. Исключение составляет аналог ТС-13 без атома бивалентной серы С-13, проявивший довольно высокую токсичность в отношении клеток U937 и слабо влияющий на жизнеспособность опухолевых клеток линии MCF-7.

С другой стороны, наблюдается еще одна закономерность: чем выше антиоксидантная активность соединения в использованной нами модельной системе, тем менее выражена его способность подавлять жизнеспособность опухолевых клеток; исключение составили высокотоксичный СеС-13 и малотоксичный для клеток MCF-7 С-13. Между величинами IC₅₀ для антиоксидантной активности и токсичности в отно-

Таблица 2

Антиоксидантная и цитотоксическая активность соединений

Соединение	Ингибирование радикалов ААРН [*]		Угнетение жизнеспособности клеток			
	Вид аппроксимации и ее достоверность (R ² ; p)	IC ₅₀ , мкМ	U937		MCF-7	
			Вид аппроксимации и ее достоверность (R ² ; p)	IC ₅₀ , мкМ	Вид аппроксимации и ее достоверность (R ² ; p)	IC ₅₀ , мкМ
СеС-13	Экспоненциальная (1,00; 0,0000)	2,37	Экспоненциальная (0,96; 0,0000)	80	Экспоненциальная (0,96; 0,0035)	23,5
ТС-13	Экспоненциальная (1,00; 0,0000)	3,04	Линейная (0,92; 0,0000)	658*	Экспоненциальная (0,87; 0,0025)	130,7
ТС-12	Экспоненциальная (1,00; 0,0000)	6,66	Линейная (0,94; 0,0000)	438	Экспоненциальная (0,98; 0,0000)	87,0
С-13	Линейная (0,96; 0,0000)	11,41	Линейная (0,95; 0,0000)	291	Линейная [#] (0,89; 0,0010)	> 10 мМ
ТС-17	Линейная (0,71; 0,0000)	22,57	Линейная (0,95; 0,0000)	302	Экспоненциальная (0,95; 0,0000)	52,7

Примечание. Соединения расположены по мере уменьшения антиоксидантной активности; * – данные приведены без учета стимулирующих концентраций; # – десятичный логарифм концентрации.

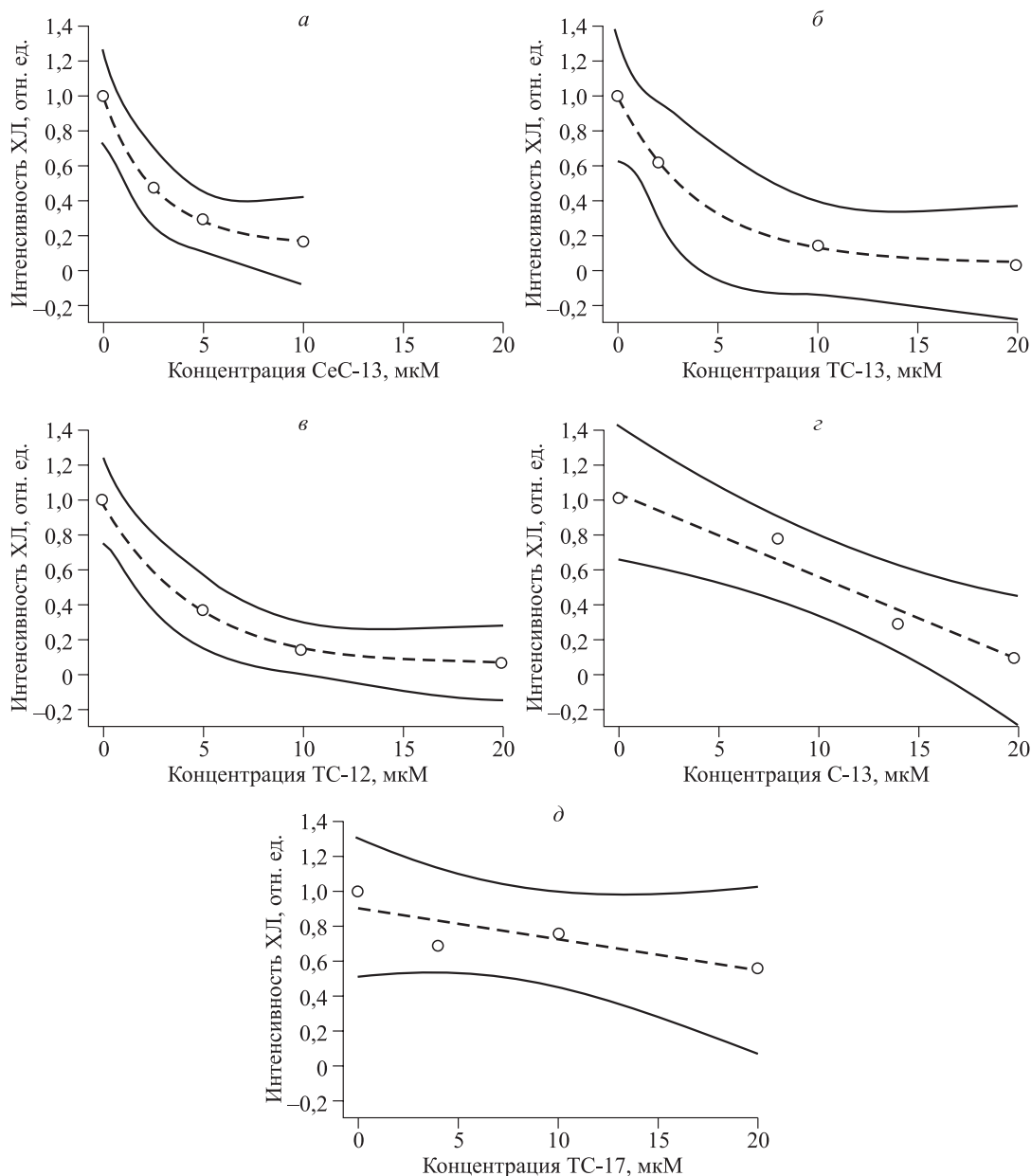


Рис. 2. Зависимость между антирадикальной активностью синтетических монофенолов в системе «ААРН – люминол» и их концентрацией: а – СеС-13, б – ТС-13, в – ТС-12, г – С-13, д – ТС-17. Здесь и на рис. 2, 3 кружками обозначены средние значения по 2–4 экспериментам, пунктирной линией – аппроксимация, сплошными – 95%-я доверительная полоса

шении клеток U937 (при исключении из анализа Се-С13) зависимость была экспоненциальной ($R^2 = 0,95, p = 0,0000$).

Возможно, наблюдаемая реципрокная зависимость служит иллюстрацией способности опухолей на определенном этапе канцерогенеза быть «ловушкой антиоксидантов», которая дает им нежелательные преимущества, позволяя адаптироваться к гипоксии, избегать апоптоза и приобретать множественную лекарственную устойчивость. Существует и другое предполо-

жение, основанное на парадоксальной природе свободнорадикальных процессов. Показано, что важным аспектом антиканцерогенного действия фенолов и полифенолов является их избирательная токсичность в отношении раковых клеток в отличие от нормальных [6, 12]. Такая специфичность не связана с их антиоксидантным действием, а объясняется, в частности, опосредованным прооксидантным действием – мобилизацией хроматин-связанных ионов меди и, соответственно, усилением образования ОН-радикала в реакци-

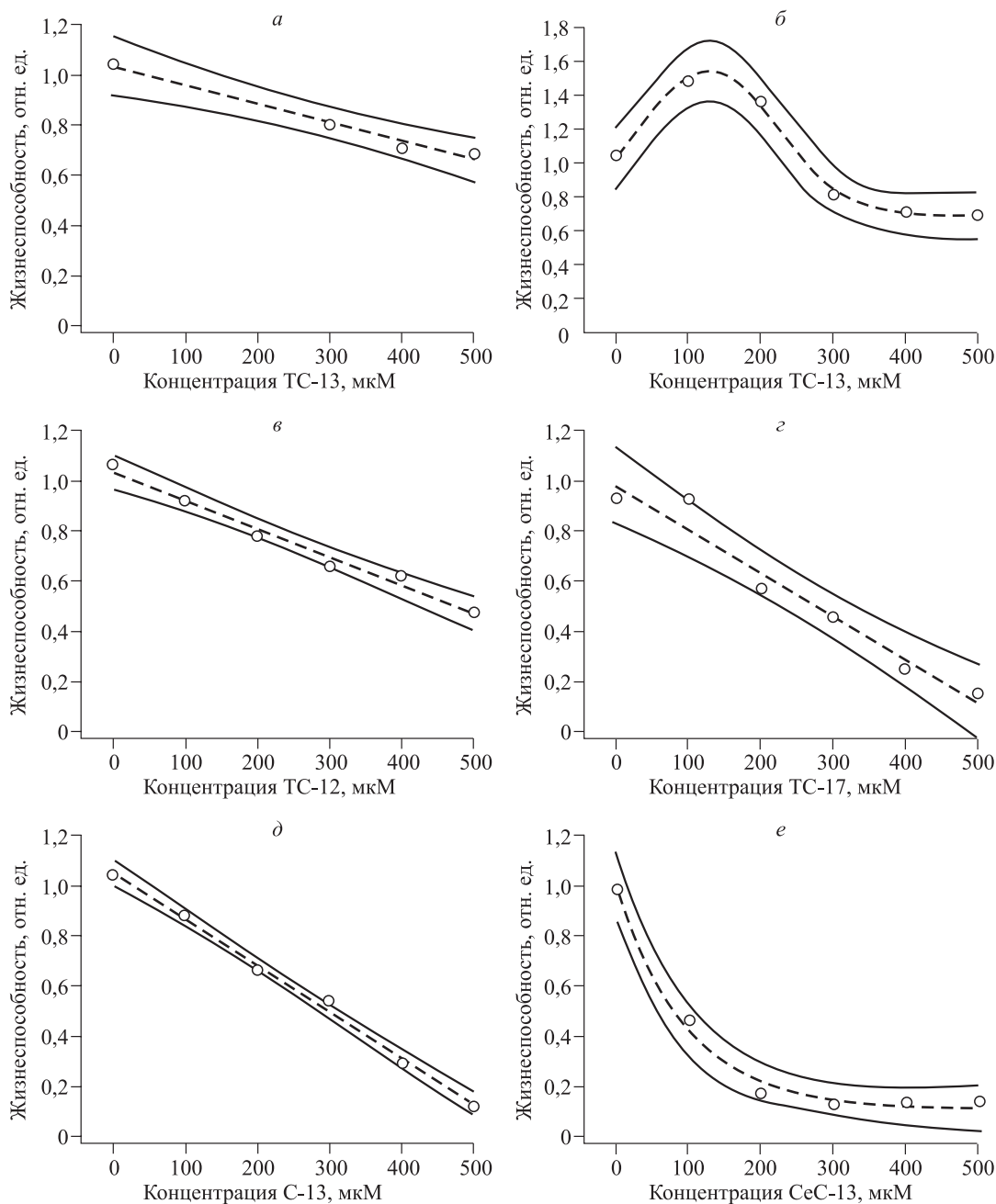


Рис. 3. Влияние синтетических монофенолов на жизнеспособность клеток линии U937: а, б – ТС-13, в – ТС-12, з – ТС-17, д – С-13, е – СеС-13

ях Фентона и Габера – Вейса (известно, что при многих злокачественных новообразованиях содержание ионов меди в клетках и тканях опухоли повышено в 2–3 раза – «Ахиллесова пята» рака [12, 20]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использованные в настоящем исследовании новые синтетические водорастворимые фенольные соединения структурно взаимосвязанного ряда схожим образом угнетают жизнеспособ-

ность опухолевых клеток разных линий вне зависимости от их происхождения, миелоидного (U937) или эпителиального (MCF-7), и типа роста (соответственно неприкрепленных и прикрепленных), а также диапазона концентраций веществ (соответственно от 100 до 500 мкМ и от 2 до 150 мкМ). В то же время зависимость между антиоксидантной активностью соединений в бесклеточной модельной системе (ингибирование радикала азоинициатора ААРН) и их цитотоксичностью была реципрокной, что может быть связано как со способностью опухоли к самоза-

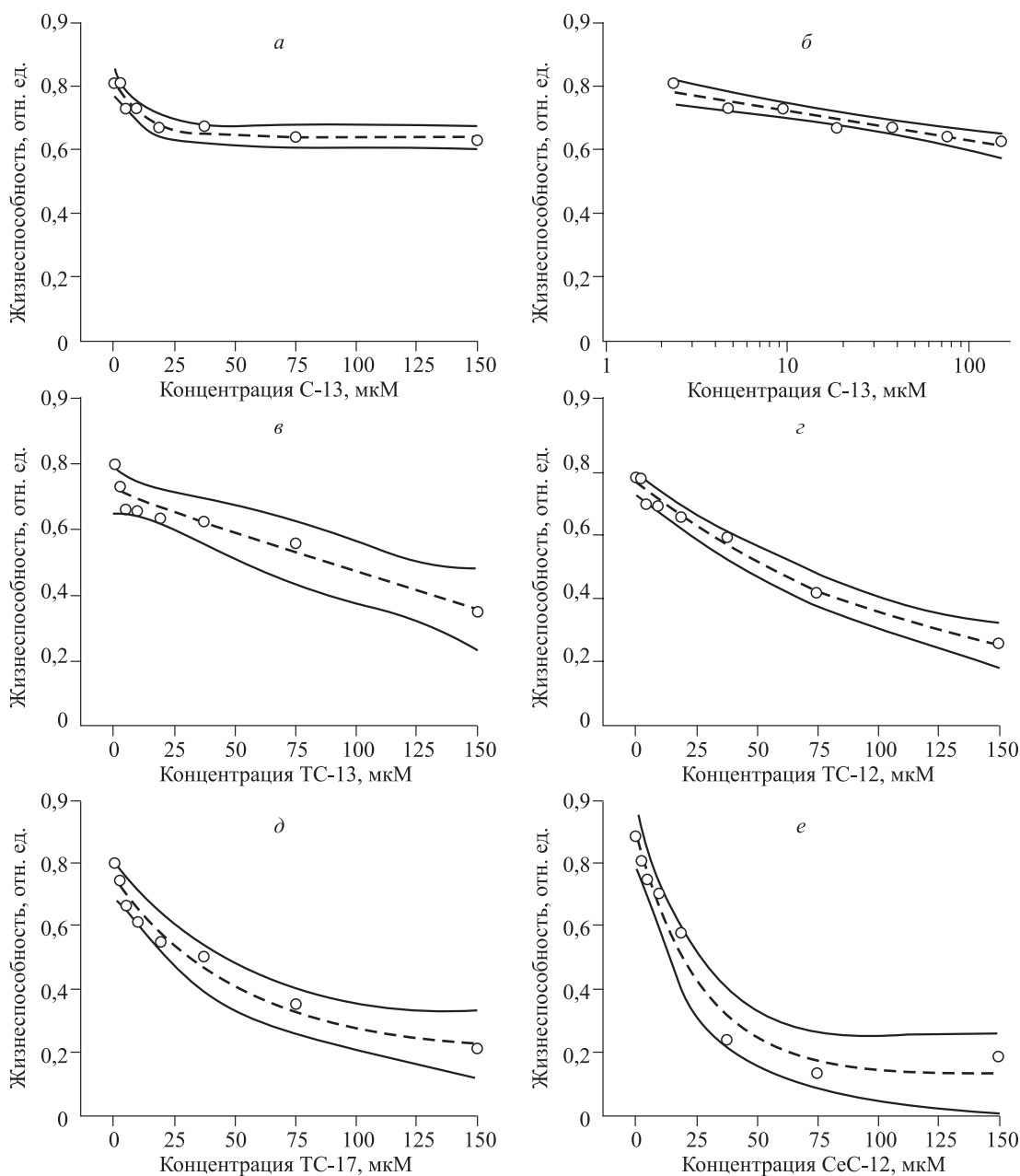


Рис. 4. Влияние синтетических монофенолов на жизнеспособность клеток линии MCF-7: а, б – TC-13, в – TC-12, г – TC-17, д – C-13, е – CeC-13

щите от активированных кислородных метаболитов, так и с непрямым прооксидантным эффектом фенольных соединений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант 16-54-00050 Бел_а) и БРФФИ (грант

M16P-022) с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» НИИЭЖМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зинovieва В.Н., Спасов А.А. Механизмы антиканцерогенных эффектов растительных полифенолов I. Блокирование инициации канцерогенеза // Биомед. химия. 2012. 58. (2). 160–175.
2. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Saarbrucken: LAP LAMBERT Acad. Publishing, 2012. 496 с.

3. Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия // Изв. АН. Сер. хим. 2007. (6). 1094–1101.
4. Патент СССР 877918. Способ получения 4-оксиалкил-2,6-ди-*трет*-бутилфенолов / А.П. Крысин, И.И. Пустовских, Л.А. Борисенко, В.А. Коптюг, Н.Н. Городецкая; Опубл. 15.06.1979.
5. Шкурупий В.А., Куликов В.Ю., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Желяков И.В. Влияние бальнеологического фактора курорта Белокуроиха на антиоксидантную активность сыворотки крови и на ее изменение в динамике хронического неспецифического гранулематозного воспаления // Бюл. СО РАМН. 2006. 26. (2). 159–165.
6. Assi M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2017. 313. (6). R646–R653.
7. Capurso C., Vendemiale G. The Mediterranean diet reduces the risk and mortality of the prostate cancer: A narrative review // Front Nutr. 2017. 4. 38.
8. Chikara S., Nagaprashantha L.D., Singhal J., Horne D., Awasthi S., Singhal S.S. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment // Cancer Lett. 2018. 413. 122–134.
9. Clarke M.W., Burnett J.R., Croft K.D. Vitamin E in human health and disease // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2008. 45. (5). 417–450.
10. Davies J.M.S., Cillard J., Friguet B., Cadenas E., Cadet J., Cayce R., Fishmann A., Liao D., Bulteau A.L., Derbre F., Rebillard A., Burstein S., Hirsch E., Kloner R.A., Jakowec M., Petzinger G., Sauce D., Sennlaub F., Limon I., Ursini F., Maiorino M., Economides C., Pike C.J., Cohen P., Salvayre A.N., Halliday M.R., Lundquist A.J., Jakowec N.A., Mechta-Grigoriou F., Mericskay M., Mariani J., Li Z., Huang D., Grant E., Forman H.J., Finch C.E., Sun P.Y., Pomatto L.C.D., Agbulut O., Warburton D., Neri C., Rouis M., Cillard P., Capeau J., Rosenbaum J., Davies K.J.A. The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases // Geroscience. 2017.
11. Dong Y., Liu Y., Shu Y., Chen X., Hu J., Zheng R., Ma D., Yang C., Guan X. Link between risk of colorectal cancer and serum vitamin E levels: A meta-analysis of case-control studies // Medicine (Baltimore). 2017. 96. (27). e7470.
12. Khan H.Y., Zubair H., Ullah M.F., Ahmad A., Hadi S.M. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols // Curr. Drug Targets. 2012. 13. (14). 1738–1749.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. 65. (1-2). 55–63.
14. Oliver C.J., Myers S.P. Validity of a Cochrane Systematic Review and meta-analysis for determining the safety of vitamin E // BMC Complement. Altern. Med. 2017. 17. (1). 408.
15. Omenn G.S. Chemoprevention of lung cancers: lessons from CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial, and prospects for the future // Eur. J. Cancer Prev. 2007. 16. (3). 184–191.
16. Tafazoli A. Coenzyme Q10 in breast cancer care // Future Oncol. 2017. 13. (11). 1035–1041.
17. Trendowski M., Wong V., Yu G., Fondy T.P. Enlargement and multinucleation of U937 leukemia and MCF7 breast carcinoma cells by antineoplastic agents to enhance sensitivity to low frequency ultrasound and to DNA-directed anticancer agents // Anticancer Res. 2015. 35. (1). 65–76.
18. Waskewich C., Blumenthal R.D., Li H., Stein R., Goldenberg D.M., Burton J. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines // Cancer Res. 2002. 62. (7). 2029–2033.
19. Zhu Y.J., Bo Y.C., Liu X.X., Qiu C.G. Association of dietary vitamin E intake with risk of lung cancer: a dose-response meta-analysis // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2017. 26. (2). 271–277.
20. Zuo X.L., Chen J.M., Zhou X., Li X.Z., Mei G.Y. Levels of selenium, zinc, copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia // Biol. Trace Elem. Res. 2006. 114. (1-3). 41–53.

INVERSE RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF STRUCTURALLY RELATED SYNTHETIC MONOPHENOLS AND THEIR TOXICITY IN TUMOR CELLS

Pavel Igorevich GAYNUTDINOV¹, Peter Mikhaylovich KOZHIN¹,
Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV¹, Grigoriy Grigorievich MARTINOVICH²,
Sergey Viktorovich KHOLSHIN³, Natal'ya Valer'evna KANDALINTSEVA³,
Nikolay Konstantinovich ZENKOV¹, Elena Bronislavovna MENSCHHIKOVA¹

¹ *Research Institute for Experimental and Clinical and Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *Belarusian State University
220030, Minsk, Nezavisimosti av., 4*

³ *Novosibirsk State Pedagogical University
630126, Novosibirsk, Viluyskaya str., 28*

The aim of the study was to study investigate the relationship between the antioxidant activity of new synthetic structurally related water-soluble monophenols and their effect on the tumor cell viability in vitro. **Material and methods.** Five original hydrophilic sulfur- and selenium-containing monophenols with varying length of the hydrocarbon chain of the *para*-alkylthiosulfonate substituent, the amount of *tert*-butyl *ortho*-substituents and the «S–S» fragment structure are synthesized: sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)ethyl thiosulfonate (TS-12), sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl sulfonate (S-13), sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl seleniumsulfonate (SeS-13), sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate (TS-13), sodium 3-(3',5'-di-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate (TS-17). The antioxidant activity of the compounds was determined in a cell-free model test system by the ability to inhibit the luminol-dependent chemiluminescence of free radical-generating azo compound AAPH. Antitumor cytotoxicity was evaluated by their effect on the viability of human histiocytic lymphoma cell line U937 (monocyte/macrophage-like cells) and human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 in the MTT test. **Results and discussion.** All tested phenolic compounds exerted antioxidant activity in the cell-free model system (inhibition of azo initiator radical AAPH[•]) and cytotoxicity against U937 and MCF-7 cells, the effect depended on the dose and structure of the molecule. There was a direct relationship between the structure of monophenols and their ability to inhibit the viability of tumor cells of different lines, regardless of the origin of the latter, myeloid (U937) or epithelial (MCF-7), and growth type (respectively anchorage-independent and attached), as well as the concentration range of compounds (respectively from 100 to 500 μM and from 2 to 150 μM). At the same time, the relationship between the antioxidant activity of monophenols and their cytotoxicity was inverse (when SeS-13 was excluded from analysis), which may be related both to the ability of the tumor to self-defense against reactivate oxygen metabolites and to the indirect pro-oxidant effect of phenolic compounds.

Key words: monophenolic antioxidants, MCF-7 cell line, U937 cell line, viability, toxicity, antioxidant activity.

Gaynutdinov P.I. – postgraduate student, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes,
e-mail: pg@centercem.ru

Kozhin P.M. – researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes,
e-mail: kozhinpm@gmail.com

Chechushkov A.V. – researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes,
e-mail: achechushkov@gmail.com

Martinovich G.G. – doctor of biological sciences, head of the chair for biophysics, e-mail: martinovichgg@bsu.by

Kholshin S.V. – senior lecturer of the chair for chemistry, e-mail: s.kholshin@gmail.com

Kandalintseva N.V. – candidate of chemical sciences, head of the Institute of Natural and Social and Economic Sciences, e-mail: aquaphenol@mail.ru

Zenkov N.K. – doctor of biological sciences, leading researcher, laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru

Menschchikova E.B. – doctor of medical sciences, head of the laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО И МНОГОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ СИЛЬНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У КРЫС

Светлана Валерьевна МОСКАЛЕНКО¹, Игорь Ильич ШАХМАТОВ^{1,2},
Юлия Алексеевна БОНДАРЧУК^{1,2}, Оксана Михайловна УЛИТИНА^{1,2},
Ольга Васильевна АЛЕКСЕЕВА^{1,2}

¹ Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России
656038, Барнаул, просп. Ленина, 40

² НИИ физиологии и фундаментальной медицины,
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Цель исследования – провести анализ состояния реакции системы гемостаза крыс на однократное и многократное воздействие гипоксической гипоксии сильной интенсивности. **Материал и методы.** В работе использовались 40 самцов крыс линии Вистар. Животные подвергались однократной или ежедневной многократной гипоксической гипоксии посредством «подъема» в барокамере в течение 1 ч. Гипоксическая гипоксия моделировалась при помощи барокамеры приточно-вытяжного типа. Создаваемое в барокамере разрежение воздуха в режиме тренировки соответствовало подъему на «высоту» 7000 м над уровнем моря (41,105 кПа; 308,3 мм рт. ст., гипоксия сильной интенсивности). **Результаты и их обсуждение.** Однократное воздействие гипоксической гипоксии сильной интенсивности характеризуется состоянием тромботической готовности (на основании выявленной гиперкоагуляции и высокого уровня маркеров внутрисосудистого свертывания крови). По данным тромбозластографии зафиксировано укорочение времени начала образования сгустка (СТ), увеличение угла α° и максимальной плотности сгустка (MCF). После завершения 30-дневного цикла гипоксии сильной интенсивности отмечается активация системы тромбоцитарного звена системы гемостаза, гиперкоагуляция по внутреннему пути свертывания при исчезновении признаков тромбинемии. Кроме того, обнаружено увеличение антитромбинового резерва плазмы крови в группе опытных животных. По результатам тромбозластограммы зарегистрировано удлинение времени образования сгустка (CFT).

Ключевые слова: гипоксическая гипоксия, гемостаз, тромбозластография.

Гипоксия – одно из самых распространенных патологических состояний, связанных с дефицитом кислорода в окружающей клетку среде и являющихся причиной широкого спектра функциональных и метаболических нарушений в организме. Исследование влияния длительной гипоксии на организм человека и животных до сих пор является одной из важнейших проблем физиологии и медицины, приобретающей особую актуальность в связи с тем, что состояние гипоксии, помимо целого ряда заболеваний, имеет место и в физиологии спорта, а также при освоении различных сред обитания.

Адаптация к гипоксии – сложный и многогранный процесс, в который вовлекаются по сути дела все органы и системы организма и, прежде

всего, система крови [3]. Установлено, что в ответ на острую гипоксию происходят фазные изменения в системе гемостаза. Первичной реакцией системы коагуляционного звена системы гемостаза является гиперкоагуляция, однако более продолжительное пребывание на высоте приводит к развитию гипокоагуляции, обусловленной потреблением факторов свертывания [7].

Ранее было изучено влияние на систему крови гипоксической гипоксии (ГГ) низкой (4000 м), средней (5000 м) и умеренно сильной (6000 м) интенсивности [2, 6]. Однако, что касается гипоксии сильной (7000 м) и тяжелой (8000 м) интенсивности, в литературе в основном представлены данные по гемореологии крови [5], не затрагивающие, в частности, систему гемостаза. В связи с

Москаленко С.В. – преподаватель кафедры нормальной физиологии, e-mail: sunrisemsv@gmail.com.

Шахматов И.И. – д.м.н., проф., старший научный сотрудник, e-mail: iish59@yandex.ru.

Бондарчук Ю.А. – к.м.н., доцент, младший научный сотрудник, e-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Улитина О.М. – к.б.н., доцент, младший научный сотрудник, e-mail: oulitina@mail.ru

Алексеева О.В. – к.м.н., доцент, младший научный сотрудник, e-mail: alekseeva0506@mail.ru

вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение состояния системы гемостаза в ответ на однократное и ежедневное многократное воздействие гипоксической гипоксии сильной интенсивности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 40 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой $254,0 \pm 36,0$ г. Все экспериментальные животные были разделены на четыре группы: две контрольные и две опытные группы по 10 особей в каждой. 1-я опытная группа подвергалась однократному воздействию ГГ в барокамере приточно-вытяжного типа в течение 1 ч при разрежении 41,105 кПА (308,3 мм рт. ст.), что соответствовало подъему на высоту 7000 м, при этом 1-я контрольная группа находилась в течение того же времени в барокамере в условиях обычного атмосферного давления; 2-я опытная группа подвергалась 30-кратному ежедневному воздействию ГГ в течение 1 ч на «высоте» 7000 м, в то время как 2-я контрольная группа находилась ежедневно в течение 1 ч на протяжении 30 дней в барокамере в условиях обычного атмосферного давления.

Режим гипоксического воздействия был основан на литературных данных: согласно Н.И. Мамадалиевой и соавт. [4], моделирование «подъема на высоту» 4000 и 5000 м соответствует гипоксии низкой и средней интенсивности, «на высоте» 6000 и 7000 м создаются условия гипоксии умеренно сильной и сильной интенсивности, а моделирование «подъема» на высоту 8000 м соответствует гипоксии тяжелой интенсивности.

До начала проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, и Директивами 86/609/ЕЕС. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [8].

Кровь для исследования забирали сразу после окончания однократного (1-я опытная группа) либо 30-го экспериментального воздействия (2-я опытная группа), у крыс контрольных групп – сразу после окончания однократного или многократного нахождения в барокамере в условиях обычного атмосферного давления. Кровь забирали под эфирным наркозом из печеночного синуса в объеме 5 мл. Все пробы крови стабили-

зировали 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 [1].

Комплекс методик, позволяющий оценить состояние системы гемостаза, включал исследование агрегационной способности тромбоцитов, коагуляционного звена гемостаза, а также антикоагулянтной и фибринолитической активности крови. В качестве реагентов для оценки системы гемостаза были выбраны диагностические наборы фирмы «Технология-Стандарт» (Россия) с использованием коагулометра «Минилаб» (Россия), «Thrombostat 2» (Behnk Elektronik, Германия). Количество тромбоцитов периферической крови подсчитывали при помощи гематологического анализатора Drew3-РАС (Drew Scientific, Великобритания). Агрегационную активность тромбоцитов оценивали при помощи агрегометра «Биола» (Россия). Уровень антитромбина III определяли с использованием спектрофотометра СФ-46 (Россия).

Кроме того, в данной работе для оценки системы гемостаза использовался интегральный метод исследования – тромбоэластография. Тромбоэластограммы записывали с использованием активатора «Start-tem» на аппарате Rotem® Gamma (Pentapharm GmbH, Германия).

В ходе расшифровки тромбоэластограммы учитывались следующие показатели.

Время начала образования сгустка (СТ) описывает время от начала анализа до распознаваемого начала формирования сгустка посредством добавления активатора (реагенты и кальций). СТ является важным параметром активизации показателей свертывания, а также их баланса с соответствующими ингибиторами.

Время образования сгустка (CFT) отображает кинетику образования стойкого сгустка из тромбоцитов и фибрина, зависит в основном от количества тромбоцитов и, особенно, от их участия в формировании сгустка, а также от содержания фибриногена и его склонности к полимеризации.

Угол альфа (α) – угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка, отображает скорость роста фибриновой сети и ее структурообразование (увеличение прочности сгустка).

Максимальная плотность сгустка (MCF) представляет собой максимальную величину амплитуды формирования сгустка, достигнутую к моменту, когда активизируется процесс фибринолиза, является одним из наиболее важных параметров в тромбоэластометрии.

Максимальный лизис (ML) соответствует максимальной интенсивности фибринолиза, обнаруженной в течение анализа, и определяется как

нахождение самой низкой амплитуды после достижения МСФ.

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке. Результаты представлены в виде Me [25÷75 %], где Me – медиана в выборочной совокупности, [25÷75 %] – 25-й и 75-й перцентиль. Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ результатов исследования показателей системы гемостаза, зарегистрированных после однократного и многократного воздействия ГГ, приведен в таблице, из которой видно, что после однократного воздей-

ствия ГГ в плазме крови регистрировалась активация сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза, характеризующаяся повышением АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на 43,8 % ($p < 0,001$). В коагуляционном звене гемостаза отмечалась гиперкоагуляция по внутреннему пути, что проявлялось в укорочении активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) на 7,7 % ($p < 0,01$). На конечном этапе свертывания крови также регистрировалась гиперкоагуляция, что характеризовалось укорочением времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов (ВПФМ) на 15,4 % ($p < 0,001$).

Результаты тромбозластографии также подтверждали выявленные клоттинговыми методиками гиперкоагуляционные сдвиги, что проявлялось в укорочении СТ на 17,2 % ($p < 0,001$) на фоне увеличения угла α на 15,8 % ($p < 0,05$) и максимальной плотности сгустка (МСФ) на 11,9 %

Таблица

Показатели системы гемостаза плазмы крови крыс после однократного и многократного воздействия гипоксической гипоксии

Показатель	Однократное воздействие ГГ		30-кратное воздействие ГГ	
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 2	Опыт 2
Содержание тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	473,0 [464,5÷489,8]	492,5 [456,8÷507,5]	495,0 [487,0÷498,0]	508,5 [502,5÷515,0]
Индукцированная АДФ агрегация тромбоцитов, макс. значение	27,4 [23,9÷28,9]	39,4*** [37,6÷40,5]	21,7 [21,3÷22,9]	26,1*** [24,8÷27,4]
АПТВ, с	18,1 [17,7÷18,8]	16,7** [15,5÷17,2]	16,0 [15,7÷16,4]	14,6*** [12,6÷15,3]
Тромбиновое время, с	46,7 [45,2÷48,0]	43,1 [40,7÷45,7]	42,7 [39,8÷43,6]	41,9 [39,8÷44,0]
ВПФМ, с	59,1 [56,9÷61,0]	50,0*** [49,2÷52,0]	62,5 [60,8÷63,1]	61,9 [60,3÷64,7]
Содержание фибриногена, г/л	2,9 [2,8÷2,9]	2,3*** [2,3÷2,3]	3,0 [2,8÷3,2]	3,7** [3,5÷3,9]
Содержание РФМК, мг/100 мл	3,0 [3,0÷3,1]	4,5*** [4,0÷5,4]	3,0 [3,0÷3,0]	3,0 [3,0÷3,1]
Содержание антитромбина III, %	94,5 [88,8÷97,3]	89,0 [84,0÷90,7]	102,5 [99,8÷104,1]	113,6** [110,9÷115,5]
Антитромбиновый резерв плазмы, %	87,9 [84,4÷92,4]	73,7*** [71,9÷83,0]	84,3 [82,0÷87,5]	91,6*** [89,4÷96,4]
Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз, мин	600,0 [570,0÷630,0]	540,0 [532,5÷637,5]	615,0 [570,0÷660,0]	465,0* [450,0÷480,0]
СТ, с	292,0 [286,7÷298,9]	244,0*** [238,5÷256,9]	284,0 [278,9÷297,2]	288,0 [282,0÷296,2]
α , град	58,0 [54,6÷62,8]	67,0* [64,3÷72,7]	74,0 [70,2÷76,5]	74,0 [66,4÷77,8]
СФТ, с	118,0 [114,2÷122,4]	126,0 [122,4÷132,0]	116,0 [114,4÷120,6]	131,0* [126,6÷137,6]
МСФ, мм	73,0 [69,8÷77,9]	82,0*** [76,5÷84,6]	78,0 [72,5÷82,3]	76,0 [72,3÷86,4]
ML, %	1,0 [0,8÷1,0]	1,0 [0,7÷1,0]	1,0 [0,8÷1,0]	1,0 [1,0÷1,0]

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы контроля: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

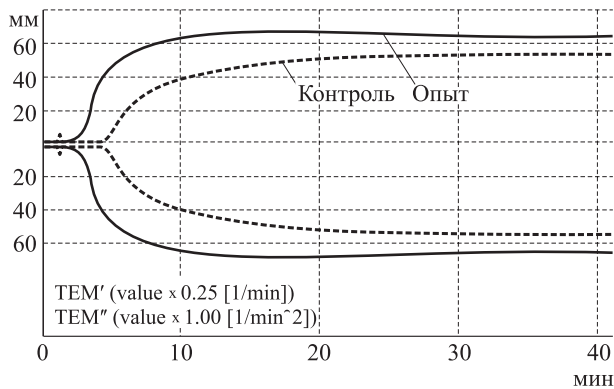


Рис. 1. Тромбоэластограммы крыс после однократного гипоксического воздействия сильной интенсивности (7000 м) в течение 1 ч

($p < 0,001$). В качестве примера интегральных изменений со стороны системы гемостаза, зарегистрированных при описываемом воздействии, представлены тромбоэластограммы, полученные у животных из контрольной и опытной групп (рис. 1). Кроме того, зафиксировано уменьшение количества фибриногена на 20,7 % ($p < 0,001$), увеличение содержания РФМК на 50 % ($p < 0,001$), а также снижение антитромбинового резерва плазмы крови на 16,2 % ($p < 0,001$).

Анализ результатов экспериментов показал, что реакцией системы гемостаза на однократное воздействие ГГ сильной интенсивности является выраженная активация сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, сопровождающаяся признаками развития состояния тромбоцитарной готовности (на основании выявленной гиперкоагуляции и высокого уровня маркеров внутрисосудистого свертывания крови, а также снижения антикоагулянтного резерва плазмы крови [1]). Таким образом, со стороны системы гемостаза в ответ на однократное общее воздействие ГГ сильной интенсивности отмечалось резкое смещение гемостатического потенциала в сторону тромбинемии, что может быть расценено как дистрессорный ответ.

Состояние системы гемостаза, зарегистрированное после 30-кратного воздействия ГГ, характеризовалось активацией сосудисто-тромбоцитарного звена, что проявлялось повышением агрегационной активности тромбоцитов на 20,3 % ($p < 0,001$). Со стороны плазменного гемостаза отмечалась гиперкоагуляция по внутреннему пути (укорочение АПТВ на 8,8 %, $p < 0,001$), кроме того, было зафиксировано повышение концентрации фибриногена на 23,3 % ($p < 0,01$). Как видно из таблицы, гепарин-кофакторная активность антитромбина III в тромбин-гепариновом тесте (антитромбиновый резерв плазмы) увели-

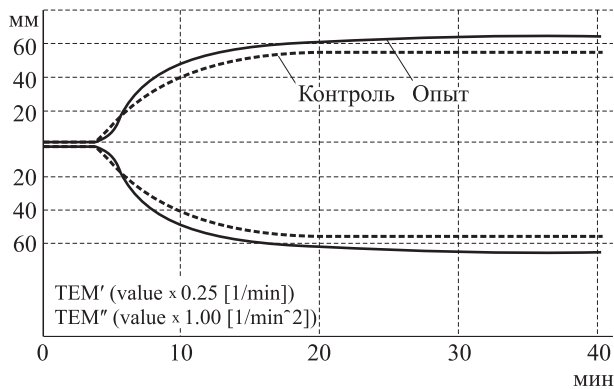


Рис. 2. Тромбоэластограммы крыс после многократного гипоксического воздействия сильной интенсивности (7000 м) в течение 1 ч

чилась на 8,7 % ($p < 0,001$). Уровень антикоагулянта антитромбина III повышался на 10,8 % ($p < 0,01$), а фибринолитическая активность, оцениваемая по спонтанному лизису эуглобулинов, увеличивалась на 24,4 % ($p < 0,05$). По результатам тромбоэластограммы зарегистрировано удлинение CFT на 12,9 % ($p < 0,05$). В качестве примера представлены тромбоэластограммы, полученные у животных из контрольной и опытной групп (рис. 2).

В отличие от реакции системы гемостаза на однократное воздействие ГГ, состояние системы гемостаза, зарегистрированное после окончания 30-дневного цикла воздействия ГГ сильной интенсивности, характеризуется менее выраженной активацией сосудисто-тромбоцитарного звена при сохраняющейся гиперкоагуляции по внутреннему пути свертывания. При этом обнаруженная на этом этапе гиперкоагуляция по внутреннему пути свертывания плазмы крови компенсировалась выраженной активацией фибринолитической системы крови. Стоит также учитывать, что после 30-кратного воздействия ГГ отсутствует повышение маркера внутрисосудистого свертывания – содержания РФМК в плазме крови. Кроме того, на фоне менее выраженных по сравнению с однократным воздействием гиперкоагуляционных сдвигов отмечался рост антикоагулянтной активности плазмы крови.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что к 30-му дню гипоксических воздействий практически исчезали все признаки состояния тромбоцитарной готовности, регистрируемой сразу по окончании однократной ГГ сильной интенсивности. Анализ полученных данных позволяет охарактеризовать состояние системы гемостаза после 30-кратных ежедневных тренировок ГГ как проявление долговременной адаптации к данному виду стрессора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакцией системы гемостаза на однократное воздействие ГГ сильной интенсивности является активация сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, сопровождающаяся признаками развития состояния тромботической готовности. В ходе ежедневных гипоксических тренировок исчезают признаки тромботической готовности, зафиксированные при однократном воздействии, регистрируется рост фибринолитической и антикоагулянтной активности крови. Полученные данные позволяют сделать вывод, что ежедневное применение тренировочного режима ГГ сильной интенсивности в течение 30 дней способствует повышению резистентности организма к дефициту кислорода и снижает риск развития тромбообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений. М.: Ньюдиамед-АО, 2001. 306 с.
2. Горошинская И.А., Немашкалова Л.А., Сорокина И.В. Влияние пиразидола на состояние животных и содержание моноаминов при периодической гипобарической гипоксии // Физиол. журн. 1993. (10). 67–73.
3. Макаренко А.Н., Карандеева Ю.К. Адаптация к гипоксии как защитный механизм при патологических состояниях // Вісн. пробл. біол. і мед. 2013. (2). 27–33.
4. Мамадалиева Н.И., Саатов Т.С., Хайбуллина З.Р., Умеров О.И. Влияние фармакоррекции на активность ферментов защиты от активных форм кислорода в сердце при адаптации к гипоксии различной интенсивности и длительности // Вестн. НГПУ. 2014. (1). 221–229.
5. Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В. Иммунофизиология. Екатеринбург: УрО РАН, 2002. 260 с.
6. Шахматов И.И., Вдовин В.М., Бондарчук Ю.А., Алексеева О.В., Киселев В.И. Гипоксическая гипоксия как фактор, активирующий систему гемостаза // Бюл. сиб. мед. 2007. (1). 67–73.
7. Шахматов И.И., Киселев В.И., Вдовин В.М. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия // Бюл. СО РАМН. 2010. 30. (2). 131–137.
8. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other purposes // Official Journal of the European Communities. 1986. L358. 1–29.

EFFECT OF SINGLE AND MULTIPLE IMPACT OF HYPOXIC HYPOXIA OF STRONG INTENSITY ON THE STATE OF THE HEMOSTATIC SYSTEM IN RATS

Svetlana Valer'yevna MOSKALENKO¹, Igor Il'yich SHAKHMATOV^{1,2},
Yuliya Alekseevna BONDARCHUK^{1,2}, Oksana Mikhaylovna ULITINA^{1,2},
Olga Vasilevna ALEKSEEVA^{1,2}

¹ Altai State Medical University of Minzdrav of Russia
656038, Barnaul, Lenin av., 40

² Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4

The aim of the study was to analyze the state of the reaction of the hemostasis system in rats to a single and multiple exposures to hypoxic hypoxia of strong intensity. **Material and methods.** Male rats (40 individuals) of the Wistar line were used in the work. Animals have been subjected to a single / daily multiple hypoxic hypoxia by chamber ascent for 1 hour. Hypoxic hypoxia was modeled with the input-outlet chamber. The air discharge created in the pressure chamber in the training mode corresponded to the liftoff to the «height» of 7000 m above sea level (41.105 kPa, 308.3 mm Hg, hypoxia of strong intensity). **Results and discussion.** A single exposure to the strong intensity of hypoxic hypoxia is characterized by the state of thrombotic readiness (based on the revealed hypercoagulation and high level of markers of intravascular coagulation). The shortening of clot formation start time, increase in the α angle and the maximum bunch density were revealed according to the thromboelastography data. The activation of hemostasis system thrombocytic part, hypercoagulation through the internal clotting path with the thrombinemia signs disappearance have been revealed after completion of the 30-day cycle of severe intensity hypoxia. In addition, the increase in the blood plasma antithrombin reserve was found in the group of experimental animals. The lengthening of clot formation time was recorded by the thromboelastogram results.

Key words: hypoxic hypoxia, hemostasis, thromboelastography.

Moskalenko S.V. – lecturer of the chair for normal physiology, e-mail: sunrisemsv@gmail.com

Shakhmatov I.I. – doctor of medical sciences, professor, senior researcher, e-mail: iish59@yandex.ru

Bondarchuk Yu.A. – candidate of medical sciences, associate professor, junior researcher,
e-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Ulitina O.M. – candidate of biological sciences, associate professor, junior researcher,
e-mail: oulitina@mail.ru

Alekseeva O.V. – candidate of medical sciences, associate professor, junior researcher,
e-mail: alekseeva0506@mail.ru

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Наталья Михайловна АСТАХОВА^{1,2}, Анастасия Викторовна КОРЕЛЬ¹,
Константин Евгеньевич ОРИЩЕНКО³, Ярослав Рейнгольдович ЕФРЕМОВ^{3,4},
Глеб Александрович КУДРОВ¹, Ирина Анатольевна КИРИЛОВА¹

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

² АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский Технопарк)»
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 19-а

³ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

⁴ Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

В статье приведены данные по культивированию и характеристике мезенхимальных стромальных клеток (МСК), выделенных из костного мозга пациентов с диспластическим коксартрозом. Во фракции адгезивных МСК из обоих образцов костного мозга выявлено несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки. Иммунофенотипический анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) клетки представляют собой популяции МСК. Использование для культивирования МСК человека новой ростовой среды, не содержащей компонентов животного происхождения, позволяет МСК достигать конfluence на 16–18 день инкубации, без замедления пролиферативной активности клеток и без потери способности к дифференцировке в хондро- и остеогенные типы тканей. Мультипотентность МСК подтверждена остеогенной и хондрогенной дифференцировкой клеток при их длительном культивировании в соответствующих индукционных средах *in vitro*. Дифференцировку МСК в остеобласты подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием на щелочную фосфатазу и ализариновым красным. Специфическую дифференцировку МСК по хондрогенному типу выявляли иммуноцитохимическим окрашиванием хрящевых депозитов альциановым синим. Впервые определены такие характеристики МСК человека, как митотический индекс, траектории и средняя скорость движения клеток на культуральном пластике. Митотический индекс активно пролиферирующих МСК составил от 2,7 до 3,4 % от общего количества клеток, двигательная активность (скорость миграции) – 38–42 мкм/ч. Таким образом, аспират костного мозга от пациентов с ортопедической патологией является источником МСК, которые удовлетворяют критериям, определенным Международным обществом клеточной терапии, и могут быть использованы в регенеративной терапии костной и хрящевой тканей.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, костный мозг, диспластический коксартроз, митотический индекс, скорость миграции, дифференцировка, регенерация кости и хряща.

Астахова Н.М. – к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, специалист по клеточным технологиям, e-mail: NAstakhova@niito.ru

Корель А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: akorel@niito.ru

Орищенко К.Е. – к.б.н., зав. сектором клеточных технологий, e-mail: OrishchenkoKE@icg.sbras.ru

Ефремов Я.Р. – ведущий инженер ЦКП микроскопического анализа биологических объектов, e-mail: yarex@bionet.nsc.ru

Кудров Г.А. – младший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: g16kud@gmail.com

Кирилова И.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: irinakirilova71@mail.ru

Одной из главных проблем травматологии и ортопедии остается замещение дефектов костной ткани опорно-двигательного аппарата. В настоящее время широкое распространение получили методы клеточной терапии, основанные на применении остеогенных клеток, дифференцированных из МСК, полученных из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, периферической крови и т.д. [7, 11, 13–15]. Одним из требований к пластическому материалу является тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической костной ткани в зоне трансплантации. Для обеспечения запросов практической хирургии необходимы тканеинженерные конструкции, пригодные для замещения костных дефектов, характеризующиеся следующими свойствами: сохранение физических и анатомических особенностей кости, высокая прочность, быстрая фиксация в зоне имплантации и замещение тканью реципиента, отсутствие реакции отторжения имплантата.

Главная стратегия тканевого инжиниринга заключается в следующем: 1) выделение МСК и их пролиферация *in vitro*, 2) заселение на трехмерный скаффолд и 3) имплантация скаффолда в очаг повреждения [10, 17]. Внедрение данной стратегии в медицинскую практику требует проведения дополнительной хирургической процедуры и временных затрат, которые необходимы для создания костного трансплантата *in vitro*. Костный мозг является резервуаром МСК для ряда соединительных тканей, которые могут дифференцироваться в остеогенные, хондрогенные и жировые клетки [5, 6]. В условиях хирургического стационара травматолого-ортопедического профиля использование такого ресурса, как резецированные при первичном эндопротезировании полусуставы, представляется целесообразным. Поскольку объем первичных операций постоянно растет, то ограничения в источнике костного мозга, при согласии пациента, нет. А увеличение ревизионных операций, связанных с дефицитом костной ткани, формирует запрос клиницистов на тканеинженерные конструкции, обладающие высокими прочностными свойствами.

Как первый шаг в создании подобных конструкций, нами выполнены забор костного мозга у двух пациентов, выделение МСК, культивирование и описание их характеристик. В нашем эксперименте МСК из аспириатов костного мозга служили источником остеогенных и хондрогенных клеток человека, которые в дальнейшем предполагается использовать для заселения трехмерных имплантатов («скаффолдов») с перспективой ис-

пользования для восстановления костной и хрящевой тканей. Дифференцировка этих клеток проводилась *in vitro* путем изменения условий культивирования в процессе роста. Ее можно также инициировать, обеспечивая новое физиологическое микроокружение в области трансплантации *in vivo* [8]. Кроме того, в ряде работ было показано, что жесткость субстрата и топография поверхности «скаффолда», а также биомеханические воздействия на трехмерные каркасы значительно влияют на развитие тканей, морфогенез, патогенез и заживление, особенно в ортопедических тканях. Такие биологические процессы критически связаны с дифференцировкой МСК человека. Текущие исследования предполагают использование различных факторов для контроля процесса дифференцировки МСК и ускорения процесса создания трехмерных тканеинженерных конструкций [12, 18].

Пролиферация МСК, выделенных из клеточного аспириата костного мозга, зависит от объема, техники выделения и культивирования клеток. В связи с новыми международными требованиями к культивированию МСК пациентов *in vitro* без реагентов животного происхождения была использована усовершенствованная безсыворочная питательная среда. Исследовали следующие характеристики выделенных МСК: адгезия, экспрессия специфических CD-маркеров, сохранение мультипотентности, дифференцировка, пролиферативный потенциал (митотический индекс), двигательная активность (скорость миграции). Изучение динамических характеристик МСК и подбор оптимальных условий культивирования позволят разработать стандартные подходы для новых технологий получения индивидуальных тканеинженерных конструкций в регенеративной медицине.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

МСК человека были выделены из аспириатов костного мозга резецированных головок бедренных костей пациентов с диспластическим коксартрозом при операции первичного эндопротезирования тазобедренных суставов в Новосибирском НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России. В экспериментах были использованы МСК от двух доноров (женщины, возраст 37 лет и 41 год), с общим числом пассажей от 0 до 4. МСК пациенток удовлетворяли критериям, определенным Комитетом международного общества по клеточной терапии. Минимальный набор стандартных критериев для определения МСК человека следующий: во-первых, они должны быть пластик-адгезивными при куль-

тивировании в стандартных условиях; во-вторых, должны экспрессировать CD105, CD73 и CD90 и быть негативными по поверхностным антигенам CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79a или CD19, HLA-DR; в-третьих, должны дифференцироваться в остеобласты, адипоциты или хондробласты при культивировании *in vitro* в индукционных средах [9, 12].

Настоящее исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Работа получила одобрение локального этического комитета Новосибирского НИИ им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России (протокол № 011/16 от 04.10.2016). Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение и культивирование. Аспираты костного мозга, полученные при хирургической операции в стерильных условиях, промывали модифицированной по Дульбекко средой Игла (Sigma, США) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (Life Technologies, США), процеживали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм. Суспензию клеток костного мозга разводили в соотношении 1 : 2 0,9%-м NaCl, наслаивали на градиент плотности PANcoll (PAN biotech, Германия) ($d = 1,077$ г/мл) и центрифугировали при 1300 g в течение 15 мин [1, 2]. Ядродержащие клетки переносили в отдельную пробирку, отмывали от PANcoll центрифугированием при 1500 g в течение 15 мин в бессывороточной среде DMEM с добавлением 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде и переносили в культуральные флаконы с поверхностью роста клеток 25 см² или в чашки Петри с поверхностью роста клеток 10 см² (Techno Plastic Products AG, Швейцария). Культивирование клеток с нулевого пассажа проводили в специальной бессывороточной ростовой среде PowerStem MSC1 (PAN biotech), содержащей 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мг/мл фунгизона, при 37 °С в CO₂-инкубаторе (5 % концентрации CO₂). Через 48 ч после посева первичной культуры клетки, не прикрепившиеся к пластику, удаляли путем смены среды. Фракцию адгезивных МСК культивировали до образования 80–90 % конфлюэнтного монослоя, среду заменяли

каждые 3–4 дня. Клетки 0–4 пассажей были использованы для следующих экспериментов.

Иммуноцитометрические исследования. Конфлюэнтный монослой культуры клеток снимали с культурального пластика путем добавления 0,25 % раствора трипсина (Sigma) в 1мМ растворе ЭДТА в течение 1–3 мин при 37 °С. Затем промывали центрифугированием в бессывороточной среде PowerStem hMSC (PAN biotech) при 1300 g в течение 5 мин. Далее суспензию МСК пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 40 мкм для удаления крупных конъюгатов, после чего инкубировали с флуорохром-конъюгированными антителами на льду в течение 20 мин. Полученные таким образом образцы клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria (BD Biosciences, США). Иммунофенотипический анализ (экспрессию наиболее общих позитивных и отсутствие экспрессии негативных поверхностных антигенных маркеров) МСК проводили на 0–2 пассаже с применением антител к CD90 (1 : 80), CD73 (1 : 750), CD105 (1 : 500) CD45 (1 : 150) и CD34 (1 : 20). Использовали моноклональные антитела к CD90-FITC (Abcam, Великобритания), CD73-PE (BD Pharmingen, США), CD105-PE (BD Pharmingen), CD45-FITC (BioLegend, США), CD34-Alexa Fluor (BD Pharmingen). Данные иммунофенотипического анализа обрабатывали с использованием программного обеспечения 2.5.1 для проточной цитометрии.

Cell-IQ анализ МСК. Для анализа пролиферативного потенциала (митотический индекс) и двигательной активности (скорость миграции) выделенные МСК культивировали в течение четырех дней с использованием системы длительного наблюдения за живыми клетками – Cell-IQ (CM Technologies, Германия). Параметры культивирования: температура 37 °С; 5%-й увлажненный O₂ прокачивался непосредственно через культуральный планшет; периодичность подачи газа – 15 мин включен, 15 мин выключен; первичная подача газа – 30 мин. Параметры съемки: объектив – Nikon CFI Plan Fluorescence DL 10x (Nikon, Япония); частота съемки – 12 изображений в час; количество полей съемки – 12 на одну лунку шестилуночного планшета. Полученные изображения анализировали с помощью специализированного программного обеспечения Cell-IQ Analyser. Для оценки митотического индекса считали общее количество клеток и количество клеток, находящихся в состоянии деления. Для этого создавали библиотеку изображений для детекции и дифференцировки распластанных клеток, делящихся клеток, клеточных отростков, структур цитоплазмы в клетках большого

диаметра и клеточного дебриса. На основе данной библиотеки и подобранных параметров (минимального расстояния между соседними клетками, максимального диаметра клетки, симметрии клетки и др.) были проанализированы все полученные изображения. Митотический индекс рассчитывали как отношение числа делящихся клеток к их общему количеству. Двигательную активность оценивали для 20 случайно выбранных клеток по измерению протяженности траектории, пройденной клеткой за время съемки, либо до момента, пока она находилась в поле съемки. Маркировку клеток осуществляли в ручном режиме по центру ядер. Пройденную траекторию рассчитывали, измеряя расстояние между метками.

Мультилинейная дифференцировка МСК *in vitro*. Для оценки мультипотентности МСК индуцировали дифференцировку клеток по остеогенному и хондрогенному типу путем культивирования их в индукционных средах в условиях культуры. Для иммуноцитометрического анализа МСК в концентрации $0,3 \times 10^4/\text{см}^2$ рассевали в культуральные флаконы площадью 25 см^2 . Для гистохимического анализа клеток и анализа на аппарате Cell-IQ МСК рассевали в 6-луночные планшеты. Для осуществления остеогенной дифференцировки МСК инкубировали в среде StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco), для инициации хондрогенной дифференцировки использовали StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco). Полные культуральные среды включали все необходимые реагенты для направленной дифференцировки МСК, но не содержали сыворотки животного происхождения. Для выявления экспрессии маркеров остеобластного профиля на 14-е сутки инкубирования клеток в индукционной остеогенной среде определяли активность щелочной фосфатазы (Amresco, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Для визуализации минеральных отложений внеклеточного матрикса клетки после 21 суток инкубирования в индукционной среде дважды промывали в PBS (без Ca^{++} и Mg^{++}), наслаивали 10%-й формалин и фиксировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем удаляли раствор формалина, дважды отмывали клетки деионизованной водой и окрашивали 2%-м раствором ализаринового красного (pH 4,1) в течение 20 мин, после чего отмывали шесть раз деионизованной водой, чтобы удалить лишнюю краску. Хондрогенную дифференцировку подтверждали гистохимическим окрашиванием хрящевых депозитов альциановым синим. Клетки обоих типов ткани анализировали и фотографировали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 (blue edition).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Адгезивная фракция МСК, изолированных из костного мозга, относительно легко наращивается *in vitro* в специальных ростовых средах без дифференцировки. Ранее рядом авторов [4, 16] показано, что условия *in vitro* наращивания МСК могут приводить к постепенной потере характеристик ранних предшественников и к замедлению скорости пролиферации уже ко второму пассажу. Тип питательной среды и использование добавок оказывают существенное влияние на генотип и фенотип МСК, что следует учитывать при выборе оптимальных условий культивирования клеток для клинического использования [4]. В нашем эксперименте МСК достигали конfluence на 16–18 день инкубирования (0 пассаж), без замедления пролиферативной активности клеток и без потери способности к дифференцировке в хондро- и остеогенные типы тканей. Это объясняется применением новой высококачественной, не содержащей сыворотки плодов коров и компонентов животного происхождения, ростовой среды PowerStem MSC1, специально разработанной для пролиферации и длительного культивирования МСК человека без дифференцировки клеток. Росточная среда PowerStem MSC1 содержит соли, аминокислоты, гормоны, ростовые факторы и обогащена белками и липидами из компонентов крови человека по оптимизированной рецептуре, при строжайшем соблюдении стандартов производства высокого качества.

Известно, что МСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток [3, 4]. На уровне клеточных колоний мы определили несколько морфологических фенотипов: веретенообразные удлиненные клетки, большие уплощенные клетки и тонкие звездчатые клетки (рис. 1, а–в). Оба образца МСК пациентов имели сходные морфологические типы клеток, значимых различий между ними не обнаружено.

В результате иммунофенотипического анализа было показано, что профили экспрессии поверхностных антигенов культивируемых МСК соответствовали принятым стандартам [9]. В частности, более 90 % клеток экспрессировали CD90, CD73, CD105 – положительные маркеры, типичные для МСК (рис. 2). В то же время более 95 % клеток были негативны по CD45 (общий лейкоцитарный антиген) и по CD34 (маркер ранних кроветворных предшественников), что свидетельствует об отсутствии их примесей в популяции МСК (см. рис. 2). Различия по экспрессии CD-маркеров между образцами клеток от разных доноров были статистически недостоверными. Таким образом, иммунофенотипический

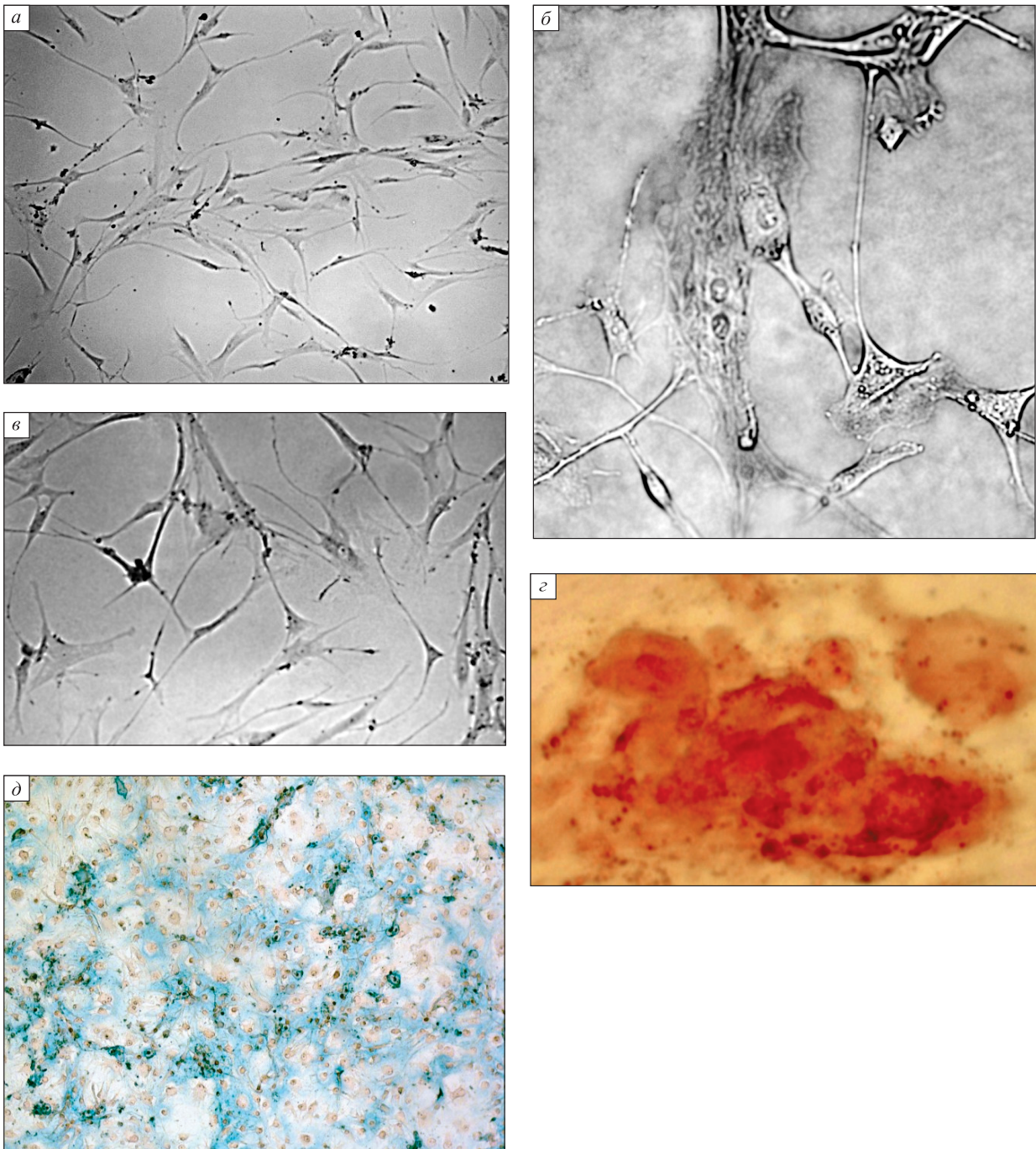


Рис. 1. Фенотип и гистохимическая характеристика мультипотентности МСК человека. В колониях МСК наблюдались три клеточных фенотипа: а – веретенообразные клетки (ув. $\times 10$), б – большие уплотненные клетки (ув. $\times 63$), в – звездчатые клетки (ув. $\times 20$), г – окраска на ализариновый красный S, плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски при остеогенной дифференцировке МСК (ув. $\times 63$), д – окраска на ализариновый синий, ядра клеток окрашены ядерным красным быстрым, хрящевые депозиты внеклеточного матрикса окрашены от бледно-голубого до темно-синего в зависимости от плотности при хондрогенной дифференцировке МСК (ув. $\times 10$)

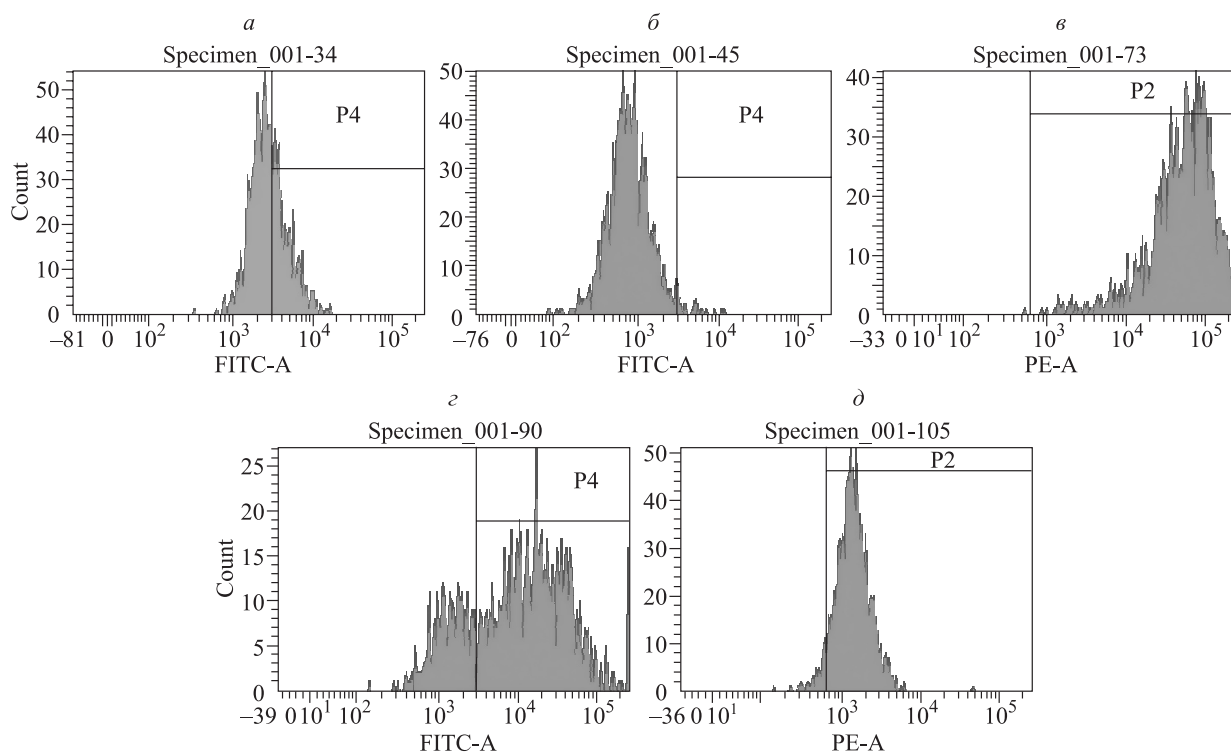


Рис. 2. Анализ поверхностного антигенного фенотипа МСК из костного мозга: а – CD34, б – CD45, в – CD73, г – CD90, д – CD105. Горизонтальные линии показывают анализируемые участки в сравнении с профилем неокрашенных клеток. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (логарифмическая шкала), по оси ординат – количество событий

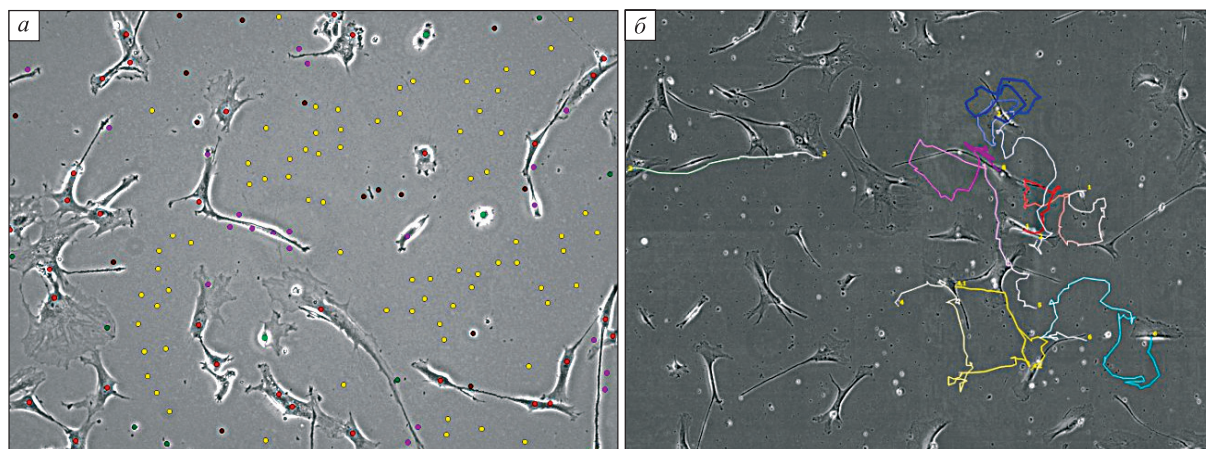


Рис. 3. Анализ изображений при помощи программного обеспечения Cell-IQ Analyser. а – красными точками обозначены детектированные распластанные клетки, светло-зелеными – делящиеся клетки, темно-зелеными – цитоплазма в клетках большого диаметра, розовыми – клеточные отростки, бордовыми – дебрис, желтыми – фон изображения; б – пример определения траекторий движения пяти случайно выбранных клеток. Траектории движения разных клеток окрашены в разные цвета

анализ показал, что по характеру и уровню экспрессии исследованных поверхностных антигенов (CD90, CD73, CD105, CD45 и CD34) культуры МСК человека на ранних пассажах (0–4) представляют собой практически гомогенную популяцию МСК.

Анализ клеточной пролиферации позволил определить общее число клеток, количество делящихся клеток и их соотношение. С помощью созданной библиотеки изображений идентифицировали распластанные, делящиеся клетки и клеточный дебрис (рис. 3, а). После автоматической

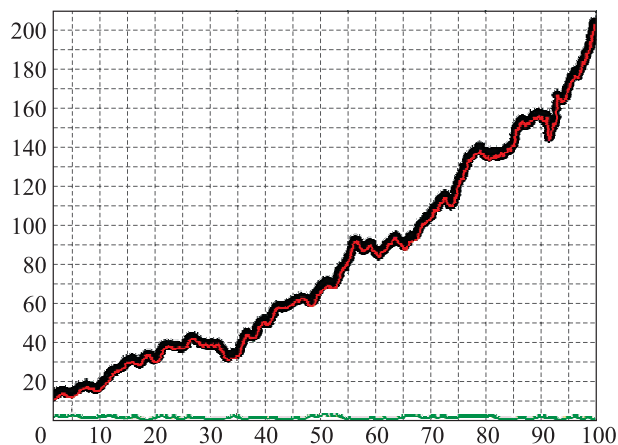


Рис. 4. Пролиферативная активность МСК. Красная и зеленая линии соответствуют количеству расплывшихся и делящихся клеток соответственно, черная линия – суммарное количество клеток; по оси абсцисс – время (ч), по оси ординат – количество клеток

обработки всех изображений с помощью пакета программ Cell-IQ Analyser подсчитано среднее значение митотического индекса на протяжении четырех дней непрерывного анализа пролиферирующих МСК. Для клеток, полученных от первого и второго пациента, среднее значение митотического индекса составляет 2,7 и 3,4 % соответственно, что указывает на пролиферацию МСК и подтверждается кривой увеличения количества клеток (рис. 4). Двигательную активность оценивали для 20 случайно выбранных клеток, для чего в программном обеспечении Cell-IQ Analyser отслеживали траекторию движения для каждой из них. Для анализа выбирались траектории тех клеток, которые за период трекинга не испытывали контактных взаимодействий с другими клетками (см. рис. 3, б) и, таким образом, явились следствием их внутренней активности, не зависящей от расположения других клеток. Вычисления характеристик подвижности МСК производили с использованием программы в пакете Mathematica 10, разработанной для обработки параметров двигательной активности остеобластов и хондробластов. Значение подвижности (скорость миграции клеток) МСК первого пациента составляет 42 мкм/ч (59 пикселей/час), второго – 38 мкм/ч (56 пикселей/час), что позволяет говорить об активном движении клеток (см. рис. 3, б).

Исследование остеогенного потенциала МСК человека проводили культивированием клеток в стандартной остеогенной среде [1]. С помощью фазово-контрастной микроскопии установлено, что количество веретенообразных клеток снижается, а число полигональных увеличивается визуально уже на третьи сутки инкубирования

в дифференцировочной среде. С увеличением срока культивирования МСК в остеогенной среде также возрастала активность щелочной фосфатазы, одного из основных маркеров остеогенной дифференцировки клеток. Это связано с участием фермента в формировании кристаллов гидроксиапатита во внеклеточном матриксе [17]. Интенсивность реакции на щелочную фосфатазу оценивали на 16–18-е сутки эксперимента, по интенсивности окрашивания она достигала максимальных значений в «костных бляшках», неравномерно образующихся в плотном монослое при длительном культивировании остеобластов. Завершение остеогенной дифференцировки созреванием остеобластов и формированием кальциевых депозитов внеклеточного матрикса подтверждается интенсивным окрашиванием ализариновым красным. В клеточных скоплениях, напоминающих «костные бляшки», плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности красной окраски (см. рис. 1, г). Для подтверждения хондрогенной дифференцировки МСК культивируемые клетки иммуноцитохимически окрашивались альциановым синим. При созревании хондробласты начинают продуцировать межклеточный матрикс хрящевой ткани, который специфически окрашивался в синий цвет, от светло-голубого до темно-синего пропорционально толщине отложения хрящевого матрикса (см. рис. 1, д).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активные разработки тканеинженерных конструкций для регенерации тканей опорно-двигательного аппарата определяют повышенный интерес к исследованиям МСК. МСК, выделенные из костного мозга, остаются в центре внимания большинства исследований из-за наличия у них способности дифференцироваться в клетки хондро- и остеогенных типов тканей. В нашей работе показано, что аспиранты костного мозга пациентов с диспластическим коксартрозом являются полноценным источником МСК, которые удовлетворяют требованиям, определенным Международным обществом клеточной терапии. В экспериментах по длительному культивированию с визуальным контролем на аппарате Cell-IQ определены размеры и морфология типов клеток в популяции МСК, адгезия, экспрессия типичных поверхностных маркеров, проведена дифференцировка МСК по остеогенному и хондрогенному типу. Впервые оценены параметры подвижности МСК, включая траекторию движения, среднюю скорость, а также митотический индекс МСК при инкубировании на культуральном пластике.

МСК являются перспективными кандидатами для тканевой инженерии, с прицелом на регенерацию костной и хрящевой ткани. Полученные данные могут использоваться как контрольные параметры клеток при сравнении с аналогичными параметрами при заселении клетками различных «скаффолдов». Сравнение изученных характеристик клеток позволит оценить токсичность и биосовместимость «скаффолдов» различного происхождения и различных физико-химических свойств. Вычисление скорости заселения клетками объемных трехмерных «скаффолдов» позволит разработать методические подходы к достижению оптимальных показателей адгезии МСК, поддержанию их пролиферации и направленной дифференцировки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-04875) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Регенеративная медицина и клеточные технологии», организованного на базе АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)». Работа в части анализа двигательной активности клеток выполнена при поддержке бюджетного проекта ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» № 0324-2016-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Н.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Харитонова Е.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Белявский А.В. Культивирование мезенхимных стволовых клеток мыши на матриксах из поли-3-оксибутирата // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015. (2). 114–119.
2. Кожевникова М.Н., Микаелян А.С., Старостин В.И. Молекулярно-генетический и иммунофенотипический анализ антигенного профиля, остеогенных и адипогенных потенциалов мезенхимальных стромальных клеток из печени зародышей и костного мозга половозрелых крыс // Цитология. 2009. 51. (6). 526–538.
3. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. Proliferation kinetics

and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy // Exp. Hematol. 2000. 28. (6). 707–715.

4. Bara J., Richards R.G., Alini M., Stoddart M.J. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following *in vitro* culture: implications for basic research and the clinic // Stem Cells. 2014. 32. 1713–1723.

5. Beyer Nardi N., da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization // Handb. Exp. Pharmacol. 2006. (174). 249–282.

6. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // Stem Cells. 2001. 19. (3). 180–192.

7. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts // Hum. Gene Ther. 2010. 21. 1045–1056.

8. Da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells // Stem Cells. 2008. 26. (9). 2287–2299.

9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. 8. (4). 315–317.

10. Dong Y., Chen X., Hong Y. Tissue-engineered bone formation *in vivo* for artificial laminae of the vertebral arch using beta-tricalcium phosphate bioceramics seeded with mesenchymal stem cells // Spine. 2013. 38. (21). 1300–1306.

11. Gimble J.M., Grayson W., Guilak F., Lopez M.J., Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration // Front. Biosci. 2011. 3. 69–81.

12. Horner C.B., Hirota K., Liu J., Maldonado M., Hyle Park B., Nam J. Magnitude-dependent and inversely-related osteogenic/chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under dynamic compressive strain // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2016. doi: 10.1002/term.2332.

13. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2005. 7. (5). 393–395.

14. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review // J. Nippon. Med. Sch. 2009. 76. (2). 56–66.

15. Mizuno H. Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials // Curr. Opin. Mol. Ther. 2010. 12. (4). 442–449.

16. Mosna F., Sensebe L., Krampere M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide // *Stem Cells Develop.* 2010. 19. (10) 1449–1470.

17. Di Maggio N. Bone marrow mesenchymal stem cell niches and regenerative medicine. Basel, 2010. 142 p.

18. Wu Y., Yang Z., Law J.B., He A.Y., Abbas A.A., Denslin V., Kamarul T., Hui J.H., Lee E.H. The combined effect of substrate stiffness and surface topography on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *Tissue Eng. Part A.* 2017. 23. (1-2). 43–54.

CULTIVATION AND CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE BONE MARROW OF THE PATIENTS WITH ORTHOPEDIC PATHOLOGY

Nataliya Mikhaylovna ASTAKHOVA^{1,2}, Anastasiya Viktorovna KOREL¹,
Konstantin Evgen'evich ORISHCHENKO³, Yaroslav Reingol'dovich EFREMOV^{3,4},
Gleb Aleksandrovich KUDROV¹, Irina Anatol'evna KIRILOVA¹

¹Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan of Minzdrav of Russia

630091, Novosibirsk, Frunze str., 17

²Innovative Medical Technology Center (Medical TechnoPark)

630091, Novosibirsk, Frunze str., 19a

³Institute of Cytology and Genetics of SB RAS

630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 10

⁴Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

The article presents data on the cultivation and characteristics of mesenchymal stem cells (MSC) isolated from the bone marrow of patients with dysplastic coxarthrosis. Several morphological phenotypes were found in the fraction of adhesive MSC: spindle-shaped elongated cells, large flattened cells, and thin stellate cells in both samples of bone marrow. Immunophenotypic analysis showed that cells express surface antigens (CD90, CD73, CD105, CD45 and CD34), which are characteristic for typical stem cells. It was shown that the use of a new growth medium containing no components of animal origin for the cultivation of human MSC allowed to achieve confluence of the cell culture on the 16th–8th day of incubation without delaying the proliferative activity of the cells and without loss of ability to differentiate into chondro- and osteogenic types of tissues. Multipotency of MSC was confirmed by osteogenic and chondrogenic differentiation of cells, during prolonged cultivation of MSCs in induction media *in vitro*. The differentiation of MSC into osteoblasts was confirmed by immunocytochemical staining for alkaline phosphatase and alizarin red S. Specific differentiation of MSC in chondrogenic type was revealed by staining of cartilage deposits with alcian blue. For the first time, such characteristics of human MSC as: mitotic index, trajectory of cells migration and average speed of migration on culture plastics were determined. The mitotic index of actively proliferating MSC was from 2.7 to 3.4 % of the total cell number. The moving activity (speed of cell migration) was 38–42 μm/h. Thus, bone marrow aspirate from patients with orthopedic pathology is the source of stem cells that meet all the criteria for MSC as determined by the International Society of Cellular Therapy and can be used in regenerative therapy of bone and cartilage.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs), bone marrow, dysplastic coxarthrosis, mitotic index, speed of migration, differentiation, bone and cartilage regeneration.

Astakhova N.M. – candidate of biological sciences, senior researcher of experimental department, e-mail: N.Astakhova@niito.ru

Korel A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of experimental department, e-mail: akorel@niito.ru

Orishchenko K.E. – candidate of biological sciences, head of cell technologies sector, e-mail: OrishchenkoKE@icg.sbras.ru

Efremov Ya.R. – leading engineer of the center for microscopic analysis of biological objects, e-mail: yarex@bionet.nsc.ru

Kudrov G.A. – junior researcher of experimental department, e-mail: g16kud@gmail.com

Kirilova I.A. – doctor of medical sciences, leading researcher of experimental department, e-mail: irinakirilova71@mail.ru

СТРУКТУРНОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЛИМЕРНОГО ПОКРЫТИЯ КОРОНАРНЫХ СТЕНТОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОТОКОМ УСКОРЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ

Павел Геннадьевич МАДОНОВ¹, Михаил Рудольфович МАШКОВЦЕВ²,
Светлана Владимировна МИШЕНИНА¹, Андрей Владимирович ДУБРОВИН¹,
Павел Николаевич МИРОШНИКОВ¹, Константин Игоревич ЕРШОВ¹,
Светлана Васильевна ПОЗДНЯКОВА¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 11

В статье представлены материалы по изучению влияния электронно-лучевой обработки коронарных стентов с лекарственным покрытием потоком ускоренных электронов. Проведены эксперименты по визуализации полимерного покрытия, определены параметры кинетики антипролиферативного вещества в зависимости от дозы радиации. Для визуальной оценки целостности покрытия стентов с лекарственным покрытием использовались растровая электронная микроскопия и оптическая микроскопия, для оценки кинетики высвобождения – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что электронно-лучевая обработка потоком ускоренных электронов приводит к опасным деформациям лекарственного покрытия коронарных стентов и увеличенному выходу антипролиферативного вещества (рапамицина). После электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов в дозе 1,5 и 3 Мрад на поверхности стентов с лекарственным покрытием появляются участки деформации элютинг-системы. Пролонгированная диффузия рапамицина из стента, создающая концентрации, превышающие концентрации без облучения, зависит от дозы радиационной нагрузки. Электронно-лучевая обработка стентов потоком ускоренных электронов позволяет в течение 10 суток иметь высокий градиент высвобождения антипролиферативного вещества из элютинг-системы, превышающий таковой без радиационной обработки. С позиции сопоставления эффективности и безопасности проведенные исследования позволяют рассматривать технологию электронно-лучевой обработки перспективной для внедрения в производство коронарных стентов.

Ключевые слова: коронарные стенты с лекарственным покрытием, радиационное воздействие на коронарные стенты, высвобождение антипролиферативного лекарственного средства.

В 2017 г. опубликованы новые Рекомендации Европейского кардиологического общества по лечению острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST (АМІ-STEMI), которые обновлены впервые с 2012 г. [4]. В разделе лечения острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST указано, что чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) должно выполняться с использованием стентов с лекарственным покрытием (СЛП), а

не голых металлических стентов. Класс этих рекомендаций повысился с ПА до I. В Российской Федерации в 2016 г. проведено около 180 000 процедур чрескожного коронарного вмешательства на коронарных артериях. Подавляющее большинство вмешательств приводило к установке стента. Всего за 2016 г. в РФ имплантировано 229 139 коронарных стентов, из них 108 777 с лекарственным покрытием [1]. Совершенно оче-

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

Машковцев М.Р. – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории

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

Дубровин А.В. – научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

Мирошников П.Н. – научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

Ершов К.И. – к.м.н., ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Позднякова С.В. – д.б.н., проф. кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

видно, что постепенно СЛП будут занимать доминирующие позиции в медицинской технологии лечения острого инфаркта миокарда посредством чрескожного коронарного вмешательства.

В СЛП фармакологически активным ингредиентом является антипролиферативное лекарственное средство. Производство СЛП выглядит достаточно просто – на стент наносится полимерное покрытие из биodeградируемого полимера, так называемая элютинг-система, в которую предварительно включено антипролиферативное средство, например сиролimus (рапамицин). После установки СЛП антипролиферативное вещество высвобождается и проникает в просвет и в интиму коронарной артерии, оказывая требуемое противовоспалительное действие. Между тем существует несколько технологических проблем, которые напрямую влияют на эффективность антипролиферативного действия лекарственного покрытия стента. Если элютинг-система выполнена рыхло и лекарственный препарат легко из нее диффундирует, то антипролиферативное действие быстро утрачивается. Напротив, при уплотнении элютинг-системы снижается высвобождение лекарственного средства и, соответственно, снижается клиническая эффективность.

В литературе описаны варианты модификации элютинг-системы с целью нарастить внутримономерный кросслинкинг и, сохраняя плотность матрицы, повысить период полувыведения лекарственного средства. В исследованиях [2, 3] показана возможность модификации элютинг-системы посредством электронно-лучевой обработки стентов с лекарственным покрытием потоком ускоренных электронов с целью достижения баланса между эффективным высвобождением антипролиферативного вещества как с позиции достижения необходимой концентрации, так и с позиции длительности диффузии из элютинг-системы. С помощью технологии электронно-лучевой модификации улучшаются кинетические параметры экстрагирования антипролиферативного лекарственного средства сиролimus (рапамицин) из коронарных стентов. Хроматографическая аналитика свидетельствует о химической целостности рапамицина после радиационного воздействия на него. Не менее важным обстоятельством электронно-лучевой обработки стентов с лекарственным покрытием является сохранность самой элютинг-системы после прохождения через нее потока ускоренных электронов.

Цель исследования – визуализация состояния элютинг-системы коронарных стентов после электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов и определение параметров кинетики антипролиферативного вещества (рапамицина).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов были выбраны СЛП «Калипсо» («Ангиолайн», г. Новосибирск), содержащие элютинг-систему из 650 мкг сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA, poly(lactide-co-glycolide acid) с включением 200 мкг рапамицина (CAS: 53123-88-9). Длина стентов 23 мм, диаметр 1,5 мм, масса 0,02 г. Электронно-лучевая обработка потоком ускоренных электронов производилась на импульсном линейном ускорителе ИЛУ-10 (ООО «СФМ-Фарм», г. Новосибирск) в дозах 1,5 и 3 Мрад.

Для визуальной оценки целостности покрытия СЛП нами использовалась растровая электронная микроскопия (РЭМ) и оптическая микроскопия (ОМ). Исследования проведены до и после электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов. РЭМ позволяет оценить микроморфологию поверхности с помощью сфокусированного электронного пучка, сканирующего поверхность, и изучать образцы с разрешением, в тысячи раз превосходящим возможности ОМ. Это достигается благодаря меньшей, чем у света, длине волны электронов. В наших исследованиях был использован растровый электронный микроскоп фирмы Hitachi S-3400N (Япония): ускоряющее напряжение 1000 В, разрешение изображения 2560×1920 , режим вторичных электронов (secondary electron, SE), увеличение в 30–400 раз, рабочее расстояние 11–13 мм. ОМ проводили на оптическом микроскопе VZM-200 (Caltex Scientific, США), откалиброванном на измерение геометрических размеров; увеличение в 30–150 раз. Пробоподготовку СЛП не проходили и были визуализированы и сфотографированы на баллоне. После электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов в дозе 1,5 и 3 Мрад исследованы по 5 стентов в режиме РЭМ и ОМ. В качестве контроля исследованы 3 стента в режиме РЭМ и ОМ.

После электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов и визуализации определялись параметры кинетики антипролиферативного вещества. Для этого каждый СЛП помещался в стеклянную емкость объемом 20 мл, в которую добавляли 5 мл 1мМ натрий-фосфатного буфера с pH 7,4. Емкость помещали в термостатированный при 37 °С шкаф на шейкер с рабочей частотой 120 об/мин, через заданные промежутки времени (~24 ч) из нее отбирали пробу для ВЭЖХ. Рапамицин имеет достаточно короткий период распада ($t_{1/2}$ 12 ч), в этой связи каждый раз после отбора пробы буферный раствор в емкости заменяли на свежий. Критически важным периодом блокады воспаления и уменьшения

пролиферативной активности в зоне стентирования являются первые 10 дней, поэтому продолжительность эксперимента ограничили 10 пробами. Измерения количества выделившегося из стента рапамицина методом ВЭЖХ проводили с использованием жидкостного хроматографа Accela Thermo Scientific (США), оборудованного диодно-матричным УФ детектором, в следующих условиях: объем пробы 20 мкл; элюент А: [4 М LiClO₄ в 0,1 М HClO₄] : H₂O = 5 : 95; элюент В: ацетонитрил; колонка Kromasil 300-5C18 100 × 4,6 мм, температура колонки 60 °С; детектор: 280 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всего в исследовании использовано 13 СЛП, на рисунках представлены наиболее демонстративные фотоснимки, которые максимально отражают результаты экспериментов.

Характерные фотоснимки СЛП до электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов представлены на рис. 1. Элютинг-система имеет гладкую поверхность без участков растрескивания и фрагментации. Кинетика высвобождения лекарственного препарата подтверждает функциональную активность элютинг-системы. Имеет место выраженное увеличение концентрации рапамицина начиная с первого часа модельного эксперимента (рис. 2).

После электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов в дозе 1,5 и 3 Мрад на поверхности СЛП появляются участки деформации элютинг-системы, на рис. 3 отчетливо видны участки растрескивания и частичного отслоения. При этом не отмечается участков полной фрагментации с угрозой полного отслоения от металлической основы стента. Наряду с нару-

шением целостности элютинг-системы процессы высвобождения рапамицина из СЛП не только не ухудшаются, а, напротив, суммарно увеличиваются. Заслуживают внимания некоторые закономерности измененной кинетики рапамицина. Без электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов концентрация рапамицина в первые 2 суток выше, чем после облучения в дозе 1,5 Мрад, и в первые 4 суток выше, чем после облучения в дозе 3 Мрад (см. рис. 2).

Очевидно, что пролонгированная диффузия рапамицина из СЛП, создающая концентрации, превышающие таковые без облучения, имеет зависящий от дозы радиационной нагрузки характер. Этот факт заслуживает детального осмысления. С одной стороны, электронно-лучевая обработка СЛП потоком ускоренных электронов позволяет в течение как минимум 10 сут иметь высокий градиент высвобождения антипролиферативного вещества из элютинг-системы, превышающий таковой без радиационной обработки. Возможно, это достигается двумя взаимосвязанными обстоятельствами. Во-первых, индуцированный потоком электронов полимерный кросслинкинг предотвращает интенсивное вымывание антипролиферативного вещества из элютинг-системы. Во-вторых, в результате радиационной деформации СЛП возникают дополнительные площади для контакта с жидкой фазой и создаются условия для усиления высвобождения антипролиферативного вещества из толщи элютинг-системы. Суммарно это приводит к увеличенному и пролонгированному выходу рапамицина из СЛП. Напрашивается однозначный вывод о благоприятном эффекте электронно-лучевой обработки СЛП потоком ускоренных электронов. Однако нельзя оставить без внимания тот факт, что прирост концентрации составляет не более

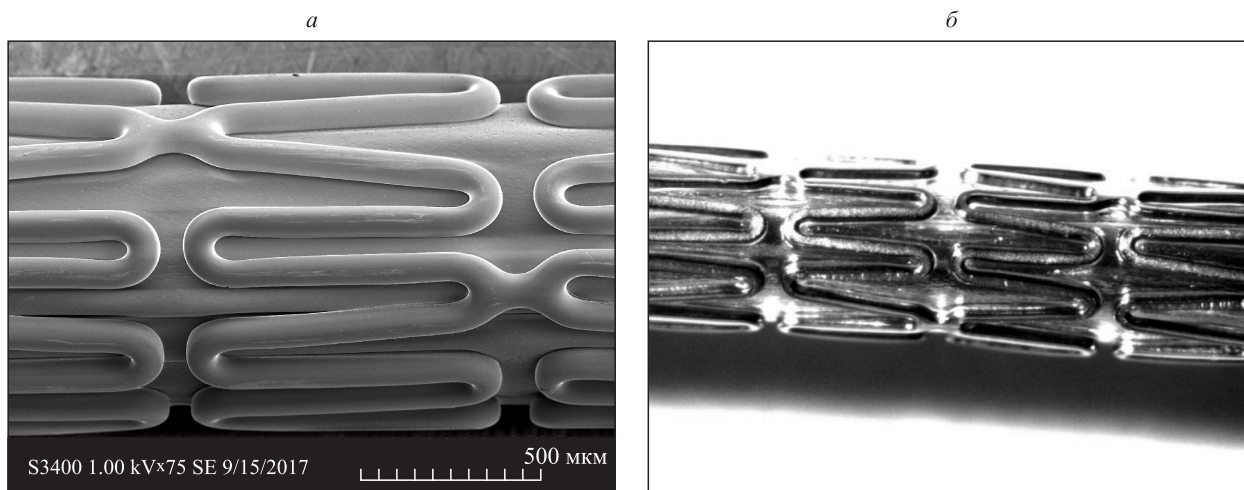


Рис. 1. Поверхность СЛП до электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов: а – РЭМ, б – ОМ

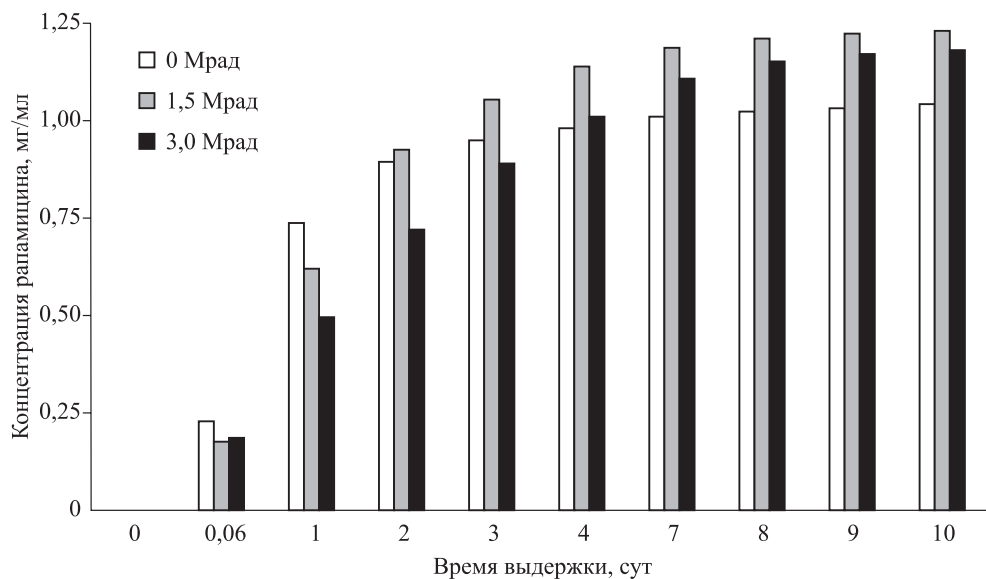


Рис. 2. Кинетика высвобождения рапамидина из СЛП до и после электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов в дозе 1,5 и 3 Mrad

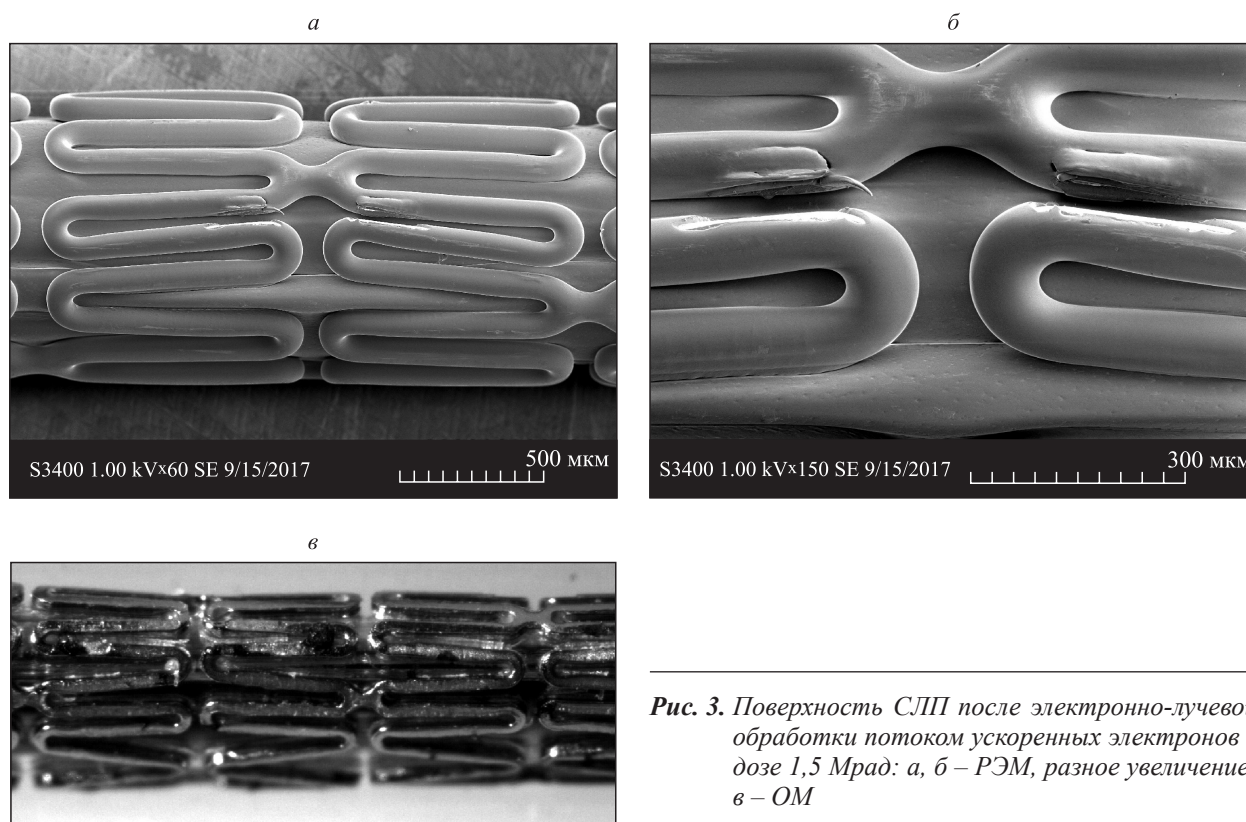


Рис. 3. Поверхность СЛП после электронно-лучевой обработки потоком ускоренных электронов в дозе 1,5 Mrad: а, б – РЭМ, разное увеличение; в – ОМ

13 % (см. рис. 2). С определенной долей допущения можно считать, что увеличение концентрации антипролиферативного вещества на 10–13 % не будет иметь существенной патогенетической значимости в части блокады пролиферативного компонента воспалительной реакции сосудистой стенки. Это не дезавуирует предыдущий позитивный вывод, а располагает к более детальному рас-

смотрению феномена радиационной деформации СЛП с позиции стратификации риска применения стентов с участками повреждения элютинг-системы.

Очевидно, что СЛП не выдерживают потока ускоренных электронов даже в невысоких дозах. Между тем при внимательном рассмотрении результатов РЭМ характер повреждений не

располагает считать их опасными для развития ятрогенных осложнений. Участки повреждения на СЛП не имеют тенденции к полной фрагментации и отслоению. Это обстоятельство позволяет не считать их эмболоопасными для кровеносного русла и не выглядит тревожно еще и потому, что после установки стента и фактически раздавливания пораженного участка артерии в зоне окклюзии в кровотоке неизбежно появятся более крупные фрагменты поврежденной ткани.

Таким образом, интерпретация результатов электронно-лучевой обработки СЛП потоком ускоренных электронов с позиции сопоставления эффективности и безопасности позволяет рассматривать данную технологию перспективной для внедрения в производство коронарных стентов.

Представленная экспериментальная работа выполнена в рамках исполнения Новосибирским государственным медицинским университетом Минздрава России Государственного задания по теме: «Создание медицинских изделий для рентгенхирургического лечения инфаркта миокарда и тромбоэмболических осложнений», Рег. № 115060410034 (2015-2017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алесян Б.Г., Григорьян А.М., Стаферов А.В.* Рентгенэндоваскулярная диагностика и лечение заболеваний сердца и сосудов в Российской Федерации. М., 2017.

2. *Мадонов П.Г., Дубровин А.В., Мирошников П.Н., Мишенина С.В., Еришов К.И., Позднякова С.В.* Электронно-лучевая модификация коронарных стентов с лекарственным покрытием // Мед. и образ. в Сибири. 2015. (5). Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1923 (дата обращения: 13.10.2016).

3. *Маринкин И.О., Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Дубровин А.В., Мирошников П.Н., Еришов К.И., Позднякова С.В.* Фармакологическая модификация коронарных стентов // Сиб. науч. мед. журн. 2016. 36. (6). 24–28.

4. The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. Electronic resource: <https://academic.up.com/eurheartj/advance-article/doi/10.1093/eurheartj/ehx393/4095042>

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF POLYMER COATING OF CORONARY STENTS AFTER EFFECTS OF THE ACCELERATED ELECTRONS FLOW

**Pavel Gennad'evich MADONOV¹, Michail Rudolfovich MASHKOVTSSEV²,
Svetlana Vladimirovna MISHENINA¹, Andrey Vladimirovich DUBROVIN¹,
Pavel Nikolaevich MIROSHNIKOV¹, Konstantin Igorevich Yershov¹,
Svetlana Vasil'evna POZDNYAKOVA¹**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Budker Institute of Nuclear Physics of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 11*

The article presents the results of investigation of the electron-beam processing effect by a stream of accelerated electrons on coronary stents with a drug coating. Experiments on the visualization of the polymer coating have been carried out, the parameters of the kinetics of the antiproliferative substance as a function of the radiation dose have been determined. Integrity of the drug-coated stents has been visually assessed by scanning electron microscopy and optical microscopy. The release kinetic have been evaluated by high-performance liquid chromatography method. It has been established that electron beam treatment by the stream of accelerated electrons leads to non-dangerous deformations of the coronary stents drug coating and to the increased yield of antiproliferative substance. Deformation sites of the elution system appear on the surface of the drug-eluting stents after electron-beam treatment by the stream of accelerated electrons at a dose of 1.5 and 3 Mrad. Prolonged diffusion of rapamycin from the treated stent creates concentrations greater than those when used untreated stent and depends on the radiation load in a dose-dependent manner. Stent electron beam treatment by the stream of accelerated electrons provides a high gradient of release of the antiproliferative substance from the elution system, exceeding that without treatment, for 10 days. Comparison of efficiency and safety allows us to consider the technology of electron beam processing as promising for the introduction into coronary stents production.

Key words: coronary stents with drug coating, radiation effect on coronary stents, release of antiproliferative drug.

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

Mashkovtsev M.R. – junior researcher

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

Dubrovin A.V. – researcher of Central Research Laboratory

Miroshnikov P.N. – researcher of central research laboratory

*Yershov K.I. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for pharmacology,
clinical pharmacology and evidentiary medicine*

*Pozdnyakova S.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for pharmacology,
clinical pharmacology and evidentiary medicine*

ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНОГО ЗАДНЕГО КАПСУЛОРЕКСИСА НА АКТИВНОСТЬ МЕСТНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ФАКОЭМУЛЬСИФИКАЦИИ ОСЛОЖНЕННОЙ КАТАРАКТЫ НА ФОНЕ ПСЕВДОЭКСФОЛИАТИВНОГО СИНДРОМА

Елена Владиленовна ЕГОРОВА¹, Ольга Олеговна ОБУХОВА²,
Ольга Михайловна ГОРБЕНКО², Аля Петровна ШВАЮК²,
Валерий Вячеславович ЧЕРНЫХ¹, Александр Николаевич ТРУНОВ^{1,2}

¹ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России,
Новосибирский филиал
630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

² НИИ экспериментальной и клинической медицины
630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Целью настоящего исследования было изучить активность местного воспалительного процесса у пациентов с осложненной катарактой на фоне псевдоэксфолиативного синдрома до и после фактоэмульсификации с выполнением первичного заднего капсулорексиса. Обследовано 54 пациента (54 глаза) в возрасте от 50 до 92 лет ($76,0 \pm 7,4$ года), обратившихся для хирургического лечения осложненной катаракты на фоне псевдоэксфолиативного синдрома. В слезной жидкости пациентов до операции и на 5 сутки послеоперационного периода определяли содержание ИЛ-6, ИЛ-10, матричной металлопротеиназы 9 (ММР-9), TGF- β 1. Показано, что у пациентов с осложненной катарактой на фоне псевдоэксфолиативного синдрома определяется активность местного хронического воспалительного процесса (высокие концентрации ИЛ-6, ММР-9). Значимым представляется установленное в исследовании повышение содержания TGF- β 1, который является важным фактором в образовании псевдоэксфолиативного материала. Установлено, что использование модифицированной методики экстракции катаракты с использованием первичного заднего капсулорексиса у пациентов с псевдоэксфолиативным синдромом не приводит к активации местного процесса воспаления.

Ключевые слова: осложненная катаракта, псевдоэксфолиативный синдром, задний капсулорексис, воспаление, цитокины.

В настоящее время псевдоэксфолиативный синдром (ПЭС) рассматривается как широко распространенный, возраст-ассоциированный системный патологический процесс, механизмы развития которого тесно связаны с системными метаболическими нарушениями, приводящими к отложению экстрацеллюлярных микрофибриллярных конгломератов на поверхности различных структур глаза и, особенно, его переднего сегмента, с развитием значимых нарушений функционального состояния органа зрения [2, 7, 8, 12, 13, 20, 24].

В научной литературе существует ряд концепций возникновения и развития ПЭС, наиболее распространенной из которых является теория эластоза и патологии базальных мембран, основанная на постулате о нарушении синтеза и сборки межклеточного матрикса, приводящего к изменению морфофункциональных свойств соединительной ткани [8, 24, 25, 27]. В настоящее время большое внимание уделяют углубленному изучению роли в патогенезе ПЭС генетической предрасположенности, окислительного стресса, активности местного воспалительного про-

Егорова Е.В. – к.м.н., зам. директора по лечебной работе, e-mail: e.egorova@mntk.nsk.ru

Обухова О.О. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии, e-mail: olga.o.obukhova@gmail.com

Горбенко О.М. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, e-mail: gorbenko1956@yandex.ru

Шваюк А.П. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, e-mail: alevtina.shvayuk@yandex.ru

Черных В.В. – д.м.н., проф., директор, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Трунов А.Н. – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, руководитель лаборатории иммунологии, e-mail: trunov1963@yandex.ru

песса, нарушений синтеза и баланса медиаторов межклеточных взаимоотношений – цитокинов, факторов роста, матричных металлопротеиназ, нейротрофических факторов и др. [11, 13, 16, 26, 28–30]. Учитывая многофакторность возникновения и развития ПЭС, не вызывает сомнения, что он является фактором риска возникновения и утяжеляющей причиной развития многих офтальмологических заболеваний, таких как глаукома, катаракта и ряд других [3, 7, 8, 18, 20, 27].

Высокий риск интраоперационных осложнений и необходимость оптимизировать хирургическую технику факоэмульсификации катаракты при ПЭС обсуждаются в работах многих авторов [14, 21, 22]. Наиболее дискуссионным является этап проведения первичного заднего капсулорексиса (ПЗКР). Суть этого метода состоит в дозированном удалении центральной зоны задней капсулы хрусталика, являющейся матрицей для развития вторичной катаракты, при сохранении интактного переднего гиалоида [19]. Несмотря на многолетний опыт применения ПЗКР, существует мнение, что дозированное вскрытие задней капсулы хрусталика при его выполнении приводит к нарушению барьера между передним отрезком глаза и витреальной полостью, что может привести к повышению в ней содержания биологически активных веществ, обладающих провоспалительной, ангиогенной активностью, и вызвать макулярный отек [23]. Хирургическая травма способна индуцировать синтез простагландинов, провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода, нарушая микроциркуляцию в сетчатке и хориоиде с развитием ретиальной гипоксии и экссудативного воспаления [1]. Однако убедительных данных о том, что использование современных микроинвазивных технологий выполнения оперативного вмешательства и ведения послеоперационного периода при экстракции катаракты с выполнением ПЗКР приводит к активации местного воспалительного процесса, в настоящее время не представлено, что позволило сформулировать цель настоящего исследования – изучить активность местного воспалительного процесса у пациентов с осложненной катарактой на фоне псевдоэкзофолиативного синдрома до и после факоэмульсификации с выполнением первичного заднего капсулорексиса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с целью исследования на базе МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, обследовано 54 пациента (54 глаза) в возрасте

от 50 до 92 лет ($76,0 \pm 7,4$ года), обратившихся для хирургического лечения осложненной катаракты на фоне ПЭС. Любая другая сопутствующая офтальмопатология являлась критерием исключения из группы исследования. У всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании, проведение операции и забор биологического материала, а также использование полученных данных в научных целях. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал.

Всем пациентам проводилось стандартное предоперационное диагностическое обследование. Острота зрения была от правильной светопроекции до 0,6 с коррекцией, длина переднезадней оси глаза варьировала от 22,31 до 25,22 мм, рефракция роговицы – $42,7 \pm 1,2$ дптр, внутриглазное давление – $16,7 \pm 2,1$ мм рт. ст. Дистрофические изменения переднего отрезка глаза и характер отложений псевдоэкзофолиативного материала соответствовали 2–3 степени ПЭС [7]. Ультразвуковая биомикроскопия выявила несостоятельность связочно-капсульного аппарата хрусталика 2–4 стадии по классификации Э.В. Егоровой с соавт. [6]. При биомикроскопии хрусталика отмечены дистрофические изменения передней капсулы, плотность ядра 2–4 степени по классификации L. Buratto [15], в 5 случаях (9,3 %) – факодонез.

Всем пациентам была проведена ультразвуковая факоэмульсификация через разрез 1,8–2,2 мм с имплантацией различных моделей заднекамерных гибких интраокулярных линз (ИОЛ) из гидрофильного или гидрофобного акрила. Отсутствие оптимальных условий для хирургического лечения катаракты существенно повышает риски интра- и раннего послеоперационного периодов, а прогрессирующее развитие ПЭС приводит к развитию специфических негативных отдаленных последствий (фимоз и контрактура капсульного мешка хрусталика (КМХ), вторичная катаракта, дислокация комплекса КМХ-ИОЛ). Предложенная нами технология факоэмульсификации катаракты при ПЭС направлена на максимально возможное исключение стресса связочно-капсульного аппарата хрусталика во время хирургии, предотвращение его деградации в отдаленном послеоперационном периоде, а также профилактику развития вторичной катаракты. Для достижения поставленной цели были модифицированы некоторые этапы классического алгоритма факоэмульсификации катаракты. Особенности хирургической техники состояли в следующем: щадящая гидродиссекция, исключение этапа ро-

тации ядра, оптимизация гидродинамического режима, безротационная техника ультразвукового удаления ядра, использование расширителей зрачка или иридокапсулярных ретракторов, имплантация внутрикапсульного кольца, пилинг эпителия передней капсулы хрусталика, выполнение ПЗКР [5].

Манипуляции на задней капсуле хрусталика также проводились с учетом проявлений ПЭС в зоне витреолентикулярного интерфейса: несостоятельность связочного аппарата, дистрофические изменения капсульного мешка, ослабление связки Вигера, расширение пространства Бергера, деструкция стекловидного тела, нарушение структуры передней гиалоидной мембраны. Особенности хирургической техники выполнения заднего капсулорексиса состояли в следующем: имплантация внутрикапсульного кольца перед выполнением заднего капсулорексиса; частичное заполнение капсульного мешка вискоэластичным раствором, достаточное лишь для расправления задней капсулы; применение инструмента с округлым рабочим кончиком для идентификации задней капсулы, легкое давление которого вызывает появление складчатости на поверхности капсулы и позволяет прецизионно провести ее перфорацию; введение вискоэластика под заднюю капсулу исключалось или проводилось в микродозе лишь для обозначения точки перфорации; исключение этапа удаления вискоэластика из-под капсульного мешка [4].

В до- и послеоперационном периоде обследованным назначалась местная терапия, направленная на снижение риска интра- и послеоперационных осложнений. Медикаментозное сопровождение проводилось по стандартной схеме, включающей местное применение в виде инстилляций в конъюнктивальную полость антибиотиков, стероидных и нестероидных противовоспалительных средств. За 1–2 дня до операции закапывали сигницеф и дикло-ф дважды в сутки. В послеоперационном периоде режим назначения препаратов был следующим: сигницеф – 4 раза в день в течение 7 дней, дексаметазон 0,1 % – 4 раза в день сроком 2 недели в сочетании с диклофенаком 0,1 % – 4 раза в день на протяжении четырех недель.

В качестве биологического субстрата для исследования была выбрана слеза – неинвазивно доступная биологическая жидкость, омывающая орган зрения и способная, в определенной степени, отражать иммунобиохимические изменения, происходящие в структурах глаза [9, 10]. Слезную жидкость в объеме 0,3–0,4 мл забирали из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку до оперативного вмеша-

тельства и на 5-е сутки послеоперационного периода и замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве нормативных (контрольных) значений тестируемых показателей были взяты результаты обследования 25 «практически здоровых» лиц аналогичного возраста без офтальмологической патологии и без признаков ПЭС.

Концентрацию в слезной жидкости трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) определяли методом иммуноферментного анализа по инструкции производителя: TGF- $\beta 1$ – на коммерческих тест-системах DRG-diagnostics (Германия), MMP-9 – на коммерческих тест-системах CUSABIO (КНР), ИЛ-6 и ИЛ-10 – на коммерческих тест-системах ООО «Цитокин» (Россия). Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм.

Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна – Уитни. Данные в таблице представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем вероятности 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований были выявлены следующие закономерности, представленные в таблице.

При определении в слезной жидкости пациентов обследованных групп концентрации ИЛ-6, являющегося провоспалительным полипотентным цитокином, участвующим в процессах инициации и хронизации воспаления, аутоиммунного реагирования и антителообразования, способного регулировать синтез ряда провоспалительных цитокинов и индуцировать синтез TGF- $\beta 1$, установлено, что его содержание у пациентов основной группы было в 2,5 раза выше, чем у лиц контрольной группы ($p < 0,05$). На пятые сутки послеоперационного периода концентрация ИЛ-6 в слезной жидкости пациентов основной группы была 1,2 раза выше величины показателя до оперативного лечения, но достоверно от нее не отличалась.

MMP-9 является представителем семейства внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать белки внеклеточного матрикса, участвующих в развитии деструктивно-воспалительных и пролиферативных процессов, апоптозе, регуляции синтеза ряда провоспалительных цитокинов. Концентрация MMP-9 в

Таблица

Содержание изучаемых показателей в слезной жидкости пациентов обследованных групп в сравнении с контрольной группой

Показатель	Контрольная группа (n = 20)	Основная группа, до операции (n = 54)	Основная группа, 5-е сутки после операции (n = 54)
ИЛ-6, пг/мл	9,2 ± 2,1	23,6 ± 4,8*	29,2 ± 5,1*
ИЛ-10, пг/мл	13,1 ± 2,4	24,9 ± 3,1*	20,7 ± 2,8*
ММР-9, нг/мл	0,50 ± 0,07	1,35 ± 0,16*	1,46 ± 0,18*
TGF-β1 пг/мл	327,5 ± 19,4	439,5 ± 30,6 *	392,6 ± 21,6*

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$.

слезной жидкости пациентов основной группы до оперативного лечения была в 2,7 раза выше величины показателя у пациентов контрольной группы ($p < 0,05$). На пятые сутки послеоперационного периода концентрация ММР-9 в слезной жидкости пациентов основной группы была в 1,1 раза выше значения показателя до оперативного лечения, но достоверно от него не отличалась.

TGF-β1 – цитокин, обладающий выраженной противовоспалительной активностью и способностью влиять на процессы пролиферации, а также участвующий в процессах регуляции иммунного ответа, клеточного роста и дифференцировки, апоптозе. Концентрация TGF-β1 в слезной жидкости пациентов основной группы до оперативного лечения превышала таковую лиц группы сравнения в 1,34 раза ($p < 0,05$). На пятые сутки послеоперационного периода содержание TGF-β1 в слезной жидкости пациентов основной группы было в 1,1 раза меньше, чем до оперативного лечения ($p > 0,05$).

ИЛ-10 представляет собой цитокин с противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами, участвующий в регуляции синтеза многих факторов роста. Его содержание в слезной жидкости пациентов основной группы было в 1,9 раза больше, чем у лиц, входивших в контрольную группу ($p < 0,05$). На пятые сутки послеоперационного периода концентрация ИЛ-10 в слезной жидкости пациентов основной группы была в 1,2 раза ниже значения показателя до оперативного лечения, но достоверно от него не отличалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных в исследовании данных позволяет сделать ряд заключений. У пациентов с осложненной катарактой на фоне ПЭС установлено достоверное повышение концентрации биологически активных субстанций, участвующих в развитии хронического воспалительного про-

цесса, способных разрушать белки внеклеточного матрикса, активировать процессы деструкции, пролиферации, увеличивать проницаемость сосудистой стенки. Это подтверждается выявленным достоверным увеличением содержания ИЛ-6 и ММР-9, обладающих этими свойствами, в слезной жидкости пациентов основной группы до оперативного лечения.

Значимым представляется установленное в исследовании повышение в слезной жидкости обследованных пациентов концентрации TGF-β1, цитокина, обладающего выраженной пролиферативной и противовоспалительной активностью. Известно, что к активации его синтеза способны приводить многие провоспалительные цитокины и матричные металлопротеиназы, в том числе ИЛ-6 и ММР-9. Указанное позволяет расценить увеличение его содержания на начальных этапах патологического процесса как компенсаторное и связанное с развитием воспалительного процесса и деструкцией внеклеточного матрикса, однако способность TGF-β1 активировать процессы фиброза является одним из патогенетически значимых факторов в образовании псевдоэкзофоллиативного материала.

Сделанное заключение находит свое подтверждение в немногочисленных исследованиях, посвященных изучению механизмов развития ПЭС [29, 30]. В пользу представленного заключения свидетельствуют и данные научных исследований последних лет, посвященных изучению патогенеза ПЭС, которые подтверждают выводы настоящего исследования [13, 16–19], а также наличие у обследованных пациентов неблагоприятного «хирургического фона» за счет развития ПЭС.

Данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что использование предлагаемой модифицированной методики удаления катаракты с выполнением первичного заднего капсулорексиса у пациентов с ПЭС [4, 5] на фоне проводимой медикаментозной терапии в пред- и

послеоперационный период не приводит к активации местного процесса воспаления, о чем свидетельствует отсутствие достоверного повышения концентрации биологически активных веществ, обладающих провоспалительными свойствами, в слезной жидкости пациентов основной группы на 5-е сутки послеоперационного периода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахов С.Ю., Гобеджишвили М.В. Послеоперационный макулярный отек, синдром Ирвина – Гасса // Клини. офтальмология. 2010. (1). 5–8.
2. Брежнев А.Ю., Курьшева Н.И., Трубилин В.Н., Баранов В.И. Проблемы ранней клинической диагностики псевдоэкзофолиативного синдрома // Офтальмология. 2012. 9. (1). 49–52.
3. Бессмертный А.М., Киселева О.А., Фатуллоева Н.Ф. Некоторые аспекты клинического течения псевдоэкзофолиативной глаукомы // Клини. офтальмология. 2008. (4). 62–63.
4. Егорова Е.В., Бетке А.В., Ермакова О.В. Особенности техники выполнения первичного заднего капсулорексиса при псевдоэкзофолиативном синдроме // Всерос. науч. конф. «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии». М., 2013. 66–70.
5. Пат. 2504353 РФ. Способ экстракции катаракты с псевдоэкзофолиативным синдромом / Е.В. Егорова; Опубл. 20.01.2014.
6. Егорова Э.В., Узунян Д.Г., Толчинская А.И. и др. Изучение симптоматики псевдоэкзофолиативного синдрома по данным ультразвуковой биомикроскопии в сравнительном аспекте с клинико-функциональными методами исследования // Вестн. ОГУ. 2004. (13). 197–200.
7. Малов В.М., Ерошевская Е.Б., Малов И.В., Осипова Т.А. Распространенность псевдоэкзофолиативного синдрома, классификация и результаты хирургического лечения больных при подвывихе хрусталика // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2013. 15. (3). 1853–1856.
8. Михина И.В., Фабрикантов О.Л. Современные аспекты псевдоэкзофолиативного синдрома // Практич. мед. 2012. (4). 229–232.
9. Тахчиди Х.П., Черных В.В., Костенев С.В. и др. Клинико-патологический анализ применения эксимерных лазеров с длинами волн 193 и 223 нм в рефракционной хирургии // Офтальмохирургия. 2006. (1). 9–12.
10. Черных В.В. Влияние комплексной консервативной терапии на иммунобиохимические показатели в слезной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой // Глаукома. 2005. (4). 20–23.
11. Черных В.В., Егорова Е.В., Ермакова О.В. и др. О возможной роли иммунных нарушений в патогенезе псевдоэкзофолиативного синдрома // Бюл. СО РАМН. 2009. (4). 131–135.
12. Юрьева Т.Н. Закономерности и механизмы формирования билатерального псевдоэкзофолиативного синдрома // Офтальмология. 2011. (2). 74–80.
13. Aboobakar I.F., Johnson W.M., Stamer W.D. et al. Major review: Exfoliation syndrome; advances in disease genetics, molecular biology, and epidemiology // Exp. Eye Res. 2016. 154. 88–103.
14. Bouazza M., Chakib A., Amrani H. et al. Long-term results of phacoemulsification in pseudoexfoliation syndrome // J. Fr. Ophthalmol. 2016. 39. (4). 364–369.
15. Buratto L. Cataract surgery - the transition from extracapsular cataract extraction to phacoemulsification. Milan, 1999. 474 p.
16. Djordjević-Jocić J., Zlatanović G., Veselinović D. et al. Transforming growth factor beta1, matrix-metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor in patients with pseudoexfoliation glaucoma/syndrome // Vojnosanit. Pregl. 2012. 69. (3). 231–236.
17. Dursun F., Vural Ozec A., Aydin H. et al. Total oxidative stress, paraoxonase and arylesterase levels at patients with pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma // Int. J. Ophthalmol. 2015. 8. (5). 985–900.
18. Elhaway E., Kamthan G., Dong C.Q., Danias J. Pseudoexfoliation syndrome, a systemic disorder with ocular manifestations // Hum. Genomics. 2012. 6. (1). ID 22.
19. Galand A., van Cauwenberge F., Moosavi J. Posterior capsulorhexis in adult eyes with intact and clear capsules // J. Cataract. Refract. Surg. 1996. 22. 458–46.
20. Jiwani A.Z., Pasquale L.R. Exfoliation syndrome and solar exposure: new epidemiological insights into the pathophysiology of the disease // Int. Ophthalmol. Clin. 2015. 55. (4). 13–22.
21. Kawasaki S., Tasaka Y., Suzuki T. et al. Influence of elevated intraocular pressure on the posterior chamber–anterior hyaloid membrane barrier during cataract operations // Arch. Ophthalmol. 2011. 129. 751–757.
22. Moore R.L., Silva V., Vazquez de Parga P. et al. Pseudoexfoliation and cataract surgery // J. Emmetropia. 2013. 4. 39–47.
23. Ohrloff C., Schalnus R., Rothe R., Spitznas M. Role of the posterior capsule in the aqueous-vitreous barrier in aphakic and pseudophakic eyes // J. Cataract. Refract. Surg. 1990. 16. 198–201.
24. Schlötzer-Schrehardt U., Naumann G.O. A histopathologic study of zonular instability in pseudoexfoliation syndrome // Am. J. Ophthalmol. 2004. 118. 730–743.
25. Schlötzer-Schrehardt U. New pathogenetic insights into pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. Therapeutically relevant? // Ophthalmologie. 2012. 109. (10). 944–951.

26. Sarenac Vulovic T.S., Pavlovic S.M., Zdravkovic N.S. Proinflammatory cytokines induce XFG development // *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2016. 24. (6). 671–677.
27. Teekhasaene C., Suwan Y., Supakontanasan W. et al. The clinical spectrum and a new theory of pathogenesis of true exfoliation syndrome // *Ophthalmology.* 2016. 123. (11). 2328–2337.
28. Tetikoğlu M., Sağdik H.M., Aktas S. et al. Serum prolidase activity and oxidative stress in patients with pseudoexfoliation syndrome // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2016. 254. (7). 1339–1343.
29. Yildirim Z., Yildirim F., Uçgun N.I., Sepici-Dinçel A. The role of the cytokines in the pathogenesis of pseudoexfoliation syndrome // *Int. J. Ophthalmol.* 2013. 6. (1). 50–53.
30. Zenkel M., Lewczuk P., Jünemann A. et al. Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma // *Am. J. Pathol.* 2010. 176. (6). 2868–2879.

INFLUENCE OF PRIMARY POSTERIOR CAPSULOUREXIS ON THE ACTIVITY OF LOCAL INFLAMMATORY PROCESS AT FACOEMULSIFICATION OF COMPLICATED CATARACT ON THE BACKGROUND OF THE PSEUDOEXPHOLIATION SYNDROME

Elena Vladilenovna EGOROVA¹, Olga Olegovna OBUKHOVA²,
Olga Mikhaylovna GORBENKO², Alya Petrovna SHVAYUK²,
Valeriy Vyacheslavovich CHERNYKH¹, Aleksandr Nikolaevich TRUNOV^{1,2}

¹ The S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex of Minzdrav of Russia, Novosibirsk branch
630071, Novosibirsk, Kolkhidskaya str., 10

² Research Institute of Experimental and Clinical Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

Purpose: to study the activity of the local inflammatory process in patients with complicated cataracts with pseudoexfoliation syndrome before and after phacoemulsification with the primary posterior capsulorhexis. 54 patients (54 eyes) aged 50 to 92 years (76 ± 7.43) appealed for surgical treatment of complicated cataracts with pseudoexfoliation syndrome were examined. The concentration of IL-6, IL-10, MMP-9, TGF- β 1 was determined in the tear fluid of patients before and on the 5th day of the postoperative period. It was established that the activity of local inflammatory process (high concentrations of IL-6 and MMP-9) is determined in patients with complicated cataracts with pseudoexfoliation syndrome. The identified increase in TGF-1 concentrations is a significant factor in the formation of the pseudoexfoliation material. It has been established that the use of a modified surgical technique in patients with pseudoexfoliation syndrome does not lead to activation of the local inflammation process

Key words: complicated cataract, pseudoexfoliation syndrome, posterior capsulorhexis, inflammation, cytokines.

Egorova E.V. – candidate of medical sciences, deputy director for medical work, e-mail: e.egorova@mntk.nsk.ru

Obukhova O.O. – doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory of immunology,
e-mail: olga.o.obukhova@gmail.com

Gorbenko O.M. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of immunology,
e-mail: gorbenko1956@yandex.ru

Shvayuk A.P. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of immunology,
e-mail: alevtina.shvayuk@yandex.ru

Chernykh V.V. – doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: rimma@mntk.nsk.ru

Trunov A.N. – doctor of medical sciences, professor, deputy director for science work,
head of the laboratory of immunology, e-mail: trunov1963@yandex.ru

НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ГОЛОВОКРУЖЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Сергей Юрьевич ЛАВРИК¹, Алексей Сергеевич БОРИСОВ²,
Владимир Викторович ШПРАХ¹

¹Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России
664049, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100

²Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России
664003 г. Иркутск, б-р Гагарина, 18

Проведен анализ современных данных литературы относительно ведущих причин и механизмов развития вестибулярного головокружения у неврологических пациентов. Изложена методология клинического и аппаратного исследования спонтанного и вызванного нистагма, дифференциально-диагностические признаки заболеваний внутреннего уха и ведущих неврологических синдромов поражения и раздражения вестибулярной системы. Отражены клинические особенности у пациентов с психогенным головокружением и постуральной неустойчивостью, показана необходимость углубленного анализа у них фармакологического взаимодействия принимаемых лекарственных препаратов с учетом возможных нежелательных эффектов проводимой терапии. По данным большинства исследователей, среди неврологических причин центрального вестибулярного головокружения преобладают острые и хронические цереброваскулярные заболевания, сопоставимые по частоте встречаемости с вестибулярной мигренью. Среди новообразований наиболее часто к головокружению приводит невринома вестибулокохлеарного нерва, при этом настороженность в отношении объемного образования головного мозга также необходима при мозжечковой либо стволовой локализации процесса. Показана целесообразность проведения скринингового отоневрологического обследования и видеонистагмографии в дифференциальной диагностике различных типов головокружения. В обзоре представлены современные методы лечения и реабилитации таких пациентов, их высокая эффективность и безопасность. Подчеркивается роль вестибулярной гимнастики, а также применение тренажеров, основанных на принципах биологической обратной связи.

Ключевые слова: головокружение, постуральная неустойчивость, отоневрология.

Сложность диагностики головокружения обусловлена многообразием его причин и клинических проявлений, а также трудностью трактовки и большим количеством определений термина «головокружение». Как известно, в контроле равновесия принимают участие вестибулярная система, мозжечок и его связи, проприорецепция и зрительный контроль. В связи с этим головокружение является одной из наиболее частых жалоб в практике неврологов и врачей других специальностей, имея отчетливую тенденцию к росту в старшей возрастной группе [11, 15, 17, 28, 30, 37]. По данным различных авторов, головокружение является причиной обращения к врачу общей практики и неврологу в 5–20 % случаев и

одним из самых частых поводов для экстренной госпитализации [1, 3, 5, 7, 13, 18]. В нашей стране пациенты с головокружением традиционно обращаются за помощью к неврологу или, несколько реже, к оториноларингологу. Значительные сложности в диагностике головокружения привели к появлению междисциплинарной специальности «отоневрология».

Среди наиболее распространенных диагнозов в неврологической практике при головокружении у лиц среднего возраста выступает синдром позвоночной артерии, а у пожилых людей – дисциркуляторная энцефалопатия. При этом крупнейшие исследования указывают на то, что наиболее частыми причинами головокружения являются

Лаврик С.Ю. – д.м.н., доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, врач функциональной диагностики, e-mail: slavrick@gmail.com

Борисов А.С. – врач-невролог

Шпрах В.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, директор

заболевания периферического вестибулярного анализатора, а на первый план среди неврологических заболеваний выходит вестибулярная мигрень. Очень часто остаются недиагностированными психогенные варианты головокружения [6, 8, 9, 14, 17, 23, 27, 29]. Различают четыре основных типа головокружения: системное, нарушение равновесия и походки (постуральная неустойчивость), ощущение дурноты и приближающейся потери сознания, а также психогенное головокружение [14, 17]. Системное головокружение – это ощущение мнимого вращения или движения (кружения, падения или раскачивания) окружающих предметов или самого пациента в пространстве. Остальные три типа нередко описывают одним термином – несистемное головокружение, хотя их детализация имеет большое значение для установления диагноза [9, 14, 27].

Системное головокружение всегда обуславливается раздражением или повреждением вестибулярной системы либо отделов головного мозга, имеющих с ней тесную взаимосвязь (ствол мозга или мозжечок). Наряду с атаксией такое головокружение сопровождается вегетативными симптомами (потливость, симпатическая активация), нистагмом и психоэмоциональными проявлениями, часто усиливается (или появляется) при изменении положения головы [4, 11, 17, 27, 41]. Рецидивирующее изолированное вестибулярное головокружение (без симптомов поражения ствола головного мозга или мозжечка) чаще вызывается доброкачественным позиционным пароксизмальным головокружением (ДППГ). В данном случае невролог может установить правильный диагноз и провести лечебный маневр. Однако статистический учет согласно МКБ-10 относит ДППГ к заболеванию ЛОР-органов, и ведением такого пациента занимается оториноларинголог [1, 2].

Нарушения равновесия и походки чаще возникают вследствие неврологической либо ортопедической патологии. Особенностью такого «головокружения» является его усиление в положении стоя и при ходьбе и ослабление в положении сидя или лежа [14, 27, 30]. Данный тип головокружения нередко сопровождается очаговыми неврологическими симптомами, может быть следствием нежелательных лекарственных явлений принимаемых пациентом препаратов. Ощущение дурноты и приближающейся потери сознания, как правило, представляет собой проявление терапевтической патологии (ортостатическая гипотензия, аритмии, изменение уровня сахара крови). Среди неврологических причин нередко имеет место хроническая цереброваскулярная недостаточность. Психогенное голо-

вокружение проявляется ощущениями опьяненности, дереализации и иными неопределенными субъективными ощущениями пациента. Чаще всего данный тип головокружения возникает при тревожных и депрессивных расстройствах, что требует особого внимания в связи с их широкой распространенностью [11, 16, 20, 27, 31, 32, 35]. По данным ряда авторов, именно пациенты с несистемным головокружением составляют подавляющее большинство пациентов при данной патологии [4, 28].

Следует отметить, что объединение различных подтипов невестибулярного головокружения под термином «несистемное» затрудняет диагностический поиск и порой наводит на мысль об обязательном наличии заболевания, будь то дисциркуляторная энцефалопатия, психогенные состояния и др. При этом очень часто на первый план выходят такие причины, как побочные действия лекарственных препаратов, нарушения зрения (близорукость, астигматизм и т.п.), вызывающие затруднение зрительного контроля функции равновесия [17, 33].

Диагностику типа головокружения начинают со сбора жалоб и анамнеза. Следует обратить особое внимание на перманентный либо пароксизмальный характер головокружения, установить, что именно пациент подразумевает под этим термином, попросить его наиболее полно описать свои ощущения в момент приступа и в межприступном периоде [2, 11, 17, 27]. Важное диагностическое значение несет информация о продолжительности приступа головокружения. Так, до одной минуты длится головокружение при ДППГ, при вестибулярной пароксизмии, секундные приступы могут быть при психогенных состояниях. Несколько часов продолжается приступ головокружения при транзиторной ишемической атаке, приступе болезни Меньера, вестибулярной мигрени. Несколько суток может продолжаться головокружение при значимом повреждении центральных вестибулярных структур при ишемическом инсульте. Длительно сохраняющееся (недели, месяцы) постоянное головокружение характерно для психогенных состояний, оно может отмечаться после оперативных вмешательств на головном мозге, а также указывать на грубый неврологический дефицит в постинсультном периоде [14, 17, 24, 25, 27, 30–32]. Следует отметить, что периферическое головокружение быстро достигает максимальной интенсивности, центральное же чаще развивается постепенно. Исключение составляют лишь инсульт и транзиторная ишемическая атака [30, 31].

Дифференциально-диагностическим признаком являются различные факторы, провоциру-

ющие головокружение. Усиление симптома при смене положения головы может отмечаться при ДППГ, рассеянном склерозе, лабиринтите, однако при ДППГ оно быстро прекращается в покое. Стрессовые факторы, нахождение на публике, общение с людьми может провоцировать приступы психогенного головокружения [17, 20, 29, 32]. Следует обращать внимание на сопутствующие головокружению симптомы. При неврологической причине системного головокружения в большинстве случаев можно выявить очаговое поражение ЦНС. Часто определяются атаксия, диплопия, расстройство глотания, слабость в конечностях или нарушения чувствительности. При ограниченном поражении (например, ствола мозга в области входа вестибулярного нерва или флоккулонодулярной доли мозжечка) встречается изолированное системное головокружение [30]. Сочетание головокружения и снижения слуха указывает на поражение внутреннего уха или преддверно-улиткового нерва, может встречаться при инсульте в бассейне артерии лабиринта или нижней мозжечковой артерии. Невринома преддверно-улиткового нерва может вначале проявляться только снижением слуха, головокружение присоединяется на поздних стадиях, когда развивается компрессия ствола мозга и мозжечка [30, 31].

Неврологическое обследование пациента с головокружением может выявить признаки поражения мозжечка, экстрапирамидной, соматосенсорной и других систем, вызывающих нарушение равновесия и ходьбы. В общеклинической неврологической практике большое значение имеет тщательный анализ плавного слежения глаз, саккад, вестибулоокулярного рефлекса, тестов с натуживанием, гипервентиляцией, энергичным встряхиванием головы, тестов Ромберга, Унтербергера, позиционных проб Дикса – Холлпайка и МакКлора – Пагинни [2, 4–6, 11, 27]. Проведение данной батареи тестов дает неврологу возможность оценить состояние вестибулярной системы на различных уровнях.

Важнейшее значение имеет исследование нистагма. Направление данного симптома определяется по его быстрой фазе. При поражении периферического вестибулярного аппарата нистагм горизонтальный либо горизонтально-ротаторный, направленный в сторону более активного лабиринта. Нистагм при периферическом поражении усиливается при отведении глаз в сторону быстрой фазы, более выражен при устранении фиксации взора (использование очков Френцеля) [17, 26, 30, 33]. Объективизировать проведение исследования нистагма позволяет видеонистагмография – неинвазивный метод, используемый

для исследования движений глаз с помощью очков или маски, снабженной инфракрасными видеокамерами. Объективизация торсионных движений достигается распознаванием рисунка радужки или программной ориентировки оси ординат относительно центра зрачка. Методика обследования экономит время, снижает затраты на лечение, обеспечивает надежность и объективность получаемых данных. Современные системы имеют очень высокую точность измерений (от 0,1 до 0,5 градуса), что уменьшает степень погрешности измерений. Поражение центральных отделов вестибулярного анализатора может вызвать нистагм, направленный в любую сторону. Направление нистагма при этом может меняться в зависимости от направления взора. Фиксация взора не уменьшает ни нистагм, ни головокружение [4, 30].

Среди наиболее распространенных неврологических заболеваний, приводящих к головокружению, следует отметить мигрень, опухоли мозга, острые и хронические цереброваскулярные заболевания. Например, при тромбозе задней нижней мозжечковой артерии центральное системное головокружение является для различных вариантов облигатным симптомом в структуре синдрома Валленберга – Захарченко [7, 10]. Тромбоз передней мозжечковой артерии также может приводить к развитию центрального вестибулярного головокружения, при этом в клинике будут присутствовать такие очаговые симптомы, как головокружение, парез взора, лицевой мускулатуры, ипсилатеральная тугоухость и шум в ушах, контрлатеральное снижение чувствительности, нистагм, синдром Горнера, мозжечковые симптомы. Таким образом, системное головокружение как единственное проявление инсульта в вертебро-базиллярной системе может отмечаться лишь при небольших участках поражения в области входа вестибулярного нерва в ствол мозга, а также при поражении узелка мозжечка.

Нейровестибулярное исследование играет важную роль в дифференциальной диагностике центральной и периферической вестибулопатии. Так, наличие при сохранности вестибулоокулярного рефлекса (тест Хальмаги) у больного с острым головокружением почти всегда свидетельствует о повреждении центральных отделов вестибулярного анализатора, в связи с этим показано проведение магнитно-резонансной томографии головного мозга для исключения инсульта [7, 10, 13, 18, 33, 39].

Ведение больного инсультом с головокружением проводится согласно врачебной тактике при ишемическом инсульте или кровоизлиянии в мозг. В первые 3–6 ч ишемического инсульта мо-

жет быть использован тромболизис, при геморрагическом инсульте возможно проведение оперативного вмешательства [18]. Для улучшения вестибулярной компенсации после перенесенного инсульта важна вестибулярная реабилитация. Большое значение имеет комплексный подход к реабилитационным мероприятиям, в частности, использование различных методик вестибулярной гимнастики, современных тренажеров, основанных на принципах биологической обратной связи – стабилотренинга, постурографической платформы [5, 7, 12, 21, 22]. У пациентов, перенесших инсульт, необходимо выяснить причину заболевания и на этой основе проводить пожизненную профилактику повторного инсульта и других сердечно-сосудистых заболеваний, включающую, в частности, прием антиагрегантов (антикоагулянтов), антигипертензивных препаратов и гиполипидемических средств [14, 18, 21].

При дисциркуляторной энцефалопатии пациенты нередко отмечают не головокружение, а ощущение неустойчивости, обусловленное в большинстве случаев повреждением лобно-подкорковых связей вследствие немых лакунарных инсультов или лейкоареоза [9]. При неврологическом осмотре у таких пациентов нередко выявляется рассеянная очаговая симптоматика (рефлексы орального автоматизма, анизорефлексия). Нейровестибулярное обследование при этом обычно не выявляет грубых отклонений от нормы, в некоторых случаях могут быть нарушены плавные следящие движения глаз, зрительные саккады [15, 16].

Развитие приступа острого системного головокружения не может объясняться наличием лишь хронического цереброваскулярного заболевания [9]. При развитии системного головокружения у пациента с дисциркуляторной энцефалопатией следует исключить, прежде всего, острое нарушение мозгового кровообращения, а также поражение периферической вестибулярной анализатора, в частности, ДППГ [9]. Системное головокружение как очаговый симптом может отмечаться в случае объемного образования головного мозга при локализации опухолевого процесса в мозжечке, вестибулокохлеарном нерве, в области моста и IV желудочка [19, 40]. На поздних стадиях развития процесса вследствие нарастания внутричерепной гипертензии головокружение скорее может рассматриваться как общемозговой симптом. При этом оно чаще развивается приступообразно, сопровождается тошнотой вплоть до рвоты, шумом в ушах, вегетативными расстройствами и даже снижением уровня сознания. Среди опухолей головного мозга наиболее часто к головокружению приводит невринома VIII пары

черепно-мозговых нервов, занимающая первое место среди новообразований черепных нервов [19]. Центральное системное головокружение может отмечаться у пациентов, перенесших черепно-мозговую травму, оперативное вмешательство на головном мозге, являться дебютом рассеянного склероза.

Корреляция частоты развития головокружения и проявлений мигрени была выявлена в различных эпидемиологических исследованиях второй половины 20-го века. В настоящее же время для обозначения проявлений головокружения при мигрени используются термины «вестибулярная мигрень» и «мигрень-ассоциированное головокружение» [30, 34]. При этом большинство исследователей отмечают, что мигрень – самая частая неврологическая причина повторяющихся приступов непозиционного вестибулярного головокружения. Также одним из заболеваний, при котором головокружение служит единственным или одним из основных проявлений, является базилярная мигрень [11, 23–25, 28, 35, 36]. Приступ вестибулярной мигрени может длиться до нескольких суток, но чаще продолжается несколько часов. Головокружение сопровождается характерными для мигрени симптомами: фото- и фонофобией, тошнотой и рвотой. В ряде случаев можно выявить наличие спонтанного нистагма [24, 25, 40]. В настоящее время существуют диагностические критерии достоверного диагноза «вестибулярная мигрень». К ним относится сочетание следующих признаков: наличие по анамнезу пяти и более приступов вестибулярного головокружения длительностью от 5 минут до 3 суток, наличие одного или нескольких симптомов, имеющих более чем в половине случаев приступообразного головокружения (головная боль по типу гемикрании, фотофобия, фонофобия, зрительная аура перед приступом, отсутствие других заболеваний, которые могли бы вызвать головокружение) [24, 25, 36, 40].

Имеющиеся алгоритмы диагностики головокружения позволяют повысить уровень качества медицинской помощи населению. При этом очень важно проводить полноценный сбор жалоб и анамнеза, тщательное клинико-неврологическое обследование, акцентируя внимание на существенных дифференциально-диагностических особенностях. Большое значение имеют новые методики объективизации и нейрореабилитации этих пациентов (видеонистагмография, постурография, стабилотметрия). Вестибулярная гимнастика и методики психотерапии значительно улучшают социальную адаптацию, сокращают сроки вестибулярной компенсации, препятствуя развитию психогенных осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулина О.В., Парфенов В.А. Вестибулярное головокружение в неотложной неврологии // Клиническая геронтология. 2005. 11. (8). 15–18.
2. Алексеева Н.С. Головокружение. Отоневрологические аспекты. М.: МедПресс-информ, 2014. 184 с.
3. Антикеева Н.В., Долгов А.М. Вестибулярное головокружение и атаксия в неотложной неврологии // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013. (4). 34–38.
4. Вейс Г. Головокружение // Неврология / ред. М. Самуэльс. М.: Практика, 1997. 9–120.
5. Веселаго О.В. Алгоритмы диагностики и лечения головокружения // Рус. мед. журн. 2012. 20. (10). 489–492.
6. Гусев Е.И., Никифоров А.С., Камчатнов П.Р. Неврологические симптомы, синдромы и болезни. М.: ГЭОТАР Медиа, 2014. 1038 с.
7. Замерград М.В. Головокружение при инсульте // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2015. 7. (2). 47–51.
8. Замерград М.В. Головокружение: роль сосудистых факторов // Эффектив. фармакотерапия. 2013. (45). 34–38.
9. Замерград М.В. Головокружение у пациентов с диагнозом дисциркуляторной энцефалопатии // Мед. сов. 2014. (5). 22–26.
10. Замерград М.В. Как распознать инсульт у больного с острым головокружением? // Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2016. (1). 8–12.
11. Замерград М.В., Парфенов В.А., Яхно Н.Н., Мельников О.А., Морозова С.В. Диагностика системного головокружения в амбулаторной практике // Неврол. журн. 2014. 19. (2). 23–29.
12. Замерград М.В. Пять принципов вестибулярной реабилитации // Эффектив. фармакотерапия. 2017. (1). 4–9.
13. Исакова Е.В., Романова М.В., Котов С.В. Дифференциальная диагностика симптома «головокружения» у больных с церебральным инсультом // Рус. мед. журн. 2014. 22. (16). 1200–1205.
14. Левин О.С., Штульман Д.Р. Неврология: справочник практического врача. М.: Медпресс-информ, 2013. 1016 с.
15. Неверовский Д.В. Проявления и диагностика дисциркуляторной энцефалопатии // Клиническая геронтология. 2012. 18. (11-12). 57–65.
16. Неверовский Д.В., Случевская С.Ф., Парфенов В.А. Дифференциальный диагноз дисциркуляторной энцефалопатии в амбулаторной практике // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013. (2). 38–42.
17. Парфенов В.А., Замерград М.В., Мельников О.А. Головокружение: диагностика и лечение, распространенные диагностические ошибки: учеб. пособие. М.: МИА, 2009. 152 с.
18. Парфенов В.А., Хасанова Д.Р. Ишемический инсульт. М.: МИА, 2012. 288 с.
19. Педаченко Е.Г., Скобская О.Е., Гудков В.В., Малышева А.Ю. Проблемы диагностики вестибулярных шванном // Укр. нейрохирург. журн. 2014. (1). 53–57.
20. Романова М.В., Исакова Е.В., Котов С.В. Комплексное лечение пациентов с постуральным фобическим головокружением // Альм. клин. мед. 2013. (28). 3–8.
21. Романова М.В., Исакова Е.В., Котов С.В. Реабилитация пациентов с головокружением при церебральном инсульте // Альм. клин. мед. 2012. (26). 3–8.
22. Романова М.В., Котов С.В., Исакова Е.В. Современные подходы к реабилитации пациентов с вестибулоатактическими нарушениями // Леч. врач. 2012. (6). 74.
23. Садохва К.А. Мигрень и головокружение // Неврология и нейрохирургия. Вост. Европа. 2013. (1). 71–79.
24. Табеева Г.Р., Азимова Ю.Э., Замерград М.В. Современная концепция вестибулярной мигрени (дискуссия) // Неврол. журн. 2012. 17. (2). 45–53.
25. Тардова И.М. Базилярная мигрень: клинические особенности и дифференциальный диагноз // Журн. неврологии и психиатрии. 2014. 114. (2). 4–8.
26. Тоболов И.Н., Дорофеева Е.В., Железнова М.А., Бугаев В.С., Дорощенко Н.Э., Денисов Д.П. Диагностическая видеонистагмография у пациентов с головокружением на фоне цереброваскулярных заболеваний // Кремл. мед.: Клини. вестн. 2013. (3). 25–27.
27. Штульман Д.Р. Головокружение и нарушение равновесия // Болезни нервной системы / ред. Н.Н. Яхно. М.: Медицина, 2005. 125–130.
28. Bisdorff A., Bosser G., Gueguen R., Perrin P. The epidemiology of vertigo, dizziness, and unsteadiness and its links to co-morbidities // Front. Neurol. 2013. 22. (4). ID 29.
29. Brandt T. Phobic postural vertigo // Neurology. 1996. 46. (6). 1515–1519.
30. Brandt T. Vertigo. Its multisensory syndromes. L.: Springer, 2000. 503 p.
31. Brandt T., Dieterich M. Vertigo and dizziness: common complains. L.: Springer, 2004. 208 p.
32. Bronstein A.M., Gresty M.A., Luxon L.M., Ron M.A., Rudge P., Yardley L. Phobic postural vertigo // Neurology. 1997. 49. (5). P. 1480–1481.
33. Cohn B. Can bedside oculomotor (HINTS) testing differentiate central from peripheral causes of vertigo? // Ann. Emerg. Med. 2014. 64. (3). 265–268.
34. Dieterich M. Central vestibular disorders // J. Neurol. 2007. 254. 559–568.
35. Geser R., Straumann D. Referral and final diagnoses of patients assessed in an academic vertigo center // Front. Neurol. 2012. 28. (3). 169

36. Lempert T., Olesen J., Furman J., Waterston J., Seemungal B., Carey J., Bisdorff A., Versino M., Evers S., Newman-Toker D. Vestibular migraine: Diagnostic criteria. Consensus document of the Bárány Society and the International headache society // *Nervenarzt*. 2013. 84. (4). 511–516. [In German].
37. Lo A.X., Harada C.N. Geriatric dizziness: evolving diagnostic and therapeutic approaches for the emergency department // *Clin. Geriatr. Med.* 2013. 29. (1). 181–204.
38. Passier L., Doherty D., Smith J., McPhail S.M. Vestibular rehabilitation following the removal of an acoustic neuroma: a systematic review of randomized trials // *Head Neck Oncol*. 2012. 4. (2). ID 59.
39. Saber Tehrani A.S., Kattah J.C., Mantokoudis G., Pula J.H., Nair D., Blitz A., Ying S., Hanley D.F., Zee D.S., Newman-Toker D.E. Small strokes causing severe vertigo: frequency of false-negative MRIs and nonlacunar mechanisms // *Neurology*. 2014. 83. (2). 169–173.
40. Shin J.E., Kim C.H., Park H.J. Vestibular abnormality in patients with Meniere's disease and migrainous vertigo // *Acta Otolaryngol*. 2013. 133. (2). 154–158.
41. Strupp M., Dieterich M., Brandt T. The treatment and natural course of peripheral and central vertigo // *Dtsch. Arztebl. Int.* 2013. 110. (29-30). 505–515.

NEUROLOGICAL ASPECTS OF VERTIGO DIAGNOSTICS AND TREATMENT (REVIEW)

Sergey Yurevich LAVRIK¹, Aleksey Sergeevich BORISOV²,
Vladimir Viktorovich SHPRAKH¹

¹ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of Minzdrav of Russia
664079, Irkutsk, Microdistrict Yubileyny, 100

² Clinics of Irkutsk State Medical University of Minzdrav of Russia
664003, Irkutsk, Gagarina blvd., 18

The analysis of contemporary literature data considering main reason and mechanisms of vestibular vertigo development in neurological patients has been carried out. The method of clinical and device-based investigation of spontaneous and induced nystagmus, differential-diagnostic signs of internal ear diseases, and main neurologic syndromes of vestibular system irritation and damage have been reported. The clinical peculiarities in patients with psychogenic vertigo and postural instability have been presented; the demand of deep analysis of pharmacologic interaction between the taken drugs in light of possible undesirable effects of conducted treatment has been demonstrated. According to majority of literature researches, the sharp and chronic cerebrovascular diseases matched by incidence with vestibular migraine have predominated among the neurological reasons of central vestibular vertigo. The neurinoma of vestibulocochlear nerve (among newgrowth) the most frequently leads to vertigo, however the awareness concerning brain space-occupying lesion is as well important in case of cerebellar or brainstem localization of the process. The relevance of screening otoneurologic examination and videonystagmography conduction has been demonstrated in differential diagnostics of vertigo different types. The modern effective and secure methods of the patients' treatment and rehabilitation have been reported in the review. The role of vestibular trainings, as well as the use of simulators based on biological feedback principles have been emphasized.

Key words: vertigo, postural instability, otoneurology.

Lavrik S. Yu. – doctor of medical sciences, assistant professor of the chair for neurology and neurosurgery, physician of functional diagnostics, e-mail: slavrick@gmail.com

Borisov A.S. – neurologist

Shprakh V.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for neurology and neurosurgery, director

АНАЛИЗ ОСЛОЖНЕНИЙ ТОРАКОСКОПИЧЕСКИХ ОПЕРАТИВНЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ БУЛЛЕЗНОЙ ФОРМЫ ЭМФИЗЕМЫ ЛЕГКИХ

Юрий Владимирович ЧИКИНЕВ, Евгений Александрович ДРОБЯЗГИН,
Анатолий Юрьевич ЛИТВИНЦЕВ

Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

Цель исследования: анализ осложнений, возникающих после выполнения торакоскопических методов оперативного вмешательства на органах грудной клетки пациентам со спонтанным пневмотораксом при буллезной форме эмфиземы легких. **Материал и методы.** Для исследования выбран период с января 2010 г. по декабрь 2017 г. За вышеуказанный период было отобрано 125 историй болезней пациентов, которым выполнялись торакоскопические методы оперативного лечения спонтанного пневмоторакса. Наличие у пациентов булл было доказано мультиспиральной компьютерной томографией органов грудной клетки. **Результаты и их обсуждение.** Чаще всего спонтанный пневмоторакс встречался у пациентов мужского пола среднего возраста. В подавляющем большинстве буллы определялись в верхних долях легких, чаще в правом легком. Осложнения возникли у 40 пациентов. Основным осложнением явилась длительная утечка воздуха. Для купирования этого осложнения выполнялись различные методы хирургического лечения, в отдельных случаях их комбинация. Во всех случаях длительной утечки воздуха удалось добиться положительного эффекта, выражающегося в прекращении утечки воздуха в течение двух суток, что подтверждено результатами контрольной рентгенографии органов грудной клетки. **Заключение:** необходима дальнейшая систематизация осложнений и разработка алгоритма профилактики этих осложнений.

Ключевые слова: буллезная эмфизема легких, методы лечения буллезной формы эмфиземы легких, спонтанный пневмоторакс, эндоскопические методы лечения в торакальной хирургии.

Диагностика и лечение спонтанного пневмоторакса продолжает оставаться актуальной проблемой торакальной хирургии. По данным многих авторов, он возникает у 9 человек из 100 000 в год [10, 11, 15]. Наблюдается неуклонный рост заболеваемости. Именно буллезная эмфизема легких более чем в 75 % случаев является причиной возникновения пневмоторакса, что доказывается выполнением спиральной компьютерной томографии органов грудной клетки после дренирования плевральной полости. Большинство пациентов со спонтанным пневмотораксом – мужчины трудоспособного возраста [1, 2, 10, 11].

У 50 % пациентов с буллезной эмфиземой легких возникает рецидив (чаще всего в течение первого года после дебюта заболевания), это служит показанием к операции [5, 7–9, 11, 12]. Основной задачей лечения этой категории пациентов является предупреждение рецидивов заболевания

путем хирургического удаления буллезно-измененных участков легочной ткани с обязательным выполнением плеврэктоми [13]. Плановый этап лечения заключается в выполнении различных диагностических мероприятий с целью уточнения характера изменений легочной ткани (мультиспиральная компьютерная томография органов грудной клетки) для определения необходимости и вида планового оперативного лечения [3, 4, 7]. Применяется торакоскопическое хирургическое лечение в объеме резекции булл или атипичной резекции легкого с обязательной плеврэктомией. Эти методы позволяют снизить травматичность вмешательства и сократить сроки пребывания пациентов в стационаре [2, 5, 6, 14].

Цель настоящего исследования – проанализировать частоту и характер осложнений торакоскопических вмешательств у пациентов с буллезной формой эмфиземы легких.

Чикинев Ю.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной и детской хирургии лечебного факультета, главный торакальный хирург МЗ НСО, врач-хирург отделения торакальной хирургии, e-mail: chikinev@inbox.ru
Дробязгин Е.А. – д.м.н., проф. кафедры госпитальной и детской хирургии лечебного факультета, врач-торакальный хирург, эндоскопист отделения торакальной хирургии, e-mail: evgenyidrob@inbox.ru
Литвинцев А.Ю. – аспирант кафедры госпитальной и детской хирургии, e-mail: Tolya.litvintsev@mail.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выполнено ретроспективное исследование историй болезни пациентов, находившихся на лечении в отделении торакальной хирургии Новосибирской областной клинической больницы с января 2010 г. по декабрь 2017 г. Отобрано 125 историй болезней пациентов, которым выполнялись торакаскопические методы оперативного лечения спонтанного пневмоторакса. Мужчин было 87 (69,6 %), женщин – 38 (30,4 %), средний возраст пациентов составлял $28,5 \pm 10,2$ года. У 92 пациентов имел место дебют спонтанного пневмоторакса, у 33 в анамнезе были спонтанные пневмотораксы. Давность заболевания буллезной формой эмфиземы легких у лиц с рецидивными спонтанными пневмотораксами варьировала от нескольких месяцев до нескольких лет и не превышала трех лет. Однократно пневмоторакс возникал у 21 пациента (63,6 %), двукратно – у 10 (30,4 %), три раза и более – у двух (6,0 %). Время обращения за медицинской помощью с момента возникновения пневмоторакса составляло от нескольких часов до 14 дней.

Помимо физикальных методов диагностики спонтанный пневмоторакс уточнялся инструментальными методами исследования. Проводилось рентгенографическое исследование органов грудной клетки в прямой и боковой проекциях в положении стоя. Всем пациентам после дренирования плевральной полости выполнялась мультиспиральная компьютерная томография органов грудной клетки для уточнения области локализации и размеров булл, последние составили от 2 до 80 мм. Показанием к торакаскопической операции являлась доказанная по результатам исследования буллезно-измененная легочная ткань (у 72 пациентов). В случае отсутствия буллезных изменений в легких показанием к операции служил рецидив пневмоторакса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение больных по полу и возрасту представлено в табл. 1, из которой видно, что наиболее часто спонтанный пневмоторакс встречается у пациентов среднего возраста. Буллы локализуются главным образом в правом легком, преимущественно в верхней доле, на втором месте локализация булл диагностируется в верхней доле левого легкого (табл. 2).

Длительной утечкой воздуха считался неразрешенный пневмоторакс после выполненной торакаскопической операции в течение 5 дней и более. Таких пациентов выявлено 39, всем им был установлен клапанный бронхоблокатор в

Таблица 1

Распределение пациентов по возрасту и полу

Возраст, лет	Мужчины		Женщины		Всего	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
17–20	5	5,74	0	0	5	4,00
21–30	62	71,26	20	52,63	82	65,60
31–40	20	22,90	18	47,14	38	30,40
41–50	0	0	0	0	0	0
61–70	2	2,29	0	0	2	1,60
Всего	87	69,60	38	30,40	125	100,00

Таблица 2

Характеристика пациентов по локализации буллезных изменений легочной ткани

Локализация буллезных изменений		<i>n</i>	%	
Правое легкое	Верхняя доля	S 1	27	21,6
		S 1–2	60	48,0
		S 3	1	0,8
Левое легкое	Верхняя доля	S 1–2	18	14,4
		S 1–2+3	1	0,8

долевой бронх. В результате у 28 (71,7 %) больных с длительной утечкой воздуха достигнута положительная динамика, в 9 (23,0 %) случаях бронхоблокация оказалась неэффективной. Осложнение купировалось повторной установкой бронхоблокатора аналогичного диаметра в тот же долевой бронх с положительным эффектом в четырех случаях. В оставшихся пяти случаях выполнялось торакотомическое вмешательство для купирования длительного сброса воздуха. Эффективность выражалась в уменьшении сброса воздуха по дренажам в течение первых суток и полном прекращении сброса на вторые сутки после вмешательства. У всех 39 пациентов легкое полностью расправилось, что доказано результатами контрольной рентгенографии органов грудной клетки, выполненной на вторые сутки после вмешательства. Дренаж из плевральной полости у этих пациентов удален на $3,0 \pm 1,2$ суток после установки блокатора и на $6,0 \pm 4,0$ суток после торакотомии. Повторная госпитализация выполнялась в сроки от 2 до 3 месяцев с момента выписки из стационара в удовлетворительном состоянии для удаления блокатора. Осложнений при удалении не выявлено. Общая продолжительность пребывания этих 39 пациентов в стационаре составляла $20,0 \pm 4,0$ койкодня.

У одного пациента выявлено нагноение мягких тканей по ходу стояния дренажной трубки и кровотечение в раннем послеоперационном пе-

риоде в объеме 50 мл. Данное осложнение имело место на фоне кахексии в результате паранеопластического синдрома при злокачественной невриноме L5, S1. Длительность его пребывания в стационаре составляла 20 койкодней.

ВЫВОДЫ

1. Чаще всего спонтанный пневмоторакс встречается у пациентов среднего возраста.
2. Рецидив заболевания возникает в первые 3–4 месяца от дебюта заболевания.
3. Преимущественно буллы локализуются в верхней части правого легкого, немногим реже в верхней доле левого легкого.
4. Основным осложнением у пациентов с буллезной эмфиземой легких является длительная утечка воздуха.
5. Необходима дальнейшая систематизация осложнений и разработка алгоритма их профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грубник В.В., Шипулин П.П., Мартынюк В.А., Байдан В.В., Кирилюк А.А. Возможности совершенствования видеоторакоскопических операций по поводу спонтанного пневмоторакса // Клінічна хірургія. 2012. (6). 30–32.
2. Дробязгин Е.А., Чикинев Ю.В., Пионтковская К.А., Пустоветова М.Г., Аникина М.С. Использование клапанной бронхоблокации при осложнениях торакоскопических вмешательств у пациентов с буллезной эмфиземой легких // Медицина и образование в Сибири. 2015. (4). 22.
3. Левин А.В., Зимонин П.Е., Цеймах Е.А., Аскалонова О.Ю., Краснов Д.В., Склюев С.В., Петрова Я.К., Зимонина Н.А. Применение эндобронхиальных клапанов в комплексном лечении больных ограниченным фиброзно-кавернозным туберкулезом // Пробл. клин. медицины. 2013. (2). 60–64.
4. Ловачева О.В., Шуйская И.Ю., Туровцева Ю.В., Васильева И.А., Багдасарян Т.Р., Эргешов А.Э. Новые возможности нехирургического лечения больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких // Туберкулез и болезни легких. 2013. (4). 12–18.

5. Bintcliffe O., Maskell N. Spontaneous pneumothorax // Br. Med. J. 2014. 348. g2928.
6. Chaturvedi A., Lee S., Kliensky N., Chaturvedi A. Demystifying the persistent pneumothorax: role of imaging // Insights Imaging. 2016. 7. (3). 411–429.
7. Huang Y., Huang H., Qiang Li, Robert F. Browning, Parrish S., J. Francis Turner Jr, Zarogoulidis K., Kougioumtzi I., Dryllis G., Kioumis I., Pitsiou G., Machairiotis N., Katsikogiannis N., Courcoutsakis N., Madesis A., Diplaris K., Karaiskos T., Zarogoulidis P. Approach of the treatment for pneumothorax // J. Thorac. Dis. 2014. (6, Suppl. 4). 416–420.
8. Kaneda H., Nakano T., Taniguchi Y., Saito T., Konobu T., Saito Y. Three-step management of pneumothorax: time for a re-think on initial management // Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg. 2013. 16. (2). 186–192.
9. Lorkowski J., Teul I., Hladki W., Kotela I. The evaluation of procedure and treatment outcome in patients with tension Pneumothorax // Ann. Acad. Med. Stetin. 2014. 60. (1). 10–15.
10. Parrish S., Browning R.F., Turner J.F., Zarogoulidis K., Kougioumtzi I., Dryllis G., Kioumis I., Pitsiou G., Machairiotis N., Katsikogiannis N., Tsiouda T., Madesis A., Karaiskos T., Zarogoulidis P. The role for medical thoracoscopy in pneumothorax // J. Thorac. Dis. 2014. (6, Suppl. 4). 383–391.
11. Pagès P.B., Delpy J.P., Falcoz P.E., Thomas P.A., Filaire M. Epithor Project (French Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery). Videothoracoscopy versus thoracotomy for the treatment of spontaneous pneumothorax: a propensity score analysis // Ann. Thorac. Surg. 2015. 99. (1). 258–263.
12. Rena O., Papalia E., Turello D., Massera F., Roncon A., Baietto G., Casadio C. Thoracoscopic water pleurectomy in pneumothorax: some concerns // Ann. Thorac. Surg. 2014. 98. (6). 2273–2274.
13. Ruiz Izquierdo J., Lázaro J.R., Prieto I.G. Hydropneumothorax in a patient with bullous emphysema // Arch. Bronconeumol. 2014. 50. (5). 204.
14. Slade M. Management of pneumothorax and prolonged air leak // Semin. Respir. Crit. Care Med. 2014. 35. (6). 706–714.
15. Subotic D., van Schil P. Spontaneous pneumothorax: remaining controversies // Minerva Chir. 2011. 66. (4). 347–360.

COMPLICATIONS OF SURGICAL THORACOSCOPIC METHODS OF BULLOUS EMPHYSEMA TREATMENT

**Yuriy Vladimirovich CHIKINEV, Evgeniy Alexandrovich DROBYAZGIN,
Anatoliy Yuryevich LITVINTSEV**

*Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

The objective of research: analysis of complications after performing thoracoscopic techniques of surgery procedure in patients with spontaneous pneumothorax with bullous emphysema. **Material and methods.** 125 medical histories of patients with performance of thoracoscopic techniques of spontaneous pneumothorax surgery (from January 2010 to December 2017) were selected to research. Bullous presence in patients was proved by multispiral computed tomography of thoracic organs. **Results and discussion.** Spontaneous pneumothorax was found mostly in middle-aged male patients. In the vast majority of medical histories the bullous were determined in the upper lobes of lungs, oftener in the right lung. Complications arose in 40 patients. The main complication was the prolonged air leakage. Various techniques and combinations of surgical treatment were performed to reverse this complication. It was possible to achieve positive effect in all cases of prolonged air leakage. The air leakage was stopped within 2 days, that was confirmed by the control X-ray thoracic organs monitoring. **Conclusion.** The complications further classifying and prevention algorithm development are essential.

Key words: bullous emphysema, methods of treatment of bullous emphysema, spontaneous pneumothorax, endoscopic treatment in thoracic surgery.

*Chikinev Yu.V. – doctor of medical sciences, professor, head of hospital and children's surgery chair,
e-mail: chikinev@inbox.ru*

*Drobyazgin E.A. – doctor of medical sciences, associate professor of hospital and children's surgery chair,
e-mail: evgenyidrob@inbox.ru*

Litvintsev A.Yu. – postgraduate student of hospital and children's surgery chair, e-mail: Tolya.litvintsev@mail.ru

ЛЕЧЕНИЕ РЕГМАТОГЕННОЙ ОТСЛОЙКИ СЕТЧАТКИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Олег Львович ФАБРИКАНТОВ^{1,2}, Дмитрий Александрович КОНЯЕВ¹,
Руслан Эседуллаевич ОСМАНОВ¹

¹ МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Минздрава России,
Тамбовский филиал
392000, г. Тамбов, Рассказовское шоссе, 1

² Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 93

Обобщены результаты исследований, освещающие вопросы патогенеза, лечения и профилактики пролиферативной витреоретинопатии (ПВР). Регматогенная отслойка сетчатки является одним из наиболее тяжелых офтальмологических заболеваний, которое часто приводит к значительному снижению зрительных функций, утрате трудоспособности и, при отсутствии лечения, – к необратимой слепоте. Многие исследования доказали, что функциональный результат после операции зависит от ряда факторов и в том числе от степени тяжести ПВР. ПВР представляет собой обширный спектр витреоретинопатии, сопровождающейся процессами патологического мембранообразования на поверхности сетчатки и в стекловидном теле, которые приводят в конечном итоге к необратимым и неоперабельным изменениям. В настоящее время самым эффективным методом лечения ПВР считают хирургический, хирургическая тактика различна на разных стадиях процесса. Диагностика ПВР на ранних стадиях проблематична, и заболевание диагностируется уже в момент обнаружения сформировавшихся эпи- и/или субретинальных пролиферативных мембран. В настоящее время нет критериев оценки вероятности развития и прогрессирования ПВР после хирургического лечения. Несмотря на современные достижения изучения этиологии и патогенеза ПВР, усовершенствование хирургических технологий лечения регматогенной отслойки сетчатки, проблема профилактики и лечения пролиферативного процесса остается на сегодняшнее время актуальной и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: офтальмология, регматогенная отслойка сетчатки, пролиферативная витреоретинопатия.

Регматогенная отслойка сетчатки (РОС) – это отслоение нейросенсорной сетчатки от подлежащего пигментного эпителия, вызванное сквозным разрывом сетчатки и накоплением субретинальной жидкости между данными слоями [9]. РОС является одним из наиболее тяжелых офтальмологических заболеваний, которое часто приводит к значительному снижению зрительных функций, утрате трудоспособности, а при отсутствии лечения – к необратимой слепоте [14, 19]. Достоверную информацию о заболеваемости и распространенности РОС найти трудно вследствие высокой мобильности сегодняшнего населения. По данным разных авторов, РОС в общей популяции составляет 10–15 случаев на 100 000 населения [7, 12, 31]. В структуре первичной инвалидности по зрению РОС занимает одно из лидирующих

мест и ежегодно составляет 2–9 % [13, 16, 26, 27]. Около 60–75 % пациентов с РОС являются лицами трудоспособного возраста [15, 24].

Основными видами хирургического лечения РОС служат эписклеральные, эндовитреальные и комбинированные (эписклеральные + эндовитреальные) вмешательства. Многие авторы отмечают, что с внедрением витреоретинопатии хирургии при осложненной РОС уровень стойкого анатомического результата после оперативного лечения повысился с 60 до 90 % и более [11]. Однако функциональные результаты операции часто не соответствуют успешному анатомическому результату и оставляют желать лучшего [6, 18]. Многие исследования доказали, что функциональный результат после операции зависит от ряда факторов: длительности существования

Фабрикантов О.Л. – д.м.н, директор, зав. кафедрой офтальмологии, e-mail: naukatmb@mail.ru

Коняев Д.А. – врач-офтальмолог, e-mail: naukatmb@mail.ru

Османов Р.Э. – врач-офтальмолог, e-mail: naukatmb@mail.ru

отслойки сетчатки, ее площади, степени миопии, количества и размеров разрывов, наличия сопутствующей глазной (катаракта, глаукома, диабетическая ретинопатия и др.) и внеглазной (сахарный диабет, атеросклероз сосудов и т.д.) патологии, а также степени тяжести пролиферативной витреоретинопатии (ПВР) [10, 15, 18]. Несмотря на значительные успехи в изучении этиологии и патогенеза, достижениях хирургического лечения РОС, ПВР является основной причиной неприлегания сетчатки и развития рецидивов ее отслойки и составляет от 3 до 64 % [5, 17]. ПВР встречается в 10–15 % случаев из числа всех РОС [3, 7].

ПВР представляет собой обширный спектр витреоретинальной патологии, сопровождающейся процессами патологического мембранообразования на поверхности сетчатки и в стекловидном теле (СТ), который приводит в конечном итоге к необратимым и неоперабельным изменениям. Факторами риска для ПВР являются молодой возраст, отслойка сетчатки площадью больше двух квадрантов, общая площадь разрыва более трех диаметров диска зрительного нерва, длительно существующая отслойка сетчатки (более 21 дня), сопутствующая отслойка хориоидеи, кровоизлиянии в СТ, использование для тампонады витреальной полости гексафторида серы (SF₆) и силиконового масла, чрезмерная криотерапия, диатермо- или лазеркоагуляция, повторное хирургическое вмешательство, наличие признаков увеита [2, 7, 10, 16]. Большое внимание уделяется определению генов-кандидатов, связанных с увеличением риска развития ПВР: локус фактора некроза опухоли бета в гене лимфотоксина альфа, полиморфизм аллеля T гена *TGF-β1*, полиморфизм в 72 кодоне белка p53 (rs1042522), стимулирующего клеточный апоптоз [32–34]. ПВР ведет к образованию новых разрывов сетчатки, разблокированию старых разрывов и возникновению эпиретинальных и субретинальных мембран и тяжелей, препятствующих в дальнейшем ее полному расправлению.

ПВР, ключевым фактором развития которой является воспалительная реакция, представляет собой сложный циклический процесс, проявляющийся клеточной пролиферацией с последующим отложением коллагена и его контракцией; пролиферацию клеток стимулируют ростовые факторы и медиаторы воспаления [21]. На начальных этапах, как правило при отслойке СТ и повреждении внутренней пограничной мембраны, происходит миграция глиальных клеток в периретинальное пространство. Моноциты мигрируют в СТ при субклинических воспалениях цилиарного тела. В большом количестве обнаруживаются данные клеточные элементы при параспланитах и хорио-

ретинитах. Одну из ведущих ролей в развитии ПВР играют клетки пигментного эпителия сетчатки, которые мигрируют через разрыв сетчатки. В СТ все вышеназванные клетки проходят путь дифференцировки и трансформации в близкий к фибробластному или мезенхимальному типу.

При развитии отслоения сетчатки теряется связь с хориоидеей, основным поставщиком кислорода, и развивается ацидоз. Из-за гипоксии сетчатки увеличивается проницаемость гематоретинального барьера, что приводит к просачиванию в СТ клеток крови (эритроцитов, тромбоцитов), способствующих нарушению увеосклерального барьера, в результате происходит массовый приток провоспалительных клеток, выделение факторов роста, митогенов, фибронектинов, хемокинов, медиаторов воспаления (IL-1, IL-6, и IL-8, TNF, IFN) [8, 21, 22]. Возникает замкнутый круг, поддерживается избыточный репаративный процесс. Репарация сопровождается пролиферацией клеток и образованием мембран на поверхности сетчатки. Нарушение гематоофтальмологического барьера приводит к расстройству интраокулярных иммуносупрессивных механизмов, в результате чего иммунокомпетентные клетки вступают в контакт с аутоантигенами, что приводит к аутоиммунному воспалению. Клетки синтезируют матрикс, а через 2 недели от начала развития ПВР у них появляется сократительная активность. Формируются фиксированные складки отслоенной сетчатки с выраженным ее укорочением, что приводит к разрывам отслоенной сетчатки и стойкой потере зрения.

В момент нарушения целостности сетчатки из фосфолипидов клеточных мембран под действием фосфолипазы A₂ отщепляется арахидоновая кислота, которая окисляется циклооксигеназой (ЦОГ) с образованием простагландина H₂. Существует две изоформы фермента: конститутивная ЦОГ-1 и индуцибельная (провоспалительная) ЦОГ-2. В глазу обе изоформы экспрессируются постоянно. При повреждении глаза и воспалении экспрессия ЦОГ-2 возрастает в несколько раз. Далее происходит увеличение проницаемости сосудов и выход провоспалительных клеток крови в преретинальное пространство. Клетки начинают синтезировать цитокины и факторы роста, что, с одной стороны, приводит к еще большему увеличению проницаемости сосудов, а с другой – стимулирует пролиферацию клеток пигментного эпителия сетчатки, глиальных и иммунных клеток на поверхности сетчатки и СТ [21, 22].

Согласно современным представлениям, особое значение в прогрессировании данного процесса принадлежит ростовым факторам. Большой интерес представляют активаторы ан-

гиогенеза – сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF), имеющие общего предшественника и много общего в своей структуре [23]. VEGF стимулирует эндотелиальные клетки сосудов к миграции и пролиферации, способствует увеличению проницаемости эндотелиоцитов, усиливает хемотаксис клеток пигментного эпителия, стимулирует рост новообразованных сосудов. В норме VEGF экспрессируется в конъюнктиве, цилиарном теле, пигментном эпителии, хрусталике, хориоиде, сетчатке. В эндотелии ретинальных и хориоидальных сосудов, глиальных клетках сетчатки, клетках эндотелия роговицы обнаружены рецепторы к данному фактору роста. При состоянии гипоксии увеличивается синтез VEGF эндотелиальными клетками, пигментного эпителия, перицитами, гладкомышечными клетками сосудов. VEGF можно рассматривать как провоспалительный цитокин, так как он обеспечивает первый этап воспаления, создавая молекулярную связь между эндотелиальными клетками и лейкоцитами. VEGF оказывает сильное воздействие на хемотаксис пигментного эпителия, но слабое митогенное действие на эти клетки, стимулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, активирует образование коллагеназы, увеличивает проницаемость сосудистой стенки. Во многих исследованиях выявлено увеличение уровня VEGF в субретинальной жидкости, мембранах и СТ у больных ПБВ, что свидетельствует о значительной роли этого фактора роста в патогенезе ПБВ [1].

PEDF (pigment epithelium-derived factor) – ингибитор ангиогенеза, выделенный из клеток пигментного эпителия. Этот фактор экспрессируется многими тканями организма, в том числе эпителием роговицы, ганглиозными клетками сетчатки, эпителием цилиарного тела, клетками Мюллера, пигментного эпителия. PEDF активно ингибирует размножение и миграцию клеток сосудистого эндотелия. С возрастом синтез PEDF снижается. Рецепторы данного фактора в настоящий момент не обнаружены. Воздействие PEDF на сетчатку зависит от содержания кислорода, т.е. при снижении концентрации O_2 PEDF способствует образованию сосудов, а при повышении – подавляет ангиогенез. Клинические исследования пациентов с миопией высокой степени и дистрофическими заболеваниями глаза показали, что предположительно вследствие гибели клеток пигментного эпителия и ганглиозных клеток происходит снижение экспрессии PEDF [1].

PEDF тесно связан с VEGF. Нарушение баланса между этими факторами и является причиной развития ПБВ. Отсутствие неоваскуляризации

при ПБВ можно объяснить преобладанием PEDF при данной патологии в сравнении с более высоким содержанием VEGF в СТ и субретинальной жидкости при диабетической ретинопатии. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) стимулирует миграцию и пролиферацию большинства клеток, принимающих участие в витреоретинальном пролиферативном процессе. Различают несколько изоформ PDGF (AA, AB, BB, CC, DD), в основном продуцируемых тромбоцитами. Однако изоформа AA экспрессируется также остеобластами, гладкомышечными клетками сосудов, фибробластами, астроцитами, а изоформа BB – эндотелием сосудов, клетками Лангерганса, макрофагами. Клетки пигментного эпителия, глиальные клетки, нейроны способны синтезировать обе цепи – А и В. Все изоформы специфично и избирательно связываются с рецепторами тирозинкиназы и через них оказывают свое воздействие. Эти рецепторы экспрессируются в эпителии хрусталика, клетках пигментного эпителия (ПЭ), фибробластах, клетках олигодендроглии, моноцитах, перицитах, демиелинизирующих шванновских клетках [1].

Экспрессия PDGF увеличивается при нарушении баланса в результате воспаления, ишемии, гипоксии, гипертромбинемии, повышении уровня эстрогенов. С возрастом секреция этого фактора роста снижается. На животных было изучено влияние PDGF на развитие ПБВ. Альфа-рецептор PDGF выявлен на уровне эпиретинальных мембран, стимулирует хемотаксис и пролиферацию большинства клеток, участвующих в каскаде реакций, ведущих к ПБВ. PDGF способствует морфологическому изменению клеток пигментного эпителия, потенцирует воздействие этих клеток на коллаген СТ, вызывая его контракцию. Во многих работах выявлена связь между повышением продукции PDGF и развитием ПБВ в послеоперационном периоде. Доказано, что развитие ПБВ зависит не от изоформ PDGF, а от наличия рецепторов к фактору в стекловидном теле, в основном альфа-рецепторов. Также неравнозначно влияние различных изоформ PDGF. Исследователи выделяют большую роль в развитии ПБВ изоформе AA, так как именно она была обнаружена в эпиретинальных мембранах [1]. Также анализ глаз с ПБВ показал, что в них содержится фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор роста соединительной ткани (CTGF) [30]. Концентрация CTGF в мембранах возрастает с развитием заболевания. Интересно, что на ранних стадиях ПБВ CTGF экспрессируется клетками пигментного эпителия сетчатки, а на поздних стадиях заболевания – глиальными клетками. HGF экспрессируется обоими типами клеток в промежуточных стадиях развития болезни.

Нередко к развитию ПВР ведут аутоиммунные системные заболевания (серповидно-клеточная анемия, саркоидоз, лейкопения и т.д.) и наркотическая зависимость [10]. Среди факторов иммунной системы в патогенезе ПВР принимают участие иммуноглобулины, компоненты компонента, а также молекулы клеточной адгезии CD11a, CD11c, CD18, ICAM-1, LFA-1, которые обеспечивают взаимодействие лейкоцитов с другими клетками и экстрацеллюлярным матриксом.

Таким образом, можно сделать вывод, что есть факторы, последовательно сменяющие друг друга в глазу, что обеспечивает изменение клинической картины заболевания, а есть такие факторы, которые способствуют развитию именно ПВР.

Ретинальное общество США предложило в 1983 году клиническую классификацию ПВР, в соответствии с которой выделяются 4 стадии ПВР [25]. Деление на стадии определяется по состоянию сетчатки и СТ:

– стадия А – минимальные проявления ПВР; сетчатка отслоена, при биомикроскопии определяются частицы пигмента в СТ, на сетчатке нет фиксированных складок;

– стадия В – умеренная ПВР; на сетчатке имеется складчатость, сосуды на складках извитые, края разрывов завернуты;

– стадия С – выраженная ПВР; характеризуется наличием фиксированных складок и делится на 3 подстадии:

- С-1 – фиксированные складки распространяются в пределах трехчасовых меридианов (1/4 окружности),

- С-2 – фиксированные складки распространяются на шесть часовых меридианов (1/2 окружности),

- С-3 – фиксированные складки сетчатки в меридианах 9 часов (3/4 окружности),

– стадия D, или массивная ПВР; фиксированные складки сетчатки распространяются на все 4 квадранта.

Однако данная классификация учитывает только изменения в заднем отделе глазного яблока, но очень часто ПВР наблюдается и в передних отделах СТ. Передняя ПВР развивается на крайней периферии сетчатки в области основания СТ в виде круговой мембраны, которая, начинаясь от цилиарного тела и задней поверхности радужки, прикрепляется к сетчатке позади зубчатой линии. Эта мембрана образуется в результате пролиферативного роста клеток, осевших на базисе СТ и задних зональных волокнах хрусталика. Сокращаясь в результате фиброза, мембрана начинает подтягивать сетчатку вперед. В силу этих

тракций формируется круговая складка преэквадориальной сетчатки [25]. В 1991 г. R. Machemer и соавт. была предложена классификация ПВР, которая учитывала все достижения витреоретинальной хирургии, особенности анатомического строения СТ и последние данные о патогенезе этого процесса [33]:

– А – наличие гранул пигмента в СТ, локализующихся преимущественно в нижних отделах;

– В – сморщивание внутренних слоев сетчатки, заворачивание краев разрыва сетчатки, увеличение сосудистой извитости, снижение подвижности сетчатки и СТ;

– С – наличие фиксированных складок сетчатки:

- С задняя (С posterior, СР):

- СР – I тип (фокальный тип), звездчатая складка позади основания СТ;

- СР – II тип (диффузный тип), множественные звездчатые складки позади основания СТ, окружающие диск зрительного нерва;

- СР – III тип (субретинальный тип), пролиферация под сетчаткой в виде «кольца салфетки» вокруг диска зрительного нерва, в виде участков «бельевой веревки», или «изъеденных молью» пластинок;

- С передняя (С anterior, СА):

- СА – IV тип (круговой тип) – контракция вдоль заднего края основания СТ, сетчатка натягивается к центру, формируя радиальные складки;

- СА – V тип (переднее смещение) – основание СТ натянуто кпереди, периферическая часть сетчатки вогнута в виде желоба, цилиарные отростки покрыты мембраной или растянуты, радужка оттянута кзади, гипотония.

В настоящее время самым эффективным методом лечения ПВР считают хирургический. Хирургическая тактика при ПВР различна в разной стадии процесса. При стадии «А» можно провести либо пневморетинопексию, либо эписклеральное пломбирование, в зависимости от величины, расположения разрыва и опыта хирурга. В стадии «В» возможно эписклеральное пломбирование, при наличии прозрачных оптических сред [31]. Все остальные стадии требуют, как правило, эндовитреального или комбинированного вмешательства. Хирургическое лечение РОС, осложненной тяжелой ПВР, является сложной задачей, но современное развитие витреоретинальной хирургии позволило расширить показания к лечению, в том числе считавшиеся ранее неоперабельными [9]. Современные подходы к лечению РОС, осложненной выраженной ПВР, заключаются в выполнении витректомии, удале-

нии преретинальной и субретинальной пролиферативной ткани, релаксирующей ретиномии, эндолазеркоагуляции с последующей газовой или силиконовой тампонадой [19].

Отслойки сетчатки, осложненные выраженной ПВР, часто требуют использования ретиномии и ретинэктомии, что позволяет мобилизовать сетчатку и добиться ее анатомического прилегания. Однако, несмотря на положительные стороны ретиномии и ретинэктомии, в ряде случаев само вмешательство провоцирует прогрессирование передней ПВР. Развитие и прогрессирование пролиферативного процесса после ретиномии приводит к отслойке цилиарного тела и, как следствие, к стойкой гипотонии глаза как в случаях нахождения силиконового масла в полости глаза, так и в некоторых случаях после его удаления, что, в конечном итоге, ведет к субатрофии глаза. Одним из дополнительных средств комплексного хирургического лечения тяжелых отслоек сетчатки с использованием круговой ретиномии и ретинэктомии для профилактики репролиферации – основной причины рецидивов отслойки сетчатки – может быть применение техники малых разрезов с использованием инструментов калибра 25 и 27 Ga [8].

Однако попытки добиться прилегания сетчатки и предотвратить рецидивы при помощи стандартных методов хирургии далеко не всегда дают положительный эффект. Основной задачей витрэктомии является максимальное удаление СТ в труднодоступных зонах передних отделов (в области цилиарного тела, зубчатой линии) [7, 25]. Эта задача достигается с помощью удаления хрусталика (факоэмульсификация), разработки различных инструментов (активная ирригационная и аспирационная канюля, имеющие разнообразные изгибы, с трубчатым наконечником), использования склеральной компрессии, в том числе с волоконным осветителем [25].

Многими авторами подтверждается важность и необходимость полного удаления задних кортикальных слоев СТ. Данная задача решается с помощью использования разнообразных красящих веществ: триамцинолона ацетонид, трипановый синий и его коммерческая версия «membrane blue 0,15 %», флуоресцеин (0,1 %), индоцианин зеленый, витреоконтраст, а также использование активной аспирации, скреперов [8, 25]. Получены положительные результаты использования химического витреолизиса (гемазы, «Vitrenal») [2, 24].

Диагностика ПВР на ранних стадиях заболевания проблематична, и заболевание диагностируется уже в момент обнаружения сфор-

мировавшихся эпи- и/или субретинальных пролиферативных мембран. В настоящее время нет критериев оценки вероятности развития и прогрессирования ПВР после хирургического лечения. Поэтому особую актуальность приобретает использование терапевтических методик в целях профилактики и лечения ПВР в дополнение к уже существующим хирургическим подходам в лечении. В 1998 году предложено применение интравитреального введения антибиотика даунорубицина в конце операции (в дозе 7,5 мкг/мл) [37], но данный метод не дал значимых различий в результатах лечения. Есть сообщения об использовании фторурацила (200 мкг/мл) и низкомолекулярного гепарина (5 МЕ/мл) на небольших группах добровольцев. Получены положительные результаты, но они незначительно отличаются от результатов, полученных без использования этих препаратов [29, 35], поэтому нельзя говорить об эффективности данного метода лечения. Также для предотвращения развития ПВР пытаются использовать ретиноиды в таблетках в дозе 10 мг дважды в день в течение 8 недель после операции [28]. Через год исследователи получили статистически значимые результаты, говорящие в пользу лечения: в 93,8 % случаев (15 глаз из 16) в группе с использованием ретиноидов сетчатка прилежала, в то время как в группе контроля – только в 63,2 % случаев (12 из 19 глаз). Наиболее распространенный в настоящее время метод лечения – применение стероидных препаратов, в том числе триамцинолона ацетонида, с целью профилактики развития пролиферативного процесса [4]. Но использование стероидов в офтальмологии имеет свои побочные эффекты: повышение внутриглазного давления, развитие задней субкапсулярной катаракты, увеличение уровня глюкозы в крови, снижение сопротивляемости к инфекционным заболеваниям, высокий риск развития эндофтальмита и другие. Было предложено интравитреальное введение бевацизумаба для воздействия на VEGF, но данный метод не показал статистически значимого результата. Для купирования воспалительного процесса существует ряд нестероидных противовоспалительных препаратов, которые не обладают побочными свойствами стероидных препаратов; так, было предложено интравитреальное введение лорноксикама [22].

Таким образом, несмотря на современные достижения изучения этиологии, патогенеза ПВР, усовершенствование хирургических технологий лечения РОС, проблема профилактики и лечения пролиферативного процесса остается на сегодняшний день актуальной и требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байырханова А.О., Канафьянова Э.Г., Семенова Ю.М., Огай Г.О., Одинцов К.В. Роль некоторых факторов роста в развитии и прогрессировании пролиферативной витреоретинопатии // Восток – Запад. Точка зрения. 2014. (1). 142.
2. Ботабекова Т.К., Канафьянова М.С., Аль-Асталь М.С., Огай Г.О., Жаманбалина Ж.А., Кутжанова А.С. Хирургическое лечение пролиферативной диабетической ретинопатии осложненной отслойкой сетчатки с применением витреосинеретика «Vitrenal» // Восток – Запад: сб. науч. тр. науч.-практ. конф. по офтальмохирургии с международным участием, Уфа, 7–8 июня 2012 г. Уфа, 2012. 265–266.
3. Величко П.Б., Фабрикантов О.Л., Османов Р.Э. Социально-гигиеническая характеристика больных пролиферативной диабетической ретинопатией // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. 2014. 19. (2). 741–743.
4. Гильманишин Т.Р., Файзрахманов Г.Р., Ярмухаметова А.И., Зайнуллина С.Р. Влияние препарата «Кеналог» на развитие пролиферативной витреоретинопатии после хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки // Восток – Запад: сб. науч. тр. науч.-практ. конф. по офтальмохирургии с международным участием, Уфа, 7–8 июня 2012 г. Уфа, 2012. 272–273.
5. Глинчук Я.И., Сидоренко В.Г., Каштан О.В., Шкворченко Д.О. Результаты хирургического лечения неприлегания и рецидивов отслоек сетчатой оболочки, осложненные тяжелой пролиферативной ретинопатией // Офтальмохирургия. 1994. (2). 20–25.
6. Егоров А.В. Современные возможности повышения функциональной активности сетчатки после операции по поводу ее отслоения // Современ. технологии в офтальмологии. 2015. (2). 78.
7. Захаров В.Д. Витреоретинальная хирургия. М., 2003. 180 с.
8. Захаров В.Д., Хуссейн М.И. Особенности витреоретинальной хирургии при отслойках сетчатки, осложненных передней пролиферативной витреоретинопатией // Офтальмохирургия. 2007. (1). 38–41.
9. Кански Д.Д., Милевски С.А., Дамато Б.Э., Тэннер В. Заболевания глазного дна. М.: МЕДпрессинформ, 2009. 268–270.
10. Каштан О.В., Тимохов В.Л., Коновалов К.А. Билатеральная тракционная отслойка сетчатки на фоне вторичной пролиферативной витреоретинопатии, вызванной внутривенным введением раствора коаксила (клинический случай) // Современные технологии лечения витреоретинальной патологии: сб. тез. VII науч.-практ. конф., Москва, 19–20 марта 2009 г. М., 2009. 104. 0150105.
11. Мащенко Н.В., Худяков А.Ю., Лебедев Я.Б. Сравнительный анализ хирургического лечения первичной регматогенной отслойки сетчатки методами эписклеральной и витреальной хирургии // Современные технологии в офтальмологии. 2014. (1). 77.
12. Османов Р.Э. Клинико-эпидемиологические аспекты регматогенной отслойки сетчатки в Тамбовской области // Современные технологии в офтальмологии. 2016. (4). 168–170.
13. Османов Р.Э., Фабрикантов О.Л., Османов Э.М. К вопросу о лечении регматогенной отслойки сетчатки // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. 2014. 19. (6). 1948–1950.
14. Османов Р.Э. Медико-эпидемиологический анализ заболеваемости и хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки в Тамбовской области за период 2006–2015 гг. // Точка зрения. Восток – Запад. 2016. (2). 17–21.
15. Османов Р.Э. Распространенность регматогенной отслойки сетчатки в Тамбовской области // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. 2015. 20. (6). 1666–1669.
16. Османов Р.Э. Современные методы хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. 2015. 20. (3). 658–662.
17. Путиенко А.А., Асланова В.С. Отслойка сетчатки. Одесса, 2014. 7–11.
18. Сосновский С.В., Бойко Э.В., Харитонов Н.Н. Обоснование и разработка системы количественной оценки тяжести пролиферативной витреоретинопатии // Офтальмохирургия. 2009. (4). 25–29.
19. Стебнев В.С., Малов В.М. Рецидивы отслойки сетчатки, связанные с прогрессированием пролиферативной витреоретинопатией после первичной эндовитреальной хирургии регматогенной отслойки сетчатки // Вестн. ОГУ. 2009. (12). 131–134.
20. Тахчиди Х.П., Захаров В.Д. Хирургия сетчатки и стекловидного тела. М.: Офтальмология, 2011. 186 с.
21. Тихонович М.В., Лыскин П.В., Иойлева Е.Э., Давыдова М.П., Гаврилова С.А. Экспрессия ростовых, трофических и провоспалительных факторов в эпиретинальных мембранах пациентов с тяжелой формой пролиферативной витреоретинопатии // Офтальмохирургия. 2015. (4). 36.
22. Тихонович М.В., Иойлева Е.Э., Гаврилова С.А. Роль воспаления в развитии пролиферативной витреоретинопатии // Клини. медицина. 2015. 93. (7). 14–20.
23. Тихонович М.В., Иойлева Е.Э. Роль эндотелиального фактора роста сосудов в физиологии сетчатки // Вестн. ОГУ. 2015. (12). 244–249.
24. Фабрикантов О.Л., Шмыков А.В. Роль витреоретинального интерфейса в патогенезе отслойки сетчатки // Вестн. ОГУ. 2013. (4). 280–282.
25. Чарльз С., Кальсада Х., Вуд Б. Микрохирургия стекловидного тела и сетчатки. М.: МЕДпрессинформ, 2012. 226–243.

26. Шмыков А.В., Фабрикантов О.Л., Авдеев Р.В., Ведринцева Н.В. Индукция задней отслойки стекловидного тела при эписклеральном пломбировании на глазах с регматогенной отслойкой сетчатки // Вестн. ОГУ. 2013. (4). 307–310.
27. Шмыков А.В., Фабрикантов О.Л., Авдеев Р.В., Ведринцева Н.В. Результаты применения гемазы в хирургическом лечении регматогенных отслоек сетчатки с локальным пристеночным гемофтальмом // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. 2015. 20. (3). 719–722.
28. Chang Y.-C., Hu D.-N., Wu W.-C. Effect of oral 13-cis-retinoic acid treatment on postoperative clinical outcome of eyes with proliferative vitreoretinopathy // Am. J. Ophthalmol. 2008. 146. (3). 440–446.
29. Charteris D.G., Aylward G.W., Wong D., Groenewald C., Asaria R.H., Bunce C. A randomized controlled trial of combined 5-fluorouracil and low-molecular-weight heparin in management of established proliferative vitreoretinopathy // Ophthalmology. 2004. 111. (12). 2240–2245.
30. Cui J.Z., Chiu A., Maberley D., Ma P., Samad A., Matsubara J.A. Stage specificity of novel growth factor expression during development of proliferative vitreoretinopathy // Eye (Lond.). 2007. 21. (2). 200–208.
31. Kreissig I. Minimal surgery for retinal detachment: a practical guide. N.Y., 2000. 356 p.
32. Machemer R., Aaberg T.M., Freeman H.M., Irvine A.R., Lean J.S., Michels R.M. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy // Am. J. Ophthalmol. 1991. 112. (2). 159–165.
33. Pastor-Idoate S., Rodriguez-Hernandez I., Rojas J., Fernandez I., Garcia-Gutierrez M.T., Ruiz-Moreno J.M., Rocha-Sousa A., Ramkissoon Y., Harsum S., Maclaren R.E., Charteris D., van Meurs J., Gonzalez-Sarmiento R., Pastor J.C. The p53 codon 72 polymorphism (rs1042522) is associated with proliferative vitreoretinopathy: The Retina 4 Project // Ophthalmology. 2013. 120. (3). 623–628.
34. Rojas J., Fernandez I., Pastor J.C., Garcia-Gutierrez M.T., Sanabria R.M., Brion M., Sobrino B., Manzanas L., Giraldo A., Rodriguez-de la Rua E., Carracedo A. Development of predictive models of proliferative vitreoretinopathy based on genetic variables: the Retina 4 Project // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. 50. (5). 2384–2390.
35. Sanabria Ruiz-Colmenares M.R., Pastor Jimeno J.C., Garrote Adrados J.A., Telleria Orriols J.J., Yugueros Fernandez M.I. Cytokine gene polymorphisms in retinal detachment patients with and without proliferative vitreoretinopathy: a preliminary study // Acta Ophthalmol. Scand. 2006. 84. (3). 309–313.
36. Wickham L., Bunce C., Wong D., McGurn D., Charteris D.G. Randomized controlled trial of combined 5-fluorouracil and low-molecular-weight heparin in the management of unselected rhegmatogenous retinal detachments undergoing primary vitrectomy // Ophthalmology. 2007. 114. (4). 698–704.
37. Wiedemann P., Hilgers R.D., Bauer P., Heilmann K. Adjunctive daunorubicin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy: results of a multicenter clinical trial. Daunomycin Study Group // Am. J. Ophthalmol. 1998. 126. (4). 550–559.

TREATMENT OF RHEGMATOGENOUS RETINAL DETACHMENT, COMPLICATED BY PROLIFERATIVE VITREORETINOPATHY (REVIEW)

Oleg L'vovich FABRIKANTOV^{1,2}, Dmitriy Aleksandrovich KONYAEV¹,
Ruslan Esedullaevich OSMANOV¹

¹ *The S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Tambov Branch*
392000, Tambov, Rasskazovskoe hwy., 1

² *Tambov State University n.a. G.R. Derzhavin*
392000, Tambov, Sovetskaya str., 93

We have summarized the results of national and foreign studies dealing with the questions of proliferative vitreoretinopathy (PVR) pathogenesis, treatment and prophylaxis. Rhegmatogenous retinal detachment (RRD) is one of the most severe ocular diseases that very often leads to the significant reduction of visual functions, disability and if untreated to irreversible blindness. Many studies have proved that the postoperative functional result depends on a number of factors including the severity of proliferative retinopathy. PVR is a term that is inseparably linked with the description of a wide spectrum of vitreoretinal pathology accompanied by the processes of pathological membrane formation on the retinal surface and in the vitreous body, leading eventually to the irreversible and inoperable changes. Currently surgical method of PVR treatment is considered the most effective. Surgical technique in PVR depends on the stage of the disease. PVR diagnosis in the early stages is problematic, and the disease is diagnosed when discovering the epi- and/or subretinal proliferative membranes been already formed. Currently there are no criteria for assessing the possibility of PVR development and progression followed surgical treatment. Despite modern advances in the study of PVR etiology and pathogenesis, the improvement of surgical techniques of treating RRD, the problem of proliferative disease prevention and treatment remains topical and requires further treatment.

Key words: ophthalmology, rhegmatogenous retinal detachment, proliferative vitreoretinopathy.

Fabrikantov O.L. – doctor of medical sciences, director, head of ophthalmological department,
email: naukatmb@mail.ru

Konyaev D.A. – ophthalmologist, email: naukatmb@mail.ru

Osmanov R.E. – ophthalmologist, email: naukatmb@mail.ru

ФИЗИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА В ОТКРЫТОЙ ПОПУЛЯЦИИ (ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ)

Александр Михайлович АКИМОВ, Екатерина Ивановна ГАКОВА,
Алеся Александровна АКИМОВА, Вадим Анатольевич КУЗНЕЦОВ

Тюменский кардиологический научный центр,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия
625026, г. Томск, ул. Мельникайте, 111

Цель исследования – определение ассоциации распространенности ишемической болезни сердца (ИБС) и отношения к физической активности среди лиц обоего пола открытой популяции 25–64 лет. Кардиологический скрининг проводился на репрезентативной выборке населения (отклик 77,7 %). Выделение различных форм ИБС осуществлялось на основании стандартных эпидемиологических методов, выявление физической активности – по анкете ВОЗ «МОНИКА-психосоциальная». Результаты исследования показали желание женщин (в отличие от мужчин), независимо от наличия или отсутствия ИБС, повышать физическую активность при отсутствии у них такой возможности. В группах с «определенной» ИБС и ИБС по расширенным критериям мужчины стали менее подвижными за последние 12 месяцев.

Ключевые слова: физическая активность, ишемическая болезнь сердца, открытая популяция, гендерные различия.

Известно, что риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний обнаруживает обратную связь с физической активностью. Ежегодно расстаются с жизнью около 56 млн человек – 0,75 % населения Земли. Причин смертности населения достаточно много, однако около 70 % от всех смертей составляют неинфекционные заболевания, в том числе сердечно-сосудистые. Доказано, что низкая физическая активность является самостоятельным, независимым фактором риска развития ИБС и тем самым занимает лидирующие позиции среди предотвратимых причин смерти населения в мире [5]. Единственный способ преодоления низкой физической активности в образе жизни современного человека — это активный отдых, физическая культура, спортивный туризм. По мнению многих авторов, кроме увеличения продолжительности жизни при этом происходит повышение физической работоспособности, увеличение компенсаторных способностей организ-

ма, что особенно важно для трудоспособного населения [1, 2–4].

Цель настоящего исследования – определение ассоциаций распространенности ИБС и отношения к физической активности в открытой популяции у мужчин и женщин 25–64 лет.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в рамках кардиологического скрининга на открытой городской популяции среди мужчин и женщин в возрасте 25–64 лет. Из избирательных списков граждан Центрального административного округа г. Тюмени была сформирована репрезентативная выборка в количестве 2000 человек, по 250 человек в каждой половозрастной группе (25–34, 35–44, 45–54, 55–64 лет). Обследование было проведено с откликом 77,7 % (85,0 % у мужчин и 70,3 % у женщин). Исследование выполнялось по жестко

Акимов А.М. – к.соц.н., младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, e-mail: akimov_a_m@mail.ru

Гакова Е.И. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, e-mail: gakova@cardio.tmn.ru

Акимова А.А. – лаборант-исследователь лаборатории эпидемиологии и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, e-mail: akimova.a.a@mail.ru

Кузнецов В.А. – д.м.н., проф., руководитель научного отдела инструментальных методов исследования заболеваний, e-mail: kuznets@cardio.tmn.ru

Таблица

Физическая активность у мужчин и женщин 25–64 лет в зависимости от наличия ИБС

Ответы на вопросы	ОИБС		Возможная ИБС		ИБС		Нет ИБС	
	n (71/49)	%	n (59/25)	%	n (130/74)	%	n (720/629)	%
1. Делаете ли Вы зарядку (кроме производственной)?								
Мне это не нужно	12/1	16,90/2,05**	8/1	13,56/4,00	20/2	15,36/2,70**	107/24	14,87/3,82***
Я должен бы делать зарядку	28/30	39,42/61,2*	28/14	47,46/56,00	56/44	43,11/59,40*	353/353	49,07/56,10**
Пытался, но безуспешно	20/7	28,17/14,3	10/6	16,95/24,00	30/13	23,10/17,55	111/135	15,43/21,47**
Делаю регулярно	10/10	14,10/20,4	10/4	16,95/16,00	20/14	15,36/19,00	143/113	19,80/17,97
По мнению врачей, физзарядка мне противопоказана	1/1	1,41/2,05*	3/0	5,08/0,00	4/1	3,07/1,35	6/4	0,83/0,64
2. Как Вы проводите досуг?								
Физически активно	19/12	26,75/24,50	14/4	23,73/16,00	33/16	25,5/21,60	168/157	23,35/24,96
Бывает вялое	31/25	43,65/51,00	34/14	57,62/56,00	65/39	49,92/52,70	405/134	56,30/21,30***
Физически пассивно	19/12	26,75/24,50	11/5	18,65/20,00	30/17	23,04/23,00	138/316	19,10/50,24***
У меня нет досуга	2/0	2,85/0,00	0/2	0,00/8,00	2/2	1,54/2,70	9/22	1,25/3,50***
3. Изменилась ли Ваша физическая активность в течение последних 12 месяцев?								
Да, стал более активным	5/2	7,05/4,10	5/4	8,48/16,00	10/6	7,68/8,10	96/83	13,30/13,20
Не изменилась	29/32	40,85/65,30***	29/14	49,16/56,00	58/46	44,70/62,10*	464/413	64,50/65,65
Стал менее подвижным	37/15	52,10/30,60*	25/7	42,36/28,00	62/22	47,62/29,80*	160/133	22,20/21,15
4. Как оцениваете свою физическую активность по сравнению с другими людьми Вашего возраста?								
Я значительно активнее	5/7	7,04/14,30	7/4	11,87/16,00	12/11	9,22/14,90	88/76	12,22/12,08
Несколько активнее	17/9	23,95/18,36	16/5	27,1/20,00	33/14	25,34/18,90	205/163	28,50/25,92
Такой же, как и другие	21/15	29,57/30,60	22/13	37,29/52,00	43/28	33,17/37,80	321/270	44,62/42,93
Несколько пассивнее	18/11	25,34/22,44	11/3	18,65/12,00	29/14	22,27/18,90	89/89	12,30/14,15
Значительно пассивнее	10/7	14,10/14,30	3/0	5,09/0,00	13/7	10,00/9,50	17/31	2,36/4,92*

Примечание. Данные представлены в виде «количество мужчин / количество женщин»; обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей женщин: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$.

стандартизованным методикам. Выделение различных форм ИБС осуществлялось на основании стандартных методов (вопросник ВОЗ на стенокардию напряжения, ЭКГ покоя и кодирование по Миннесотскому коду), используемых в эпидемиологических исследованиях. Выделяли «определённую» ИБС (ОИБС) и «возможную» ИБС. Для анализа отношения к физической активности использовалась анкета ВОЗ-МОНИКА «Знание и отношение к своему здоровью», включающая 33 вопроса по поводу отношения к своему здоровью и профилактике ССЗ [4]. Для проверки статистической значимости различий между группами использовался критерий χ^2 , значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В открытой городской популяции женщины с наличием ОИБС и ИБС по расширенным эпидемиологическим критериям, а также женщины группы сравнения (с отсутствием ИБС), в отличие от мужчин в тех же группах, считали зарядку необходимой. Так, на вопрос: «Делаете ли Вы физзарядку (кроме производственной)?» ответ «Я должен бы делать физзарядку» существенно чаще встречался среди женщин (таблица). В группах сравнения также имели место гендерные различия в отношении безуспешных попыток делать физзарядку – женщины, не имеющие заболевания ИБС, давали такой ответ чаще, чем мужчины той же группы. Вместе с тем мужчины с наличием ОИБС, ИБС и без ИБС в открытой популяции по сравнению с женщинами в тех же группах считали, что не нуждаются в физзарядке (см. таблицу). При ответе на вопрос о проведении досуга в группах сравнения – «без ИБС» – женщины, в отличие от мужчин, существенно чаще проводили досуг физически пассивно либо не имели его вовсе, тогда как в группах с наличием ИБС таких различий не отмечалось. При анализе изменения физической активности в течение последних 12 мес. выявилось, что мужчины с наличием ОИБС и ИБС по расширенным эпидемиологическим критериям стали менее подвижными по сравнению с женщинами в тех же анализируемых группах. Мужчины без ИБС считали, что их физическая активность гораздо меньше, чем активность других людей того же возраста, в меньшем числе случаев, чем женщины, в группах с наличием ИБС статистически значимые различия отсутствовали (см. таблицу).

Настоящее исследование показало, что женщины как с наличием ИБС, так и в группе сравнения (с отсутствием ИБС) хотели бы делать физзарядку и пытались ее делать, но безуспешно.

Возможно, это связано с отсутствием досуга у женщин, что также следует из данных исследования. Так, женщины в группе сравнения имели преимущественно пассивный досуг либо обходились без него, у мужчин такой тенденции не наблюдалось. Кроме того, женщины, в отличие от мужчин, считали себя значительно пассивнее по сравнению с другими людьми своего возраста. В то же время существенно большее число мужчин по сравнению с женщинами считали, что физзарядка им не нужна. Как следствие, результаты исследования показали, что в группах с ОИБС и ИБС по расширенным эпидемиологическим критериям мужчины стали менее подвижными за последние 12 мес.

Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований на тюменской популяции, где выявлена высокая распространенность факторов риска ИБС: артериальной гипертензии – преимущественно среди мужчин, гиперхолестеринемии, избыточной массы тела – как среди мужчин, так и среди женщин [3]. Кроме того, в нескольких одномоментных исследованиях установлено, что физически активные люди имеют почти в два раза ниже риск развития ИБС по сравнению с неактивными людьми, а польза физической активности для здоровья может быть получена уже при умеренной интенсивности физических нагрузок [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные при исследовании неорганизованного населения г. Тюмени, могут служить научной основой для планирования комплексных социально ориентированных программ и в других среднеурбанизированных сибирских городах с приоритетной ориентацией на потребности групп риска – мужчин с ОИБС и ИБС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимов А.М. Физическая активность и характер труда в популяции мужчин трудоспособного возраста // Омск. науч. вестн. 2015. (2). 238–240.
2. Акимов А.М., Акимова А.А., Гакова Е.И., Каюмова М.М., Гафаров В.В. Отношение к своему здоровью и семейный статус в открытой городской популяции: гендерные различия // Мир науки, культуры, образования. 2016. (6). 282–285.
3. Каюмова М.М., Гафаров В.В., Смазнов В.Ю., Акимов А.М., Каюмов Р.Х., Кузнецов В.А. Самооценка здоровья, отношение к своему здоровью и медицинской помощи в мужской популяции // Мир науки, культуры, образования. 2011. (6-1). 179–185.

4. Гафаров В.В., Громова Е.А., Гафарова А.В., Гагулин И.В. Современные представления об информированности и отношении к своему здоровью мужчин 45–69 лет, жителей мегаполиса Западной Сибири // Сиб. мед. журн. 2012. (2). 146–152.

5. Lopez A.D., Mathers C.D., Ezzati M., Jamison D.T., Murray C.J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data // Lancet. 2006. 367. (9524). 1747–1757.

PHYSICAL ACTIVITY WITH PRESENCE AND ABSENCE OF ISCHEMIC HEART DISEASE IN THE OPEN POPULATION (GENDER DIFFERENCES)

**Aleksandr Mikhaylovich AKIMOV, Ekaterina Ivanovna GAKOVA,
Alesya Aleksandrovna AKIMOVA, Vadim Anatolyevich KUZNETSOV**

*Tyumen Cardiology Research Center,
Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia
625026, Tomsk, Melnikayte str., 111*

Aim of the study was to determine the association between prevalence of coronary artery disease and attitude toward physical activity among persons of both sexes in open population of 25–64 years. Cardiological screening was conducted on a representative sample of the population (the response of 77.7 %). The allocation of various forms of CHD was carried out on the basis of standard epidemiological methods, identifying the physical activity by the WHO questionnaire «MONICA-psychosocial». The results of the study showed the desire of women (unlike men) regardless of the presence or absence of coronary artery disease to increase physical activity if they had no such opportunity. Men in groups with «defined» CHD and CHD according to extended criteria have become less mobile over the last 12 months.

Key words: physical activity, coronary artery disease, open population, gender differences.

Akimov A.M. – candidate of social sciences, junior researcher of the laboratory of epidemiology and prevention of cardiovascular disease, e-mail: akimov_a_m@mail.ru

Gakova E.I. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of epidemiology and prevention of cardiovascular disease, e-mail: gakova@cardio.tmn.ru

Akimova A.A. – the assistant-researcher of the laboratory of epidemiology of cardiovascular diseases practice, e-mail: akimova.a.a@mail.ru

Kuznetsov V.A. – doctor of medical sciences, professor, head of the research department of instrumental methods of diseases investigation, e-mail: kuznets@cardio.tmn.ru

СВЯЗЬ ОЖИРЕНИЯ С УРОВНЕМ ТЕСТОСТЕРОНА, ПРИЗНАКАМИ ТРЕВОГИ, ДЕПРЕССИИ И УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ У МУЖЧИН

Ольга Васильевна ВАСИЛЬЕВА, Вера Георгиевна СЕЛЯТИЦКАЯ

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

Цель исследования: изучить связи уровня тестостерона в крови с выраженностью признаков тревоги, депрессии и симптомов урологической патологии у мужчин зрелого возраста с нормальной, избыточной массой тела и ожирением. **Материал и методы.** В исследовании приняли участие 188 мужчин, средний возраст – 36,7 года. Проводили антропометрическое обследование, для оценки уровня тревоги и депрессии использовали опросник HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale, 1983); по шкале IPSS (International Prostate Symptom Score) оценивали выраженность симптомов нарушений мочеиспускания. Для исследования сексуальной дисфункции мужчин применяли международный индекс эректильной дисфункции (МИЭФ-5). Опросник возрастных симптомов мужчин AMS (Aging Males Symptoms) использовали для выявления клинических признаков андрогенного дефицита. В сыворотке крови пациентов определяли содержание тестостерона и кортизола методом ИФА. **Результаты и их обсуждение.** У мужчин с избыточной массой тела и ожирением относительно мужчин с нормальной массой тела вместе с увеличением симптомов нарушений мочеиспускания, нарастающей тревогой, депрессией и усилением признаков эректильной дисфункции отмечен рост андрогенного дефицита, который влияет на ускорение процессов старения организма. В свою очередь наличие у мужчин урологической патологии через нарастание тревоги и депрессии может играть значимую роль в патогенезе ожирения.

Ключевые слова: мужчины, тестостерон, андрогенный дефицит, тревога, депрессия, эректильная дисфункция, ожирение, ускоренное старение.

В последние годы при анализе механизмов нарушений соматического здоровья у мужчин зрелого возраста особое внимание уделяют андрогенному дефициту. Так, показано, что андрогенный дефицит ассоциирован с накоплением избыточной массы тела и развитием ожирения [18], абдоминальная форма которого является основным компонентом метаболического синдрома как кластера факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, сахарного диабета 2 типа [15]. Развивающийся у мужчин после 40–50 лет возрастной андрогенный дефицит связан с выраженным повышением частоты случаев ишемической болезни сердца, фатальных сердечно-сосудистых осложнений, эндокринно-метаболических заболеваний и т.д. [1]. Снижение уровня тестостерона в крови у мужчин ассоциировано с ускорением процессов старения организма [5], нарастанием тревоги и депрессивных состояний [11].

Тревожные расстройства и депрессия являются наиболее часто встречающимися состояниями,

определяемыми в условиях первичной и общей медицинской практики у пациентов с соматической патологией [17]. Тревога и депрессия могут проявляться в виде разнообразных психических и соматических симптомов, создавая тем самым трудности в диагностике заболевания [12]. Известно, что психические нарушения, вызывающие значительное ухудшение качества жизни пациента, могут быть связаны и с урологической патологией, особенно с эректильной дисфункцией у мужчин, во многих случаях обусловленной андрогенным дефицитом [16], который, в свою очередь, также может вызывать нарастание тревоги и депрессии [9–11]. Однако недостаточно изучен вклад андрогенного дефицита в развитие коморбидной патологии, когда сочетание у одного больного двух и/или более хронических заболеваний патогенетически взаимосвязано между собой.

Целью исследования было изучить связи уровня тестостерона в крови с выраженностью признаков тревоги, депрессии и симптомов уро-

*Васильева О.В. – аспирант лаборатории эндокринологии, e-mail: olja-v2012@yandex.ru
Селятицкая В.Г. – д.б.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории эндокринологии,
e-mail: csem@centercem.ru*

логической патологии у мужчин зрелого возраста с нормальной, избыточной массой тела и ожирением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовали 188 мужчин зрелого возраста, обратившихся за амбулаторной урологической помощью в медицинский центр Новосибирска с симптомами нижних мочевых путей. Все мужчины дали информированное согласие на участие в исследовании, которое соответствовало «Этическим принципам проведения научных медицинских исследований с участием человека» и «Правилам клинической практики в Российской Федерации». Средний возраст мужчин составил 36,7 года (от 20 до 60 лет). Для оценки уровня тревоги и депрессии использовали опросник HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale, 1983; 0–7 баллов – отсутствие клинических симптомов, 8–10 – субклинически выраженные, 11 и более – клинически выраженная тревога и депрессия); по шкале IPSS (International Prostate Symptom Score) оценивали выраженность симптомов нарушений мочеиспускания (0–7 баллов – мягкая, 8–19 – умеренная, 20–35 – выраженная симптоматика заболеваний простаты). Для исследования сексуальной дисфункции мужчин применяли международный индекс эректильной дисфункции (МИЭФ-5; 22–25 баллов – норма, 17–21 – легкая, 12–16 – умеренно легкая, 8–11 – умеренная, 5–7 – тяжелая степень эректильной дисфункции). Опросник возрастных симптомов мужчин AMS (Aging Males Symptoms) использовали для выявления клинических признаков андрогенного дефицита и оценки степени их выраженности (17–26 баллов – не выраженные, 27–36 – слабо выраженные, 37–49 – средней выраженности, более 50 баллов – резко выраженные симптомы старения).

У всех мужчин определяли антропометрические показатели: рост, массу тела, окружность талии (ОТ) и окружность бедер (ОБ) в см; рассчитывали индекс массы тела (ИМТ) как отношение массы тела (кг) к росту в квадрате (m^2) и величину отношения ОТ/ОБ в усл.ед. На основании результатов антропометрического обследования мужчин разделили на три группы: группа 1 ($n = 72$) – ИМТ < 25 (нормальная масса тела); группа 2 ($n = 78$) – $25 \leq \text{ИМТ} \leq 29,9$ (избыточная масса тела); группа 3 ($n = 38$) – ИМТ ≥ 30 (ожирение). Биологический возраст и коэффициент скорости старения (КСС) определяли по методу [6]. Забор крови у пациентов проводили из локтевой вены утром натощак на фоне свободного питьевого режима. Содержание в сыворотке кро-

ви общего тестостерона и кортизола определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов.

Абсолютные значения показателей представлены в таблицах и тексте в виде средних величин и среднеквадратичного отклонения ($M \pm SD$); сравнительный анализ величин показателей между группами проводили с использованием критерия множественного сравнения Манна – Уитни. Для определения силы связи между параметрами использовали корреляционный анализ по методу Спирмена. Для всех видов анализа статистически достоверными считали значения $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Соотношение числа мужчин с нормальной, избыточной массой тела и ожирением среди обследованных лиц составило в процентах 38,3 : 41,5 : 20,2, что в общем соответствует стандартизованной оценке распространенности ожирения и избыточной массы тела среди мужского населения России по данным Центров здоровья [7].

Результаты, представленные в табл. 1, показали наличие статистически значимых различий среднего возраста мужчин в группах с нормальной и избыточной массой тела, а также с ожирением, вместе с которыми достоверно различались между группами величины КСС и биологического возраста мужчин. Несмотря на то что величина КСС достоверно увеличивалась уже у мужчин с избыточной массой тела относительно нормальной, разницы между календарным и биологическим возрастом при избыточной массе тела еще не прослеживалось. Но у мужчин с ожирением разница между календарным и биологическим возрастом составила уже 5,2 года за счет превышения биологического возраста над календарным, указывая тем самым на ассоциацию ожирения с механизмами ускоренного старения организма, одним из которых может быть дисрегуляция со стороны нейрогормональных систем [5].

Уровень общего тестостерона в сыворотке крови статистически значимо снижался у мужчин в прямой зависимости от массы тела. Так, при избыточной массе тела он был ниже, чем при нормальной, а при ожирении концентрация гормона была достоверно меньше относительно мужчин не только с нормальной, но и с избыточной массой тела (см. табл. 1). Какова же причина выявленного снижения уровня тестостерона – ожирение или гормональные признаки возрастного андрогенного дефицита? Разделить эти две причины трудно. Ранее мы уже описывали снижение концентрации общего тестостерона в сыворотке

Таблица 1

Величины изученных показателей физиологических функций

Показатель	Нормальная масса тела, n = 72	Избыточная масса тела, n = 78	Ожирение, n = 38	p		
	1	2	3	1–2	2–3	1–3
Возраст, лет	31,5 ± 8,5	38,1 ± 9,4	43,5 ± 9,9	< 0,00001	0,005646	< 0,00001
Содержание общего тестостерона, нмоль/л	21,9 ± 9,8	18,3 ± 7,7	14,0 ± 4,0	0,040934	0,008471	0,000348
Содержание кортизола, нмоль/л	341 ± 161	322 ± 120	263 ± 127	0,848646	0,101105	0,071352
IPSS, баллов	2,8 ± 5,0	3,2 ± 5,6	3,1 ± 4,3	0,701465	0,503247	0,310618
МИЭФ-5, баллов	23,7 ± 2,4	23,1 ± 2,8	22,3 ± 3,2	0,150026	0,273892	0,059069
AMS, баллов	24,4 ± 10,7	26,4 ± 11,5	24,8 ± 6,9	0,103158	0,864147	0,070953
HADS тревога, баллов	2,6 ± 1,9	3,5 ± 2,8	3,6 ± 2,5	0,125337	0,710189	0,073305
HADS депрессия, баллов	2,7 ± 2,7	3,2 ± 2,7	4,3 ± 3,12	0,237067	0,041348	0,007045
KCC, условные единицы	0,95 ± 0,13	1,12 ± 0,19	1,28 ± 0,19	< 0,00001	0,000140	< 0,00001
Биологический возраст, лет	30,1 ± 6,5	38,5 ± 7,4	48,7 ± 9,8	< 0,00001	< 0,00001	< 0,00001

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между группами.

крови мужчин в возрасте от 25 до 58 лет при ожирении [2]. Однако с возрастом в организме также повышается содержание жировой ткани [18]. Можно предположить, что у молодых мужчин снижение уровня тестостерона связано преимущественно с накоплением избыточной жировой ткани и формированием ожирения, а у пожилых – с активацией и других механизмов развития возрастного андрогенного дефицита [13].

Параллельно с нарастанием массы тела и снижением уровня тестостерона в крови у мужчин с избыточной массой тела и ожирением отмечена тенденция к нарастанию симптомов тревоги, а также достоверно увеличивались симптомы депрессии (см. табл. 1). Индивидуальный анализ показал, что у мужчин первой группы с нормальной массой тела субклинически и клинически выраженная тревога не наблюдалась, а субклинически и клинически выраженная депрессия обнаружена у 5,6 % пациентов. Во второй группе мужчин с избыточной массой тела субклинически и клинически выраженная тревога и депрессия составили по 6,4 %. В третьей группе, в которую вошли мужчины с ожирением, субклинически и клинически выраженная тревога наблюдалась у 7,9 %, а депрессия – у 10,5 % обследованных лиц. Известно, что в настоящее время до 5 % населения планеты страдают депрессивными расстройствами, а среди пациентов, наблюдаемых в общей медицинской практике, их частота составляет 20–30 % [4]. Наши данные показывают, что у мужчин с урологической патологией повышение уровней тревоги и депрессии ассоциировано с нарастанием избыточной массы тела и развитием ожирения.

Хотя в исследовании приняли участие мужчины, пришедшие на амбулаторный прием к врачу-урологу, симптомы нарушений мочеиспускания, сексуальной дисфункции в соответствии с международным индексом эректильной дисфункции и клинических признаков андрогенного дефицита у них были выражены слабо (см. табл. 1). Между группами мужчин с нормальной, избыточной массой тела и ожирением не выявлено достоверных различий.

В табл. 2 представлены величины коэффициентов корреляции изученных показателей. Для первой группы мужчин с нормальной массой тела величина показателя выраженности симптомов нарушения мочеиспускания, определяемого по шкале IPSS, имела прямые корреляционные связи с уровнем тревоги, выраженностью клинических признаков андрогенного дефицита по шкале AMS, биологическим возрастом и обратную корреляционную связь с величиной индекса эректильной дисфункции. Последний параметр, кроме того, имел обратную корреляционную связь с выраженностью клинических признаков андрогенного дефицита, которая, в свою очередь, была прямо связана с выраженностью тревоги. Все указанные корреляционные связи физиологически обоснованы и указывают на то, что у мужчин с нормальной массой тела с усилением симптомов нарушений мочеиспускания нарастает тревога, возрастают признаки эректильной дисфункции и выраженность клинических признаков андрогенного дефицита.

Для второй группы мужчин – с избыточной массой тела (см. табл. 2), аналогично первой группе мужчин величина показателя симптомов

Таблица 2
Величины коэффициентов корреляции изученных показателей физиологических функций у мужчин

Показатель	Содержание общего тестостерона		Содержание кортизола		IPSS		МИЭФ-5		AMS		HADSt		HADSD		KCC	
	Н	И	Н	О	Н	И	Н	И	Н	И	Н	И	Н	О	И	О
Содержание общего тестостерона	0,08	0,19	0,64													
IPSS	-0,14	-0,27	0,20	-0,15	0,21	0,26										
МИЭФ-5	0,13	0,14	-0,31	0,01	-0,29	-0,63	-0,59	-0,42	-0,34							
AMS	-0,17	-0,19	0,19	0,17	0,20	0,42	0,59	0,60	0,50	-0,49	-0,45	-0,50				
HADSt	0,01	0,14	0,04	0,20	0,06	0,41	0,35	0,42	0,59	-0,18	-0,25	-0,24	0,55	0,48	0,68	
HADSD	0,27	0,16	0,14	0,02	0,15	0,24	0,22	0,28	0,34	-0,17	-0,34	-0,58	0,25	0,42	0,56	0,30
KCC	-0,12	-0,19	-0,35	0,28	-0,12	-0,21	-0,32	-0,03	-0,10	0,23	0,05	0,09	-0,15	0,14	-0,36	-0,14
БВ	-0,07	-0,11	-0,07	-0,36	0,22	-0,01	0,29	0,25	0,17	-0,18	-0,22	-0,09	0,15	0,09	0,32	0,11
Масса тела, кг	-0,15	-0,42	-0,18	-0,04	0,11	-0,09	0,14	0,27	0,20	-0,23	-0,08	-0,03	0,11	0,31	0,12	0,06

Примечание. Н – нормальная масса тела, И – избыточная масса тела, О – ожирение; HADSt – HADS тревога, HADSD – HADS депрессия; жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляционные связи.

нарушений мочеиспускания прямо коррелировала с уровнем тревоги, выраженностью клинических признаков андрогенного дефицита и биологическим возрастом и имела обратную корреляционную связь с величиной индекса эректильной дисфункции. У мужчин с избыточной массой тела к выше перечисленным корреляционным связям добавились прямая корреляционная связь с уровнем депрессии и обратная – с содержанием тестостерона в крови. Величина индекса эректильной дисфункции, дополнительно к корреляционным связям, аналогичным таковым у мужчин с нормальной массой тела, имела обратные связи с уровнями тревоги и депрессии, с которыми в свою очередь прямо коррелировала выраженность клинических признаков андрогенного дефицита. Появление большего количества корреляционных связей изученных параметров между собой, формирование связей с уровнем не только тревоги, но и депрессии указывают на усугубление клинических признаков патологического процесса на фоне избыточной массы тела.

Для третьей группы мужчин с ожирением выявлены аналогичные с группой мужчин с избыточной массой тела корреляционные связи, к которым добавились прямая связь уровня тестостерона с уровнем кортизола в крови и обратная – с KCC, а также обратная корреляционная связь между содержанием кортизола и величиной индекса эректильной дисфункции (см. табл. 2). Полученные результаты подтверждают мнение, что ожирение ассоциировано с процессами дисрегуляции со стороны нейрогормональных систем [5].

Наличие у мужчин урологической патологии, в свою очередь, через нарастание тревоги и депрессии также может приводить к изменениям гормонального статуса, в частности функции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, и нарушениям обмена биогенных моноаминов [3, 8]. Эти изменения способствуют углублению нарушений гомеостаза и имеют значение для патогенеза различных соматических заболеваний, включая ожирение, артериальную гипертензию, ишемическую болезнь сердца и сахарный диабет [14].

Обнаружено, что при нормальной массе тела ни один из анализируемых показателей не был связан достоверными корреляционными связями с общей массой тела. При избыточной массе тела выявлено наибольшее количество достоверных корреляционных связей массы тела с анализируемыми параметрами (четыре из восьми возможных), они указывают на ассоциацию накопления избыточной массы тела со снижением уровня тестостерона, усилением симптомов нарушений

мочеиспускания, клинических признаков андрогенного дефицита и ускорением процессов старения. Следовательно, набор избыточной массы тела сопряжен с формированием риска развития и утяжеления патологических процессов в организме. И только при ожирении была обнаружена достоверная корреляционная связь массы тела с биологическим возрастом, т.е. у мужчин с ожирением сформирована патологическая связь между нарастанием массы тела и процессами ускоренного старения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У мужчин зрелого возраста вместе с нарастанием массы тела усиливаются нарушения мочеиспускания, эректильная дисфункция, нарастают тревога и депрессия, а рост андрогенного дефицита приводит к ускорению процессов старения организма. В свою очередь наличие у мужчин урологической патологии через нарастание тревоги и депрессии может играть значимую роль в патогенезе ожирения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Роживанов Р.В., Курбатов Д.Г. Рекомендации по диагностике и лечению гипогонадизма (дефицита тестостерона) у мужчин // Пробл. эндокринологии. 2015. 61. (5). 60–71.
2. Епанчинцева Е.А., Селятицкая В.Г., Шейна Ю.И. Параметры эякулята у пациентов с абдоминальным ожирением // Андрол. и генит. хирургия. 2015. 16. (1). 88–93.
3. Иванченко Д.Н., Дорофеева Н.П., Шлык С.В. Депрессивные расстройства у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями: влияние на прогноз // Мед. вестн. Юга России. 2016.(1). 28–32.
4. Искандеров Б.Г. Аффективные расстройства и нарушения ритма сердца. Пенза, 2011. 168 с.
5. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Кветная Т.В., Трофимов А.В. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения // Успехи геронтологии. 2009. 22. (1). 24–36.
6. Пат. № 2387374 РФ. Способ определения биологического возраста человека и скорости старения / А.Г. Горелкин, Б.Б. Пинхасов; Опубли. 27.04.2010.
7. Соболева Н.П., Руднев С.Г., Николаев Д.В., Ерюкова Т.А., Колесников В.А., Мельниченко О.А., Пономарева Е.Г., Старунова О.А., Стерликов С.А. Биоимпедансный скрининг населения России в

центрах здоровья: распространенность избыточной массы тела и ожирения // Рос. мед. журн. 2014. (4). 4–13.

8. Узбеков М.Г., Максимова Н.М. Моноаминогормональные связи в патогенезе тревожной депрессии // Журн. неврологии и психиатрии. 2015. 1. (2). 52–55.

9. Celec P., Ostatnikova D., Hodosy J. On the effects of testosterone on brain behavioral functions // Front. Neurosci. 2015. 9. 12.

10. Fugh-Berman A., Scialli A.R. Testosterone and sexual function // Curr. Opin. Urol. 2017. 27. (6). 516–518.

11. Khera M. Patients with testosterone deficiency syndrome and depression // Arch. Esp. Urol. 2013. 66. (7). 729–736.

12. Kim E.Y., Kim S.H., Ha K., Lee H.J., Yoon D.H., Ahn Y.M. Depression trajectories and the association with metabolic adversities among the middle-aged adults // J. Affect. Disord. 2015. 188. 14–21.

13. Novikova E., Selyatitskaya V., Mitrofanov I., Pinkhasov B., Karapetyan A. Association of erectile dysfunction and hypogonadism with metabolic syndrome in men with lower urinary tract symptoms of younger and older age groups // Adv. Sex. Med. 2014. 4. 55–64.

14. Penninx B.W.J.H., Milanesechi Y., Lamers F., Vogelzangs N. Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile // BMC Med. 2013. 11. 129.

15. Shabsigh R., Arver S., Channer K.S., Eardley I., Fabbri A., Gooren L., Heufelder A., Jones H., Meryn S., Zitzmann M. The triad of erectile dysfunction, hypogonadism and the metabolic syndrome // Int. J. Clin. Pract. 2008. 62. (5). 791–798.

16. Suija K., Kerkela M., Rajala U., Jokelainen J., Laakso M., Harkonen P., Keinanen-Kiukaanniemi S., Timonen M. The association between erectile dysfunction, depressive symptoms and testosterone levels among middle-aged men // Scand. J. Public Health. 2014. 42. (7). 677–682.

17. Westley C.J., Amdur R.L., Irwig M.S. High rates of depression and depressive symptoms among men referred for borderline testosterone levels // J. Sex. Med. 2015. 12. (8). 1753–1760.

18. Yassin A.A., Nettleship J.E., Salman M., Almeahadi Y. Waist circumference is superior to weight and BMI in predicting sexual symptoms, voiding symptoms and psychosomatic symptoms in men with hypogonadism and erectile dysfunction // Andrologia. 2017.49.(4).e12634.

CORRELATION BETWEEN OBESITY AND TESTOSTERONE LEVEL, ANXIETY SYMPTOMS, DEPRESSION AND ACCELERATED AGING IN MEN

Olga Vasil'evna VASILEVA, Vera Georgievna SELYATITSKAYA

*Research Institute of Experimental and Clinical Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The aim of the investigation was to study the relationship of blood testosterone levels with the severity of anxiety signs, depression and urological pathology symptoms in men of mature age with normal weight, overweight and obesity. **Material and methods:** 188 men of 36.7 average age participated in the study. Anthropometric examination was carried out, the HADS questionnaire (Hospital Anxiety and Depression Scale, 1983) was used to assess the level of anxiety and depression; the severity of urinary disorders symptoms was evaluated with the scale of IPSS (International Prostate Symptom Score). To study the sexual dysfunction the international index of erectile dysfunction (ICEF-5) was applied. AMS Men's Age Symptoms (Aging Males Symptoms) questionnaire was used to identify clinical signs of androgen deficiency. The content of testosterone and cortisol in blood serum was determined by EIA. **Results and discussion:** The growth of androgen deficiency along with the increase in the urinary disorders symptoms, extended anxiety, depression and enhanced signs of erectile dysfunction have been revealed in men with overweight and obesity relating to the men with normal body weight. The androgen deficiency growth influences the aging processes acceleration. In turn, the presence of urological pathology in men can play an important role in the obesity pathogenesis through the increase in anxiety and depression.

Key words: men, alarm, depression, androgen deficiency, erectile dysfunction, obesity, accelerated aging.

Vasileva O.V. – postgraduate student of the laboratory of endocrinology, e-mail: olja-v2012@yandex.ru

Selyatitskaya V.G. – doctor of biological sciences, professor, chief researcher of the laboratory of endocrinology, e-mail: ccem@centercem.ru

ИНСУЛЬТ: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В ИРКУТСКОЙ И САХАЛИНСКОЙ ОБЛАСТЯХ

Владимир Викторович ШПРАХ¹, Людмила Витальевна СТАХОВСКАЯ²,
Ольга Анатольевна КЛОЧИХИНА², Татьяна Ивановна СУРЖА³,
Олег Алексеевич СТРАХОВ⁴

¹ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России
664049 г. Иркутск, мкр-н Юбилейный, 100

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России
117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

³ Сахалинская областная клиническая больница
693004, г. Южно-Сахалинск, ул. Мира, 430

⁴ Университет «Синергия»
129090, г. Москва, ул. Мещанская, 9/14, стр. 1

Перспективные многоцентровые популяционные исследования инсульта представляют научный, медицинский и экономический интерес, являясь приоритетной областью изучения инсульта. **Цель исследования** – изучить и сравнить динамику показателей заболеваемости инсультом и смертности от него в Иркутской и Сахалинской областях. **Материал и методы.** Изучение инсульта проводилось в Свердловском районе г. Иркутска и в г. Южно-Сахалинске с 2009 по 2014 г. методом территориально-популяционного регистра, на основании принципов протокола международного исследования инсульта MONICA (1985–1995 гг.). В изучаемых регионах сбор данных осуществлялся единообразно, неизменной командой исследователей в течение 6-летнего периода. Диагностика инсульта соответствовала критериям МКБ 10 пересмотра. Диагноз устанавливался на основании компьютерной томографии/магнитно-резонансной томографии и/или аутопсии в случае летального исхода, кроме того, подавляющая часть лиц с инсультом была осмотрена неврологом, за исключением смерти на дому в первые часы от начала заболевания. Проводились регистрация и анализ всех случаев острого инсульта (первые 28 дней от начала заболевания), произошедших в исследуемых популяциях в возрастной группе 25–74 года. Анализу подлежали 2196 и 2619 случаев инсульта в г. Иркутске и в г. Южно-Сахалинске соответственно. **Результаты.** В 2009 г. заболеваемость инсультом среди мужчин г. Южно-Сахалинска и г. Иркутска составляла 4,43 и 3,97 случая на 1000 населения соответственно. С 2009 по 2014 г. заболеваемость снизилась соответственно на 23 % ($p < 0,05$) и 17 % ($p > 0,05$). За 6-летний период заболеваемость инсультом среди женщин в г. Иркутске снизилась на 16 % ($p > 0,05$), в г. Южно-Сахалинске – на 11 % ($p > 0,05$) и в 2014 г. составила соответственно 2,20 и 1,68 на 1000 населения. Смертность от инсульта среди мужчин в 2009 г. составляла в Иркутске и Южно-Сахалинске 1,11 и 1,68 случаев на 1000 населения соответственно, при этом показатель продемонстрировал схожее снижение в 2014 г. (на 47 и 53 % соответственно) в обеих изучаемых популяциях. Показатель смертности уменьшился среди женщин г. Иркутска на 58 % ($p > 0,01$) и повысился на 26 % среди женщин г. Южно-Сахалинска. С 2009 г. в изучаемых регионах проводилась реорганизация помощи больным инсультом в рамках единой Всероссийской программы, результаты проведенного исследования являлись критерием эффективности проведения комплексной

Шпрах В.В. – д.м.н., проф., директор, e-mail: irkmapo@irk.ru

Стаховская Л.В. – д.м.н., проф., директор НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта

Клочихина О.А. – к.м.н., старший научный сотрудник НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта, e-mail: o.klochihina@mail.ru

Суржа Т.И. – невролог, e-mail: sakh-nevro@mail.ru

Страхов О.А. – к.т.н., зав. кафедрой Информационного менеджмента и информационно-коммуникационных технологий имени В.В. Дика, e-mail: ostrakhov@synergy.ru

программы. **Заключение.** Сравнительное исследование динамики заболеваемости и смертности от инсульта в городской популяции мужчин и женщин в возрастной группе 25–74 года в Иркутской и Сахалинской областях продемонстрировало эффективность комплексных мероприятий по управлению инсультом в двух регионах, расположенных в восточной части Российской Федерации. Результаты проведенного исследования выявили как общие черты, так и региональные особенности динамики показателей заболеваемости инсультом и смертности от него.

Ключевые слова: инсульт, заболеваемость, смертность, Иркутская область, Сахалинская область.

Сопоставимые данные о глобальном и региональном бремени инсульта и его тенденциях имеют решающее значение для планирования ресурсов здравоохранения. Согласно международному обзору неврологических заболеваний в 195 странах мира (1990–2015 гг.), инсульт являлся самым экономически затратным заболеванием. Максимальные потери DALY (disability-adjusted life years) составили при инсульте 47,3 % среди всех неврологических заболеваний, второе и третье места по индексу DALY приходились на мигрень (13,1 %) и менингит (10,1 %). Инсульт привел к 67,3 % летальных исходов среди неврологических заболеваний в возрастной группе до 75 лет, на втором месте была болезнь Альцгеймера и другие формы слабоумия (20,3 %), далее следовали менингиты, составив 4,0 % летальных исходов [6, 8, 10, 11]. По результатам исследования, с 1990 по 2015 г. эпидемиологические показатели инсульта вначале увеличивались, затем уменьшались, в целом произошло снижение смертности от инсульта на 30 %. Максимальное снижение было зарегистрировано в странах Западной Европы и других экономически развитых странах. Различия в уровне смертности между странами с высоким и низким уровнем дохода достигало шестикратных значений. Эпидемиологические показатели инсульта были высокими в Восточной Европе, Центральной Азии, Океании, Индонезии, а также в Монголии, Афганистане и Центрально-Африканской Республике [5]. Проспективные многоцентровые популяционные исследования инсульта представляют не только научный, медицинский, но и экономический интерес и являются приоритетной областью изучения инсульта [4]. Целью проведенного исследования являлось изучение и сравнение динамики показателей заболеваемости инсультом и смертности от него в Иркутской и Сахалинской областях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучение инсульта проводилось в Свердловском районе г. Иркутска и в г. Южно-Сахалинске с 2009 по 2014 г. в рамках многоцентрового исследования инсульта (2009–2014 гг.), выполнен-

ного методом территориально-популяционного регистра [2]. Используемый метод проспективного изучения клинико-эпидемиологических параметров инсульта применялся в международном исследовании инсульта MONICA (1985–1995 гг.) [1]. Сбор данных в изучаемых регионах осуществлялся единообразно, неизменной командой исследователей в течение 6-летнего периода. Диагностика инсульта соответствовала критериям МКБ 10 пересмотра. Диагноз устанавливался на основании компьютерной томографии / магнитно-резонансной томографии (КТ/МРТ) и/или аутопсии в случае летального исхода. Кроме того, подавляющая часть лиц с инсультом была осмотрена неврологом, за исключением пациентов, умерших на дому в первые часы от начала заболевания. Проводилась регистрация и анализ всех случаев острого инсульта (первые 28 дней от начала заболевания), произошедших в исследуемых популяциях в возрастной группе 25–74 года. Заболеваемость инсультом – это количество новых случаев заболевания, впервые произошедших у человека, стандартизованных по половозрастной структуре исследуемой популяции на 1000 населения. Смертность от инсульта – это количество всех смертных случаев в первые 28 дней от начала заболевания, стандартизованных по половозрастной структуре исследуемой популяции на 1000 населения.

Численность изучаемой популяции Свердловского района г. Иркутска в 2009 г. составила 113 468 человек, в 2014 г. – 113 836 человек, г. Южно-Сахалинска – соответственно 116 201 и 131 931 человек (табл. 1).

Аналізу подлежали 2196 случаев инсульта в г. Иркутске и 2619 случаев инсульта в г. Южно-Сахалинске. Для расчета стандартизованных показателей использовался метод прямой стандартизации согласно половозрастной структуре населения исследуемых популяций с учетом Европейского коэффициента населения (ВОЗ, 1996 World Health Statistics, Женева). Для определения достоверности различий применялся критерий t доверительного интервала для интенсивных показателей. Уровень $p < 0,05$ был расценен как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Заболеваемость. В 2009 г. заболеваемость инсультом среди мужчин г. Южно-Сахалинска превышала данный показатель в г. Иркутске (таблица). С 2009 по 2014 г. заболеваемость у мужчин несколько уменьшилась в г. Иркутске ($p > 0,05$) и значимо снизилась в г. Южно-Сахалинске ($p < 0,05$), при этом в изучаемых регионах в 2014 г. заболеваемость инсультом у мужчин демонстрировала схожие значения. Заболеваемость инсультом в г. Иркутске в 2009 г. у женщин была в 1,5 раза меньше, чем у мужчин, с тенденцией к снижению в 2014 г. ($p < 0,05$). В г. Южно-Сахалинске заболеваемость у женщин также была ниже, чем у мужчин, но с различием в 2,3 раза, и несколько уменьшилась в 2014 г. ($p < 0,05$). Таким образом, за исследуемый период прослеживалась устойчивая тенденция к снижению заболеваемости среди женщин обоих регионов, а также среди мужчин г. Южно-Сахалинска. Достоверно значимое снижение заболеваемости зарегистрировано только среди мужчин г. Южно-Сахалинска.

В 2009 г. Иркутская и Сахалинская области, наряду с другими регионами Российской Федерации, вступили во Всероссийскую программу реорганизации оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения, проводимую согласно Приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 июля 2009 г. № 389 «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения». В Иркутской и Сахалинской областях был проведен комплекс мероприятий, направленных на предотвращение развития инсульта. Результатом комплексных мер по первичной профилактике инсульта стало уменьшение показателя заболеваемости среди мужского и женского населения изучаемых популяций. Несмотря на то что статистически достоверное снижение заболеваемости инсультом зарегистрировано только среди мужчин г. Южно-Сахалинска, проведенная междисциплинарная работа в разных сферах управления инсультом, в том числе и на популяционном уровне, продемонстрировала свою эффективность. Ярким примером управления факторами риска развития инсульта явилось уменьшение распространенности курения. Так, в г. Южно-Сахалинске у мужчин последняя снизилась с 58 до 41 %, среди женщин – с 18 до 4 %; в Иркутске – с 52 до 16 % среди мужчин и с 6 до 1 % среди женщин. В изучаемых регионах увеличилось выявление основных факторов риска инсульта, таких как артериальная гипертензия, сахарный диабет и дислипотеинемия. Про-

Таблица

Количество случаев инсульта, численность исследуемой популяции, динамика показателей заболеваемости и смертности от инсульта среди мужчин и женщин в возрастной группе 25–74 года (стандартизация на 1000 населения)

Пол	Регион	Первичные инсульты/ численность населения		Заболеваемость (95%-й ДИ)		Динамика, % 2009/2014	Смертность (95%-й ДИ)		Динамика, % 2009/2014
		2009 г.	2014 г.	2009 г.	2014 г.		2009 г.	2014 г.	
Мужской	Южно-Сахалинск	206/52 914	212/61 762	4,43 (4,14–4,72)	3,40 (3,17–3,63)	-23*	1,68 (1,50–1,86)	0,79 (0,68–0,9)	-53**
	Иркутск	188/49 625	166/50 101	3,97 (3,61–4,17)	3,29 (3,01–3,75)	-17	1,11 (0,98–1,23)	0,59 (0,48–0,79)	-47**
Женский	Южно-Сахалинск	128/63 287	140/70 169	1,87 (1,17–2,63)	1,68 (1,53–1,83)	-11	0,34 (0,27–0,41)	0,42 (0,34–0,51)	+26*
	Иркутск	192/63 843	159/63 757	2,62 (2,34–2,98)	2,20 (2,00–2,61)	-16 $p > 0,05$	0,53 (0,45–0,76)	0,22 (0,17–0,34)	-58**

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей в 2009 г.: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$.

спективные исследования эпидемиологии инсульта, проводимые в экономически развитых странах мира, подтверждают отсроченный эффект мероприятий по первичной профилактике инсульта [6]. Первичная профилактика требует масштабной работы и на уровне организации здравоохранения, и на популяционном уровне, включающем повышение медицинской грамотности населения.

Смертность. В 2009 г. смертность среди мужчин г. Иркутска была в 1,5 раза меньше, чем среди мужчин г. Южно-Сахалинска, при этом показатель продемонстрировал схожее снижение на 47 и 53 % ($p < 0,01$) соответственно (см. таблицу). В 2009 г. в Иркутске смертность среди женщин была в 2 раза меньше, чем среди мужчин, и в течение 6-летнего периода снизилась на 58 % (см. таблицу). В г. Южно-Сахалинске смертность среди женщин была в 5 раз ниже по сравнению с мужчинами и в 2 раза – по сравнению с женщинами г. Иркутска. При этом в 2014 г. зарегистрировано увеличение показателя смертности от инсульта среди женщин г. Южно-Сахалинска по сравнению с 2009 г. ($p < 0,05$). Низкий показатель смертности среди женщин Южно-Сахалинска в 2009 г. не отражал истинной картины, вероятно, в виду недостаточной диагностики инсульта именно среди женского населения.

На рисунке представлена динамика смертности от инсульта среди женщин Южно-Сахалинска, демонстрирующая ее неустойчивый характер. Так, период 2010–2012 гг. характеризовался ростом показателя смертности, в 2013–2014 гг. наметилось снижение. В 2009 г. лечение инсульта в специализированном стационаре получали 86 % женщин Южно-Сахалинска, что меньше, чем у мужчин данного региона (94 %), а также у мужчин и женщин г. Иркутска (95 % – женщины, 97 % – мужчины). Диагностика инсульта с помощью КТ/МРТ проводилась в 2009 г. среди женщин г. Южно-Сахалинска в 77 % случаев инсульта, в Иркутске – в 86 %. Средний возраст развития инсульта у женщин Южно-Сахалинска составлял $71,0 \pm 0,7$ года, в то время как у мужчин он был меньше на 4 года ($65,8 \pm 0,7$), что предполагает большую соматическую отягощенность у женщин. Кроме того, пожилые женщины чаще проживали одни, что осложняло своевременную госпитализацию и, соответственно, диагностику инсульта. Подобная социальная тенденция наблюдалась во многих странах мира [7]. Поэтому необходимо усилить просветительскую работу среди населения старших возрастных групп. Мероприятия по реорганизации помощи больным инсультом в г. Южно-Сахалинске способствовали выявлению случаев инсульта среди женского

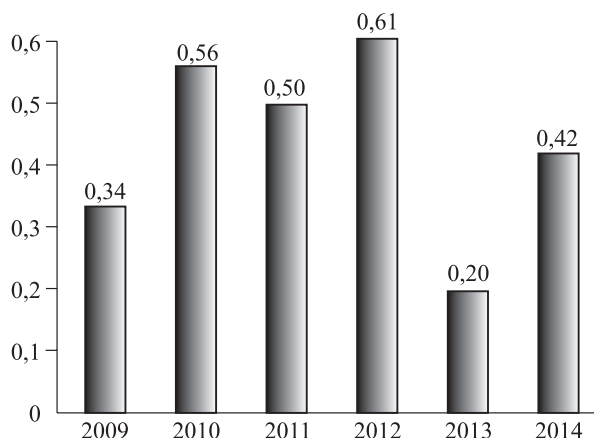


Рис. Динамика показателей смертности от инсульта, стандартизованных на 1000 населения, среди женщин г. Южно-Сахалинска в возрасте 25–74 года с 2009 по 2014 г.

населения города, и в течение 6-летнего периода наметились изменения, способствующие максимально возможной диагностике инсульта среди женщин (рисунок). Исходя из этого, необходимо исследование факторов риска развития инсульта среди женщин Южно-Сахалинска с учетом социальных особенностей, а возможно, и с учетом этнических особенностей, поскольку азиатская часть популяции является в Южно-Сахалинске значимой. Известны исследования эпидемиологии инсульта среди лиц азиатской национальности, подтвердившие наличие у них особенностей развития и характера инсульта. На территории Сахалинской области исследования в данном направлении не проводились [9].

Как в Сахалинской, так и в Иркутской области зарегистрированы более высокие показатели смертности от инсульта среди мужчин. Изучение гендерных различий является формирующейся областью изучения факторов риска и управления инсультом, однако ряд исследований показывает, что гендерные различия в эпидемиологии инсульта сопоставимы между странами и в большей степени обусловлены доступом к специализированному лечению [3, 12]. Следовательно, необходимо продолжить изучение инсульта в данной популяции, чтобы понять уровень максимального «разрыва» в показателях заболеваемости и смертности среди мужчин и женщин в свете современного управления инсультом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование динамики основных клинико-эпидемиологических параметров инсульта, проведенное методом территориально-популяционного регистра в городской

популяции мужчин и женщин в возрастной группе 25–74 года в Иркутской и Сахалинской областях, показало эффективность комплексных мероприятий по управлению инсультом в регионах, расположенных в восточной части Российской Федерации. Результаты проведенного исследования продемонстрировали общие черты динамики показателей заболеваемости и смертности от инсульта в двух этих регионах и выявили определенные региональные отличия. По итогам 6-летнего исследования выявлено снижение показателя заболеваемости среди мужчин г. Южно-Сахалинска, а также двукратное снижение показателя смертности среди мужчин и женщин Иркутской области и мужчин Сахалинской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Регистр инсульта: Методические рекомендации по проведению исследования. М., 2000. 50 с.
2. Салдина И.Ю., Клочихина О.А., Шпрах В.В., Стаховская Л.В. Эпидемиология инсульта в Иркутске по данным территориально-популяционного регистра // Журн. неврологии и психиатрии. 2015. (9-2). 15–19.
3. Arnao V., Acciarresi M., Cittadini E., Caso V. Stroke incidence, prevalence and mortality in women worldwide // Int. J. Stroke. 2016. 11. 287–301.
4. Ezejimofor M.C., Chen Y.F., Kandala N.B., Ezejimofor B.C., Ezeabasili A.C., Stranges S., Uthman O.A. Stroke survivors in low- and middle-income countries: a meta-analysis of prevalence and secular trends // J. Neurol. Sci. 2016. 364. 68–76.
5. GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // Lancet Neurol. 2017. 16. (11). 877–897.
6. Gbiri C.A., Olawale O.A., Isaac S.O. Stroke management: Informal caregivers' burdens and strains of caring for stroke survivors // Ann. Phys. Rehabil. Med. 2015. 58. (2). 98–103.
7. Haast R.A., Gustafson D.R., Kiliaan A.J. Sex differences in stroke // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2012. 32. (12). 2100–2107.
8. Halperin S.A., Bettinger J.A., Greenwood B., Harrison L.H., Jelfs J., Ladhani S.N., McIntyre P., Ramsay M.E., Safadi M.A. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease // Vaccine. 2012. 30. (Suppl. 2). 26–36.
9. Klochikhina O.A., Shprakh V.V., Vinogradova T.E. et al. Study on stroke epidemiology in open population of 25–74 year-old men and women in a large city, Republic of Buryatia // J. Neurol. 2003. 250. (Suppl. 2). P694.
10. Lyngberg A.C., Rasmussen B.K., Jorgensen T., Jensen R. Has the prevalence of migraine and tension-type headache changed over a 12-year period? A Danish population survey // Eur. J. Epidemiol. 2005. 20. (3). 243–249.
11. Prince M., Ali G.C., Guerchet M., Prina A.M., Albanese E., Wu Y.T. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia // Alzheimers Res. Ther. 2016. 8. (1). 23.
12. Rothwell P.M., Coull A.J., Giles M.F., Howard S.C., Silver L.E., Bull L.M., Gutnikov S.A., Edwards P., Mant D., Sackley C.M., Farmer A., Sandercock P.A., Dennis M.S., Warlow C.P., Bamford J.M., Anslow P. Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study) // Lancet. 2004. 363. 1925–1933.

THE STROKE: COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF IRKUTSK AND SAKHALINSK REGIONS

Vladimir Viktorovich SHPRAKH¹, Lyudmila Vital'evna STAKHOVSKAYA²,
Ol'ga Anatol'evna KLOCHIKHINA², Tatyana Ivanovna SURZHA³,
Oleg Alexeevich STRAKHOV⁴

¹*Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education –
Affiliation of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education
of Minzdrav of Russia
664049, Irkutsk, microdistrict Yubileyny, 100*

²*Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov of Minzdrav of Russia
117997, Moscow, Ostrovyanova str., 1*

³*Yuzhno-Sakhalinsk Regional Hospital
693004, Yuzhno-Sakhalinsk, Mira str., 430*

⁴*Moscow University for Industry and Finance «Synergy»
129090, Moscow, Meschanskaya str., 9/14, bldg. 1*

The prospecting multicenter population-based stroke research provides scientific, medical and economic interests as a priority area for the study of stroke. **The aim of study** – to investigate and compare the dynamics of the stroke incidence and mortality in the Irkutsk and Sakhalin regions. **Material and methods.** The stroke study has been carried out in the Sverdlovsk district of Irkutsk and Yuzhno-Sakhalinsk for 2009–2014 using the population-based register method, according to the protocol of the international training course MONICA (1985–1995). In the regions studied, data collection was carried out in a uniform manner by unvarying researchers team during the 6-year period. The diagnosis of stroke met the criteria of ICD 10 revision. The diagnosis was established on the basis of CT/MRI and/or autopsy in the event of a lethal outcome. All cases of acute stroke (the first 28 days from the disease onset) that occurred in the studied populations in the age group 25–74 years were recorded and analyzed. The analysis involved 2196 cases of stroke in Irkutsk and 2619 cases of stroke in Yuzhno-Sakhalinsk. **Results.** In 2009 the incidence of stroke among men was 4.43 cases per 1000 in Yuzhno-Sakhalinsk and 3.97 cases in Irkutsk. During 2009 to 2014, the incidence rate among men decreased by 17 % in Irkutsk ($p > 0.05$) and by 23 % in Yuzhno-Sakhalinsk. The incidence of stroke among women in Irkutsk dropped by 16 % ($p > 0.05$), in Yuzhno-Sakhalinsk – by 11 % ($p > 0.05$). The mortality rate from stroke among men was 1.11/1000 in Irkutsk, 1.68/1000 in Yuzhno-Sakhalinsk in 2009, the indicator showed a similar decrease of 47 and 53 % in 2014 ($p < 0.01$). The death rate also decreased among women in Irkutsk by 58 % ($p < 0.01$) and increased by 26 % ($p < 0.05$ among women in Yuzhno-Sakhalinsk). Since 2009 the reorganization of care for patients with stroke was carried out in the regions studied within the framework of a unified national program, the results of the study were the criterion of the effectiveness of the integrated program. **Conclusion.** The comparison study of stroke incidence and mortality rate in the urban population among men and women in the 25–74 age group of the Irkutsk and Sakhalin regions demonstrated the effectiveness of integrated stroke management activities in two regions located in the Eastern part of the country. The results of the study showed general dynamics features of incidence and mortality from stroke and drew attention to the regional specific features of the stroke occurrence and course.

Key words: stroke, incidence rate, mortality rate, Irkutsk region, Sakhalinsk region.

Shprakh V.V. – doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: irkmapo@irk.ru

Stakhovskaya L.V. – doctor of medical sciences, professor, director

Klochikhina O.A. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: o.klochikhina@mail.ru

Surzha T.I. – neurologist, e-mail: sakh-nevro@mail.ru

Strakhov O.A. – candidate of technical sciences, head of department of information management and information-communication technologies n.a. V.V. Dik, e-mail: ostrakhov@synergy.ru