УДК 577.218 DOI: 10.15372/SSMJ20180301

ПОИСК РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ARE В ГЕНАХ ОСНОВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ АУТОФАГИИ И ЛИЗОСОМАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА TFEB И TFE3

Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ, Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА

НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Главные регуляторы лизосомального биогенеза и аутофагии транскрипционные факторы TFEB и TFE3 контролируют большинство генов белков, участвующих в формировании лизосом, посредством взаимодействия с промоторами этих генов, содержащих регуляторный мотив CLEAR. Их активация строго регулируема и происходит в ответ на нарушение лизосомального гомеостаза и повреждающие воздействия на клетки. Подобные воздействия сопровождаются активацией редокс-процессов и индукцией редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. Таким образом, возникает вопрос о наличии регуляторных связей между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR. Для поиска последовательности ARE в генах *TFEB* и *TFE3* была сформирована позиционная матрица на основании описанных в литературе 57 функциональных последовательностей ARE. ARE-подобные последовательности были маркированы в геномном браузере UCSC для анализа эволюционной консервативности, солокализации с различными функциональными модификациями ДНК и хроматина, а также с другими регуляторными элементами. В гене *TFEB* человека обнаружено 15 ARE-подобных мотивов. Из них последовательность, расположенная в первом интроне, является консервативной среди позвоночных животных. В гене *Tfeb* мыши также обнаружено 15 ARE-подобных мотивов, один из которых является консервативным, но располагается в экзоне на кодирующей стороне. Гены транскрипционного фактора TFE3 человека и мыши содержат меньше ARE-подобных последовательностей, среди них обращает на себя внимание консервативная среди позвоночных последовательность, расположенная во втором интроне. На основании данных ChIP-seq базы ENCODE проанализирован гистоновый ландшафт в соответствующих областях генома и установлено, что, вероятно, эволюционно консервативный регуляторный элемент ARE, расположенный в энхансерной области гена *TFE3*, играет функциональную роль.

Ключевые слова: система Keap1/Nrf2/ARE, лизосомальный биогенез, аутофагия, TFEB, TFE3.

Центральным регулятором свободнорадикальных процессов является фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), контролирующий экспрессию генов, содержащих в своих промоторах антиоксидант-респонсивный элемент ARE (antioxidant respons(iv)e element, 5′-A/GTGA(C/T)nnnGCA/G-3′). В клетках Nrf2 находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1), являющегося своеобразным молекулярным «сенсором» изменения внутриклеточного гомеостаза. Неразрывная связь этих молекулярных структур позволяет объединить их в единую редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях [1, 6]. ARE контролирует экспрессию более 500 генов, среди которых можно выделить следующие группы: кодирующие ферменты II фазы метаболизма ксенобиотиков, кодирующие антиоксидантные ферменты и кодирующие белки, которые координируют устранение последствий окислительного стресса, в частности, относящиеся к убиквитин-протеасомной системе, аутофагии и биогенезу митохондрий [2, 5, 7, 8, 14].

В настоящее время все больше внимания уделяется регуляторной связи аутофагии и сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. Обе эти системы

Чечушков А.В. *– научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: achechushkov@gmail.com*
Меньщикова Е.Б. *– д.м.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@centercem.ru*

по отдельности рассматриваются различными коллективами авторов в контексте патогенеза нейродегенеративных заболеваний. В последнее время началось накопление сведений о том, что Kea1/Nrf2/ARE участвует в контроле генов селективной аутофагии (например, генов белков p62/SQSTM, NDP52 и Parkin1). С другой стороны, недавно был описан механизм индукции Keap1/Nrf2/ARE, обусловленный не окислением белка Keap1, а его связыванием с белком p62/SQSTM с образованием агрегатов Keap1/p62, что в свою очередь увеличивает активность Nrf2 [8].

Одновременное увеличение экспрессии гена p62/SQSTM, опосредуемое активностью Nrf2, дополнительно повышает интенсивность связывания Keap1, что образует петлю положительной обратной связи в механизме активации Nrf2. Лимитирующую функцию в этом механизме (негативная обратная связь) выполняет аутофагия, удаляя агрегаты белка p62, таким образом предотвращая дальнейшее связывание Keap1. В то же время закономерности этого процесса изучены плохо. Влияние же Nrf2 на данную сторону процесса до сих пор не описано. Мы считаем, что такое влияние вполне вероятно, принимая во внимание стимуляцию аутофагии активными формами кислорода, окисляющими цистеиновые остатки белков-эффекторов аутофагии, а также существенное влияние активности аутофагии на их генерацию клетками.

Изучая возможные белки-регуляторы аутофагии, мы обратили внимание на главные регуляторы лизосомального биогенеза и аутофагии – транскрипционные факторы TFEB и TFE3, которые контролируют большинство генов белков, участвующих в формировании лизосом, а также ликвидации содержимого аутофагосом. Их активация строго регулируема и происходит в ответ на нарушение лизосомального гомеостаза и повреждающие воздействия на клетки. При анализе структур генов этих белков нами были обнаружены ARE-подобные элементы, которые могут иметь регуляторное влияние на их активность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для установления возможности обнаружить регуляторные связи между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR мы проверили наличие элементов ARE в генах транскрипционных факторов TFEB и TFE3 человека и мыши. Для поиска последовательности ARE в интересующих генах была сформирована позиционная матрица (Position Frequency Matrix) на основании описанных в литературе 57 функциональных последовательностей ARE, которые были обнаружены экспериментальными методами, исследующими взаимодействие ДНК и белка (анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA), ДНКаза-футпринтинг, генные конструкции «промотор – репортер») [16]. Обнаружение последовательности проводилось с помощью программного пакета RSAT [4, 13].

На предмет наличия ARE-подобных элементов были проанализированы последовательности генов *TFEB* и *TFE3* человека и мыши (последовательности взяты из GenBank). Для анализа использовали последовательности с добавлением по 5000 пар нуклеотидов до и после окончания рамок считывания гена. Полученные ARE-подобные последовательности были маркированы в геномном браузере UCSC для анализа эволюционной консервативности, солокализации с различными функциональными модификациями ДНК и хроматина, а также с другими регуляторными элементами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для контроля качества собранная позиционная матрица была проверена на нуклеотидной последовательности гена *Mafg* мыши, в котором локализован мотив ARE с экспериментально подтвержденной функциональной значимостью [3, 10]. Выявлена соответствующая описанной в литературе последовательность TCATGCTGACTCAGCGGATCG с уровнем значимости $1{,}4 \times 10^{-6}$.

В гене *TFEB* человека обнаружено 15 ARE-подобных мотивов. Из них последовательность (условно обозначенная нами как ARE_tfeb), расположенная в первом интроне, является консервативной среди позвоночных животных. В гене *Tfeb* мыши также обнаружено 15 ARE-подобных мотивов (рис. 1). Один из них является консервативным, но располагается в экзоне на кодирующей стороне. Таким образом, консервативность данной последовательности может быть связана с консервативностью структуры белка. Еще одна высококонсервативная последовательность расположена в первом интроне и совпадает с аналогичной последовательностью человека.

Таким образом, последовательность ARE_tfeb представляет наибольший интерес, так как располагается в некодирующей части гена *TFEB* и является высококонсервативной. В литературе до настоящего момента наличие подобной регуляторной последовательности не описано.

Гены транскрипционного фактора TFE3 человека и мыши содержат меньше ARE-подобных последовательностей (рис. 2). Среди них обращает на себя внимание консервативная среди

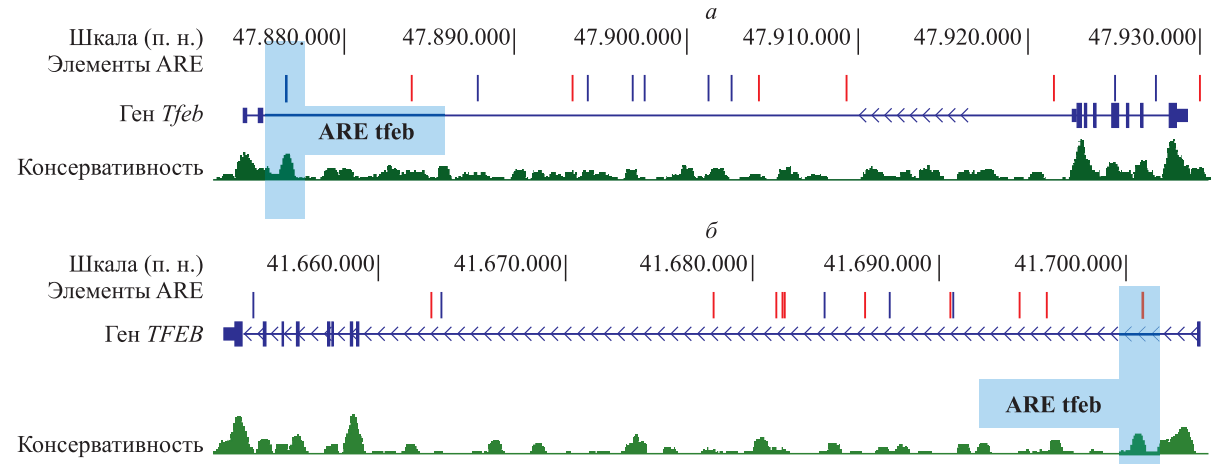

Рис. 1. *Локализация последовательностей ARE в области гена Tfeb мыши (а) и человека (б). Гистограмма характеризует уровень консервативности соответствующих последовательностей среди позвоночных животных (получены с помощью инструмента PhastCons)*

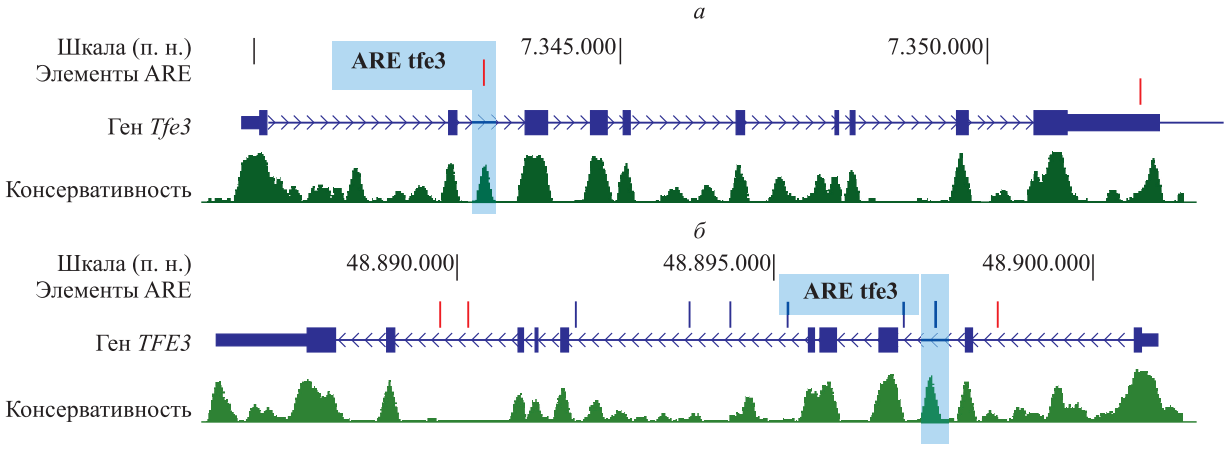

Рис. 2. *Локализация ARE в области гена Tfe3 мыши (а) и человека (б). Гистограмма характеризует уровень консервативности соответствующих последовательностей среди позвоночных животных (получены с помощью инструмента PhastCons)*

позвоночных последовательность, расположенная во втором интроне и обозначенная нами как ARE_tfe3.

Для понимания функциональной роли последовательностей ARE_tfeb и ARE_tfe3 на основании данных ChIP-seq базы ENCODE [15] был проанализирован гистоновый ландшафт в соответствующих областях генома. Участок локализации последовательности ARE_tfeb характеризуется высокой частотой триметилирования H3K3me3 и, следовательно, может быть отнесен к промоторной области гена. В то же время анализ данных о связывании с данной областью гена транскрипционных факторов семейства NFE2 (к которому принадлежит и Nrf2), а также других белков (Bach1 и MAF), взаимодействующих с мотивом ARE, не обнаруживает сигнала локализации этих транскрипционных факторов. Таким образом, очевидно, что данная ARE-последовательность не играет функциональной роли, а консервативность этой области генома связана с большой плотностью регуляторных элементов для других транскрипционных факторов, необходимых для регуляции экспрессии гена, кодирующего TFEB.

Аналогичный анализ гистоновых модификаций для области локализации мотива ARE_tfe3 обнаруживает высокую частоту ацетилирования лизина 27 гистона H3 (модификация H3K27Ac) и метилирования лизина 4 гистона H3 (H3K4Me1), фланкирующих указанную регуляторную область, что характерно для энхансерных областей генов [12] (рис. 3). В то же время для данного мотива характерно связывание транскрипционных факторов Bach1, MAF и NFE, а также белков, взаимодействующих с Nrf2: JunD, FOSL2, FOS.

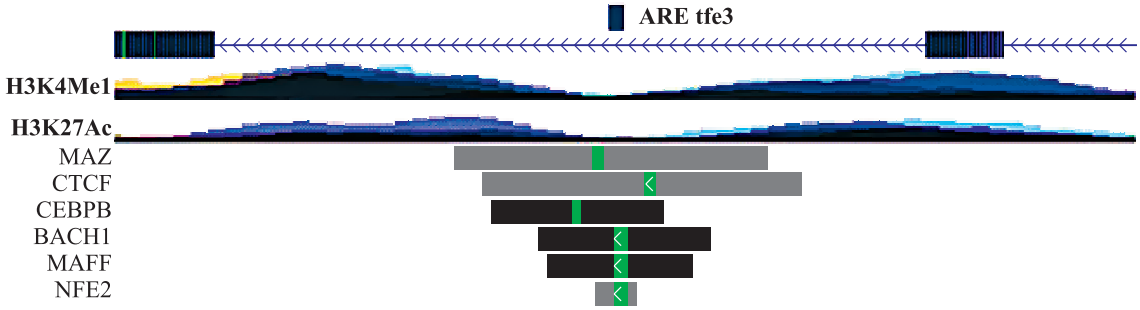

Рис. 3. *Гистоновые модификации (H3K4Me1 и H3K27Ac) областей связывания различных транскрипционных факторов в области ARE_tfe3*

Кроме того, рядом с мотивом ARE_Tfe3 располагаются мотивы связывания транскрипционных факторов CEBPB, CTCF и MAZ, локализация которых также является консервативной. Поэтому можно предположить, что в регуляции активности гена *TFE3* играет роль весь комплекс указанных регуляторных мотивов.

Регуляторные элементы генов зачастую являются частью мобильных элементов, и потому могут встраиваться или удаляться в различных участках генома относительно быстро в масштабах времени биологической эволюции. В то же время удаление функционально значимых последовательностей может сопровождаться существенными нарушениями функционирования гена и патологиями организма, поэтому такие участки являются консервативными среди близкородственных групп животных [9, 11].

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что для генов тесно взаимосвязанных транскрипционных факторов TFEB и TFE3 характерно наличие в некодирующих участках большого количества ARE-подобных последовательностей. Положение большей части из них не сохраняется в филогенетическом ряду и они, вероятно, не играют функциональной роли (хотя это утверждение носит умозрительный характер). Наибольшей значимостью обладают ARE-подобные элементы, для которых характерна эволюционная консервативность как положения относительно других регуляторных элементов и структуры гена, так и последовательности нуклеотидов. Важной особенностью обнаруженных ARE-подобных элементов является сохранение в них консенсусного ядра мотива TGAcnnnGC, указывая на то, что они действительно могут быть отнесены к элементам типа ARE. При этом отсутствие консервации для большинства из обнаруженных последовательностей, вероятно, связано с их низкой функциональной значимостью или отсутствием таковой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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.

2. *Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress // Biochim. Biophys. Acta. 2018. 1865. (5). 721–733.

3. *Cheng Q., Kalabus J.L., Zhang J., Blanco J.G.* A conserved antioxidant response element (ARE) in the promoter of human carbonyl reductase 3 (CBR3) mediates induction by the master redox switch Nrf2 // Biochem. Pharmacol. 2012. 83. (1). 139–148.

4. *Defrance M., Janky R., Sand O., van Helden J.* Using RSAT oligo-analysis and dyad-analysis tools to discover regulatory signals in nucleic sequences // Nat. Protoc. 2008. 3. (10). 1589–1603.

5. *Dikic I.* Proteasomal and autophagic degradation systems // Annu. Rev. Biochem. 2017. 86. 193–224.

6. *Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T.* The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism // Trends Biochem. Sci. 2014. 39. (4). 199–218.

7. *Holmstrom K.M., Kostov R.V., Dinkova-Kostova A.T.* The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function // Curr. Opin. Toxicol. 2016. 1. 80–91.

8. *Liu W.J., Ye L., Huang W.F., Guo L.J., Xu Z.G., Wu H.L., Yang C., Liu H.F.* p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation // Cell. Mol. Biol. Lett. 2016. 21. 29.

9. *Lowdon R.F., Jang H.S., Wang T.* Evolution of epigenetic regulation in vertebrate genomes // Trends Genet. 2016. 32. (5). 269–283.

10. *Nerland D.E.* The antioxidant/electrophile response element motif // Drug Metab. Rev. 2007. 39. (1). 235–248.

11. *Pearson R.G*. Reasons to conserve vature // Trends Ecol. Evol. 2016. 31. (5). 366–371.

12. *Pennacchio L.A., Bickmore W., Dean A., Nobrega M.A., Bejerano G*. Enhancers: five essential questions // Nat. Rev. Genet. 2013. 14. (4). 288–295.

13. *Sand O., Thomas-Chollier M., Vervisch E., van Helden J*. Analyzing multiple data sets by interconnecting RSAT programs via SOAP Web services: an example with ChIP-chip data // Nat. Protoc. 2008. 3. (10). 1604–1615.

14. *Vomund S., Schafer A., Parnham M.J., Brune B., von Knethen A*. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses // Int. J. Mol. Sci. 2017. 18. (12).

15. *Wang J., Zhuang J., Iyer S., Lin X.Y., Greven M.C., Kim B.H., Moore J., Pierce B.G., Dong X., Virgil D., Birney E., Hung J.H., Weng Z*. Factorbook. org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium // Nucleic Acids Res. 2013. 41. (Database issue). D171–D176.

16. *Wang X., Tomso D.J., Chorley B.N., Cho H.Y., Cheung V.G., Kleeberger S.R., Bell D.A*. Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome // Hum. Mol. Genet. 2007. 16. (10). 1188–1200.

SEARCH FOR ARE REGULATORY SEQUENCES IN GENES OF MASTER REGULATORS OF AUTOPHAGY AND LYSOSOMAL BIOGENESIS TFEB AND TFE3

Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV, Elena Bronislavovna MENSHCHIKOVA

Research Institute for Experimental and Clinical Medicine of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

Transcription factors TFEB and TFE3 are the master regulators of lysosomal biogenesis and autophagy and control most of the protein genes involved in the formation of lysosomes by interacting with the promoters of these genes containing the regulatory motif CLEAR. Their activation is strictly regulated and occurs in response to the violation of lysosomal homeostasis and cell damage. Such effects are accompanied by activation of redox processes and by induction of the redox-sensitive signal system Keap1/Nrf2/ARE, the main purpose of which is to maintain internal homeostasis in apoptosis-inducing, carcinogenic and stressful influences. Thus, the question arises about the existence of regulatory loops between the Keap1/Nrf2/ARE and TFEB(TFE3)/CLEAR signaling systems. To search for the ARE sequence in the TFEB and TFE3 genes, a position frequency matrix was generated based on the 57 functional ARE sequences described in the literature. ARE-like sequences were labeled in the UCSC genome browser for analysis of evolutionary conservation, colocalization with various functional DNA and chromatin modifications, as well as with other regulatory elements. In the human *TFEB* gene, 15 ARE-like motifs were found. Of these, the sequence located in the first intron is conserved across vertebrates. In the mouse *Tfeb* gene, 15 ARE-like motifs were also found; one of them is conserved, but is located in the coding exon. Human and mouse transcription factor TFE3 genes contain less ARE-like sequences, among them the sequence conserved across vertebrate is noteworthy, which is located in the second intron. Using the ChIP-seq data from the ENCODE database, the histone landscape in the respective regions of the genome was analyzed and it was established that the evolutionarily conserved ARE regulatory element located in the *TFE3* enhancer region likely play a functional role.

Key words: Keap1/Nrf2/ARE system, lysosomal biogenesis, autophagy, TFEB, TFE3.

Chechushkov A.V. *– researcher of laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: achechushkov@gmail.com*
Menshchikova E.B. *– doctor of medical sciences, head of the laboratory of molecular mechanisms of free radical processes, e-mail: lemen@centercem.ru*

УДК 577.112.856:579.252.5:616 DOI: 10.15372/SSMJ20180302

ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ ТИРОКСИНА С ФРАКЦИЯМИ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-I

Лев Михайлович ПОЛЯКОВ, Роман Александрович КНЯЗЕВ, Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Наталия Викторовна ТРИФОНОВА, Мария Владимировна КОТОВА

НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Целью исследования было изучение способности различных фракций липопротеинов плазмы крови человека (очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП) подфракций 2 ($ЛПВП_2$) и 3 ($ЛПВП_3$)) связываться с тироксином (T_4). Методами хроматографии на сефарозе CL-2B показано, что значительная часть меченого ^{125}I-тироксина элюируется в объеме выхода фракции ЛПВП, что может свидетельствовать о возможности образования комплексов ЛПВП с T_4. Процесс носил обратимый характер, поскольку введение в данную систему избыточного количества (10^{-6}–10^{-7} М) немеченого T_4 приводило к вытеснению ^{125}I-T_4 из комплексов с ЛПВП, что свидетельствует о взаимодействии типа «белок – лиганд». Исследовано влияние условий среды на образование комплексов T_4 с ЛПВП. Повышение температуры до 40 °С приводило к более чем 50%-му снижению выхода радиоактивности с фракцией ЛПВП. Комплексообразование уменьшалось при 4 °С, однако при этом комплексы отличались наибольшей устойчивостью. Методом тушения триптофановой флуоресценции получены основные физико-химические характеристики взаимодействия T_4 с подфракциями $ЛПВП_2$, $ЛПВП_3$. Константы комплексообразования ЛПВП с T_4 составили порядка 10^6–10^7 $М^{-1}$. Наибольшее сродство к T_4 обнаружено для частиц подфракции $ЛПВП_3$. Установлено, что в комплексообразовании с T_4 принимает участие основной белковый компонент ЛПВП – аполипопротеин А-I, у которого имеется один центр связывания.

Ключевые слова: липопротеины высокой плотности, тироксин, аполипопротеин А-I.

Тиреоидные гормоны (тироксин и трийодтиронин) необходимы для нормального роста и развития организма. Их основная часть находится вне щитовидной железы, причем более 99 % циркулирующих в крови тиреоидных гормонов связана с белками плазмы, главным образом с тироксинсвязывающим глобулином, тироксинсвязывающим преальбумином (транстиретином) и альбумином у человека, а также с транстиретином и альбумином у грызунов [6]. В количественном отношении более важен тироксинсвязывающий глобулин, который представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 50 кДа. На его долю приходится 75 % тироксина (T_4) и 85 % трийодтиронина (T_3), которые связываются с ним со сродством, в 100 раз превышающим таковое для транстиретина [5]. Роль белков-переносчиков в процессах транспорта тиреоидных гормонов заключается в предупреждении потери гормонов через почки и печень. Свободная фракция тиреоидных гормонов крайне мала и составляет 0,03 % для T_4 и 0,3 % для T_3. Однако именно это небольшое количество свободных гормонов определяет их биологическую активность. Несмотря на большую разницу в концентрации общих гормонов (связанных и несвязанных) в сыворотке крови (80 нг/мл для T_4 и 1,5 нг/мл для T_3), различное сродство белков-переносчиков к тиреоидным гормонам обеспечивает близкую их концентрацию в несвязанной, активной форме [5, 7].

Поляков Л.М. *– д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail: plm@niibch.ru*
Князев Р.А. *– к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru*
Рябченко А.В. *– к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: borrelia@mail.ru*
Трифонова Н.В. *– младший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru*
Котова М.В. *– младший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: zerokiri@mail.ru*

По аналогии со стероидными гормонами молекулярные механизмы различных проявлений тиронинов объясняет гипотеза «свободных гормонов», утверждающая, что биологической активностью обладает только фракция не связанных с белками плазмы гормонов [6]. Однако в последние годы получены экспериментальные доказательства, что клеточный приток и отток тиреоидных гормонов происходит при участии трансмембранных белковых транспортеров: монокарбоксилатных транспортеров (MCT8), (MCT10) и транспортирующего органического анион-полипептида 1C1 (OATP1C1) [8–10]. Считается, что из этих транспортеров MCT8 является единственным специфичным транспортером для гормонов щитовидной железы и некоторых их производных [3]. Следует заметить, что роль других белков плазмы в транспорте тиреоидных гормонов в ткани-мишени в течение длительного времени была спорной несмотря на отдельные сообщения о способности T_4 образовывать комплексы с липопротеиновыми частицами низкой плотности [2].

Целью исследования было изучение способности различных фракций липопротеинов плазмы крови человека (очень низкой (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП), высокой плотности подфракций 2 ($ЛПВП_2$) и 3 ($ЛПВП_3$)) связываться с тироксином.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выделение фракций липопротеинов из плазмы крови человека проводили методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na_2 на центрифуге OptimaL-90K (Beckman-Coulter, Австрия) с использованием ротора 70.1 Ti. [4]. Получали три основные фракции липопротеинов: ЛПОНП ($0{,}94 < d < 1{,}006$ г/мл), ЛПНП ($1{,}006 < d < 1{,}063$ г/мл) и ЛПВП ($1{,}063 < d < 1{,}21$ г/мл). Фракцию липопротеинов высокой плотности разделяли на два подкласса: $ЛПВП_2$ ($1{,}063 < d < 1{,}125$ г/мл) и $ЛПВП_3$ ($1{,}125 < d < 1{,}21$ г/мл).

Делипидирование липопротеинов проводили охлажденной смесью хлороформа и метанола (1:1) из расчета 20 мл смеси на 1 мл липопротеинов с последующей многократной отмывкой эфиром. Для получения аполипопротеина A-I (апо A-I) суммарные белки ЛПВП в растворе 3%-го додецилсульфата натрия (Ds-Na) и 0,1%-го меркаптоэтанола наносили на колонку (1,6 × 100 см) с сефарозой CL-2B («Pharmacia», Швеция) и элюировали 5мМ Трис-HCl буфером, pH 8,6, содержащим 6М мочевину, 0,01 % азида натрия и 1мМ фенилметансульфонилфторид. Скорость потока – 10 мл/ч, скорость самописца – 9 мм/ч. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 (LKB, Швеция) при длине волны 280 нм. Чистоту апо A-I проверяли с помощью электрофореза в 10 %-м полиакриламидном геле с Ds-Na. Белковые полосы визуализировали 0,1%-м Кумасси G-250 в смеси метанола и 10%-й уксусной кислоты (1 : 1). При электрофорезе апо A-I мигрировал в геле одной полосой и не содержал примесей других белков. В качестве маркеров использовали набор низкомолекулярных белков-стандартов (фосфорилаза – 94 кДа, альбумин – 67 кДа, овальбумин – 43 кДа, карбоангидраза – 30 кДа и лактальбумин – 14,4 кДа).

Фракции ЛП и апо A-I обессоливали методом гель-фильтрации (колонка: 40 × 0,8 см, сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), элюент: 5мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, содержащий 0,15М NaCl, скорость элюции – 30 мл/ч, скорость самописца – 9 см/ч). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Концентрацию белка определяли на спектрофотометре Evolution 300 («ThermoScientific», США) в ЦКП «Спектрометрические измерения» на базе НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (г. Новосибирск). Концентрация белка в обессоленных пробах составляла 0,1 мг/мл.

В работе использовали ^{125}I-T_4 со специфической активностью 750–1250 мКи/мг (Amerham, Великобритания). Рабочий раствор (1 мМ) немеченного L-T_4 (Calbiochem, США) в 96%-м этаноле готовили из 10мМ маточного раствора, содержащего 0,05н NaOH, и охлаждали до –20 °С. После обессоливания фракции ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП (по 0,5 мл, 0,5–1,5 мг белка) смешивали, инкубировали с ^{125}I-T_4 (0,1–0,3 нмоль/л) в течение 30 минут при 20 °С и подвергали хроматографическому разделению на колонке (1,6 × 100 см, сефароза CL-2B), не содержащей 6М мочевину. Полученные фракции анализировали на гамма-счетчике WIZARD-1470 (Wallac, Финляндия) в ЦКП «Современные оптические системы» НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (г. Новосибирск).

Расчет констант ассоциации осуществляли методом тушения триптофановой флуоресценции [1]. Измерения проводили на спектрофлуориметре RF-5301PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 600 нм. Титрование выполняли в термостатируемой кювете при температуре 20 ºС с добавлением аликвот рабочего раствора (1 мМ) немеченного L-T_4 (по 1 мкл) к 2 мл ЛПВП и апо A-I. Концентрация этанола в конце опыта не

превышала 0,5 %. Тушение флуоресценции, обусловленное этанолом, составляло ~5 % от общего снижения флуоресценции и учитывалось при построении соответствующих кривых. Молекулярные массы $ЛПВП_2$, $ЛПВП_3$ и апо A-I принимались за 400, 200 и 28 кДа соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения взаимодействия фракций ЛП (ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП) с тироксином использовали метод хроматографического разделения на колонке с сефарозой CL-2B без присутствия 6М мочевины. Меченый T_4 элюировался двумя основными пиками (рис. 1). Первый пик совпадал с объемом выхода ЛПВП, а второй пик соответствовал объему выхода «свободного» гормона. На фракции ЛПОНП и ЛПНП приходилось менее 10–15 % радиоактивности. Процесс носил обратимый характер. Введение в данную систему избыточного количества (10^{-6}–10^{-7} М) немеченного T_4 приводило к вытеснению ^{125}I-T_4 из комплексов с ЛПВП, что может свидетельствовать об определенном взаимодействии типа «белок – лиганд» (рис. 2). Отмечена зависимость связывания от температуры. Повышение температуры до 40 °С приводило к более чем 50%-му снижению выхода радиоактивности с белком. Образование комплексов несколько уменьшалось при 4 °С, однако при этом они отличались наибольшей устойчивостью. Комплексы ЛПВП-T_4 были довольно устойчивы и не разрушались в процессе хроматографического разделения при физиологических значениях pH. Характерно, что основная часть меченого T_4 связывалась с подфракцией $ЛПВП_3$, а не с $ЛПВП_2$. Данный факт, по нашему мнению, может также свидетельствовать о том, что в подфракциях $ЛПВП_3$ и $ЛПВП_2$ основной структурообразующий частицу белок (апо A-I) находится в конформациях, отличающихся по способности связывать T_4 амфипатными областями полипептидной цепи.

Для анализа взаимодействий типа «белок – лиганд» используются данные спектра поглощения или излучения. Спектральные способы обусловлены различием спектральных характеристик комплексов и транспортирующего «лиганд» белка. Высокая специфичность и чувствительность флуоресцентных методов позволяет широко применять их при изучении подобных процессов. Из трех флуоресцирующих аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) только триптофан дает наиболее богатую информацию о структуре макромолекулы. Считается, что триптофан является естественной «меткой-репортером», поэтому исследование параметров его флуоресценции дает представление о характере микроокружения аминокислоты, его изменениях при определенных воздействиях, в частности, в данном случае при взаимодействии ЛПВП с T_4.

Изучение спектров флуоресценции разных классов липопротеинов показало, что они различаются по форме и по значениям длин волн максимумов. Класс ЛПВП имел самый короткий максимум – 333 нм, у ЛПНП этот показатель был сдвинут на 2 нм в красную область, а у ЛПОНП максимум флуоресценции составлял 338 нм. Интересно, что сам триптофан в водном растворе имел максимум флуоресценции 354 нм. Характерный коротковолновый сдвиг флуоресценции

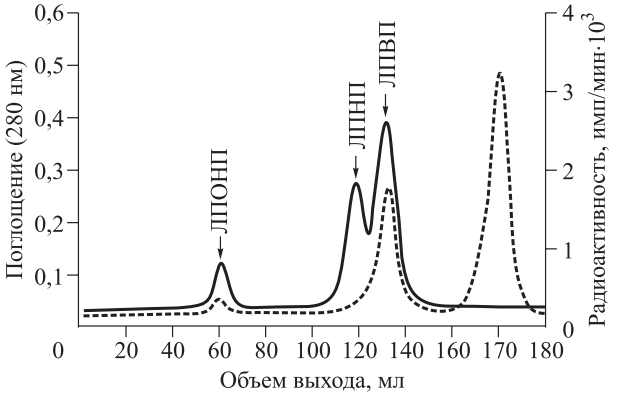

Рис. 1. *Связывание ^{125}I-T_4 с фракциями ЛП плазмы крови человека. Колонка: сефароза CL-2B (1,6 × 100 см). Элюент: 0,05 М Трис/Ац, pH 8,0, 5 мМ ЭДТА. Сплошная линия – поглощение белка при 280 нм. Пунктирная линия – радиоактивность*

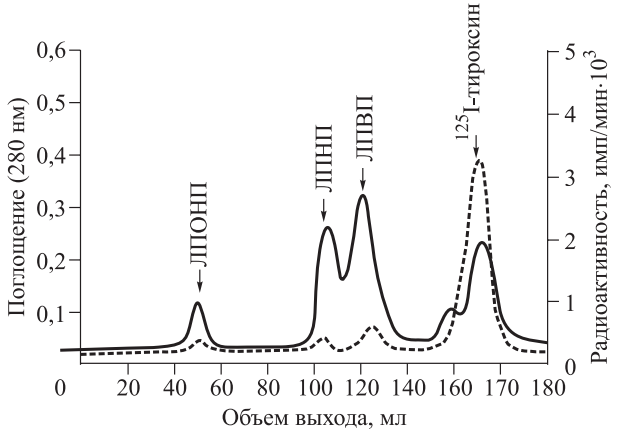

Рис. 2. *Ингибирование связывания ^{125}I-T_4 с ЛПВП плазмы крови человека в присутствии 500-кратного избытка немеченного гормона. Колонка: сефароза CL-2B (1,6 × 100 см). Элюент: 0,05 М Трис/Ац, pH 8,0, 5 мМ ЭДТА. Сплошная линия – поглощение белка при 280 нм. Пунктирная линия – радиоактивность*

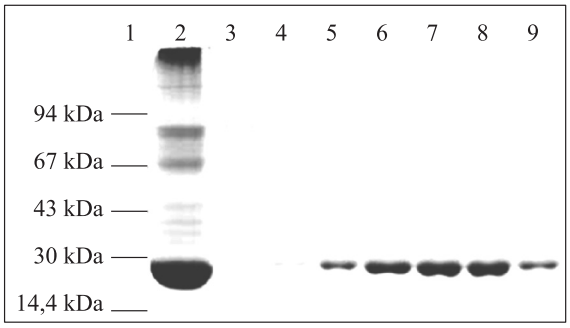

Рис. 3. *Электрофореграмма хроматографической очистки аполипопротеина А-I. 1 – низкомолекулярные белки-стандарты; 2 – суммарные белки ЛПВП; 3–9 – стадии очистки апо А-I*

Таблица

Константы ассоциации и количество центров связывания для фракций ЛПВП и аполипопротеина А-I при взаимодействии с тироксином

Класс ЛП	$K_{асс}$, × 10^6 M^{-1}	Число центров связывания
$ЛПВП_3$	40,0 ± 20,1	5
$ЛПВП_2$	3,60 ± 1,28	3
Апо А-I	6,45 ± 2,11	1

Примечание. Величины $K_{асс}$ представлены как среднее арифметическое величины показателя и его среднеквадратическое отклонение ($M \pm SD$) после серии 4 измерений.

триптофанилов во фракциях липопротеинов можно объяснить особенностями микроокружения: полярного (водного) для раствора триптофана и неполярного (липидного) в структуре белкового компонента липопротеинов.

Во фракции ЛПВП главным и основным структурообразующим компонентом является белок апо А-I. В связи с этим мы изучили взаимодействие T_4 с выделенным из ЛПВП плазмы крови и хроматографически очищенным апо А-I. На электрофореграмме (рис. 3) показаны суммарные белки, входящие в состав ЛПВП, а также стадии хроматографической очистки апо А-I. При электрофорезе белок мигрировал в геле одной полосой с молекулярной массой около 28 кДа, что соответствует литературным данным. Взаимодействие T_4 с фракциями ЛПВП, а также с изолированным апо А-I сопровождалось тушением флуоресценции триптофанилов (рис. 4). При этом форма спектров, их полуширина практически не изменялись. Наблюдался сдвиг на 1–3 нм в коротковолновую область спектра, что объясняется локальными конформационными перестройками белкового компонента ЛПВП после взаимодействия с гормоном. Следует отметить, что для фракции $ЛПВП_3$ наблюдалось наибольшее снижение флуоресценции в точке эквимолярности (60 %), менее выраженным оно было для $ЛПВП_2$ (43 %) и изолированного апо А-I (32 %).

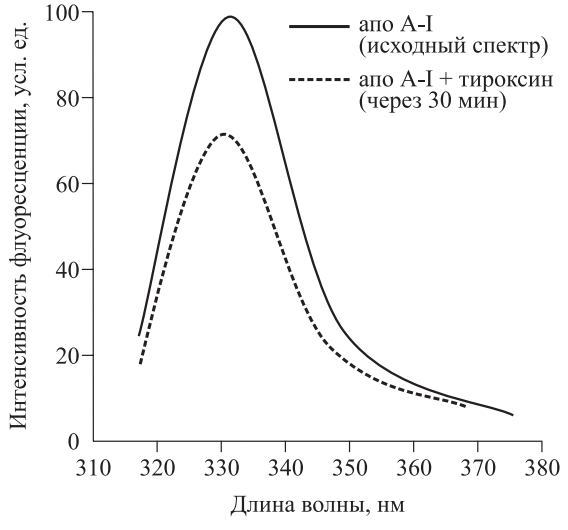

Рис. 4. *Спектры флуоресценции остатков триптофана аполипопротеина А-I при взаимодействии с тироксином*

На основании полученных кривых тушения флуоресценции титрования были рассчитаны величины констант ассоциации и количество центров связывания (таблица). Константа ассоциации комплексов «апо А-I – T_4» оказалась несколько ниже, чем для комплексов «ЛПВП – T_4». Это, по всей вероятности, обусловлено удалением липидов, которые необходимы для стабилизации конформационной структуры апо А-I и придания ему свойств поверхностно-активного соединения. Кроме того, различия в связывании T_4 между $ЛПВП_2$ и $ЛПВП_3$ обусловлены, как мы полагаем, особенностями состава полярной фосфолипидной оболочки этих частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучалась способность различных фракций липопротеинов плазмы крови человека (ЛПОНП, ЛПНП, $ЛПВП_2$ и $ЛПВП_3$) связываться с тироксином (T_4). Методами хроматографии на сефарозе CL-2B показано, что значительная часть меченого ^{125}I-T_4 элюируется в объеме выхода фракции ЛПВП, что может свидетельствовать о возможности образования комплексов ЛПВП с T_4. Процесс носил обратимый характер, поскольку введение в данную систему избыточного количества (10^{-6}–10^{-7} М) немеченного T_4 приводило к вытеснению ^{125}I-T_4 из комплексов с ЛПВП, что может свидетельствовать о взаимодействии типа

«белок – лиганд». Исследовано влияние условий среды на образование комплексов T_4 с ЛПВП. Повышение температуры до 40 °С приводило к более чем 50%-му снижению выхода радиоактивности с фракцией ЛПВП. Образование комплексов уменьшалось при 4 °С, однако при этом они отличались наибольшей устойчивостью. Методом тушения триптофановой флуоресценции получены основные физико-химические характеристики взаимодействия T_4 с подфракциями $ЛПВП_2$, $ЛПВП_3$. Константы комплексообразования ЛПВП с T_4 составили порядка 10^6–10^7 $М^{-1}$. Наибольшее сродство к T_4 обнаружено для частиц подфракции $ЛПВП_3$. Установлено, что в комплексообразовании с T_4 принимает участие основной белковый компонент ЛПВП – аполипопротеин А-I, у которого имеется один центр связывания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Attalah N.A., Lata G.F*. Steroid-protein interactions studied by fluorescence quenching // Biochim. Biophys. Acta. 1968. 168. (2). 321–333.

2. *Benvenga S., Robbins J.* Enhancement of thyroxine entry into low density lipoprotein (LDL) receptor-competent fibroblasts by LDL: an additional mode of entry of thyroxine into cells // Endocrinology. 1990. 126. (2). 933–941.

3. *Bernal J., Guadaño-Ferraz A., Morte B*. Thyroid hormone transporters – functions and clinical implications // Nat. Rev. Endocrinol. 2015. 11. (7). 406–417.

4. *Hatch F.T., Lees R.S.* Practical method for plasma lipoprotein analysis // Adv. Lipid Res. 1968. 6. 2–68.

5. *Hulbert A.J*. Thyroid hormones and their effects: a new perspective // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2000. 75. (4). 519–631.

6. *Hulbert A.J*. Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited // Clin. Chem. Lab. Med. 2002. 40. (12). 1292–1300.

7. *Palha J.A., Fernandes R., de Escobar G.M., Episkopou V., Gottesman M., Saraiva M.J*. Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model // Endocrinology. 2000. 141. (9). 3267–3272.

8. *Ramos H.E*. Thyroid hormone cell membrane transport defect // Endocr. Dev. 2014. 26. 108–117.

9. *Van der Deure W.M., Peeters R.P., Visser T.J.* Molecular aspects thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and the effects of genetic variation in these transporters // J. Mol. Endocrinol. 2010. 44. (1). 1–11.

10. *Van Herck S.L., Delbaere J., Bourgeois N.M., McAllan B.M., Richardson S.J., Darras V.M*. Expression of thyroid hormone transporters and deiodinases at the brain barriers in the embryonic chicken: Insights into the regulation of thyroid hormone availability during neurodevelopment // Gen. Comp. Endocrinol. 2015. 214. (4). 30–39.

CHARACTERISTICS OF BINDING TYROXINE WITH FRACTIONS OF HIGH DENSITY LIPOPROTEINS AND APOLIPOPROTEIN A-I

Lev Mikhaylovich POLYAKOV, Roman Aleksandrovich KNYASEV, Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Nataliya Viktorovna TRIFONOVA, Mariya Vladimirovna KOTOVA

Institute of Biochemistry of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine 630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

The aim of the study was to study the binding of various fractions of human blood plasma lipoproteins (VLDL, LDL, HDL_2 and HDL_3) with thyroxine (T_4). Chromatography on Sepharose CL-2B showed that a significant portion of the labeled ^{125}I-thyroxine eluted in the volume of the output of the HDL fraction, which may indicate the possibility of formation of HDL-T_4 complexes. The process was reversible, since the introduction of an excessive amount (10^{-6}–10^{-7} M) of unlabeled T_4 into the system resulted in the displacement of ^{125}I-T_4 from complexes with HDL, which indicates a «protein – ligand» type interaction. The effect of environmental conditions on the formation of complexes of T_4 with HDL is investigated. An increase in temperature to 40 °C resulted in a more than 50 % decrease in the release of radioactivity with a fraction of HDL. Complexation decreased at 4 °C, however, the complexes showed the greatest stability. The main physicochemical characteristics of the interaction of T_4 with subfractions of HDL_2 and HDL_3 were obtained by quenching tryptophan fluorescence. The complexation constants of HDL with T_4 were of the order of 10^6–10^7 M^{-1}. The greatest affinity for T_4 was found for particles of subfraction of HDL_3. It was established that the main protein component of HDL ─ apolipoprotein A-I takes part in complexation with T_4, on which has one binding center.

Key words: high density lipoproteins, thyroxin, apolipoprotein A-I.

Polyakov L.M. *– doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of medical biotechnology, e-mai: plm@niibch.ru*
Knyazev R.A. *– candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru*
Ryabchenko A.V. *– candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: borrelia@mail.ru*
Trifonova N.V. *– junior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru*
Kotova M.V. *– junior researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: zerokiri@mail.ru*

УДК 615.03 DOI: 10.15372/SSMJ20180303

БИОПОДОБНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Жанна Ильдаровна АВДЕЕВА, Владимир Петрович БОНДАРЕВ, Вадим Анатольевич МЕРКУЛОВ, Юрий Витальевич ОЛЕФИР

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России 127051, г. Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2

В обзоре представлены материалы, касающиеся научных принципов, лежащих в основе разработки, доклинических и клинических исследований, регистрации и контроля безопасности биоподобных (биоаналогичных) препаратов, получаемых с использованием методов генной инженерии. Количество используемых в клинике биоподобных лекарственных препаратов, определяемых как «biosimilars», неуклонно увеличивается. Отражены особенности биотехнологических препаратов, что требует необходимости особого подхода при оценке доказательства сходства/подобия вновь разработанного препарата с оригинальным (референтным) препаратом. Для обеспечения эффективности и безопасности применения биоподобных (биоаналогичных) лекарственных препаратов порядок их регистрации определяется нормативной базой, регламентирующей требования по доказательству подобия с ранее одобренным биологическим лекарственным препаратом. Отражены данные, касающиеся различий характера и объема исследований на этапах оценки качества, доклинической и клинической разработки биоподобных и оригинальных препаратов. Отражены вопросы, связанные с экстраполяцией результатов клинических исследований, и вопросы взаимозаменяемости препаратов. Приведена современная информация о международном опыте регистрации биоподобных лекарственных препаратов, научных достижениях и регуляторных требованиях, касающихся доказательства сходства/подобия при оценке качества, эффективности и безопасности биоподобных биотехнологических лекарственных препаратов («biosimilars»).

Ключевые слова: биоподобные препараты («biosimilars»), биотехнологические препараты, оценка качества, доклинические исследования, клинические исследования, экстраполяция, безопасность, взаимозаменяемость.

Разработка генно-инженерных методов, в частности технологии рекомбинантных ДНК, позволяет получать молекулы белка с заданными свойствами, на основе которых разрабатываются современные биотехнологические лекарственные препараты, широко и эффективно применяющиеся для лечения онкологических, аутоиммунных и других хронических тяжело протекающих заболеваний. Окончание срока патентной защиты на оригинальный биотехнологический препарат позволяет разрабатывать/воспроизводить новые версии действующего вещества и регистрировать на его основе лекарственный препарат как биоподобный ранее утвержденному оригинальному препарату. В Российской Федерации понятие «биоаналоговый (биоподобный) препарат» введено Федеральным законом от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств (ФЗ от 12.04.2010 № 61-ФЗ)”», согласно ст. 4, п. 12.2 которого «биоаналоговый (биоподобный) лекарственный препарат (биоаналог) – биологический лекарственный препарат, схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим лекарственным препаратом в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения».

Согласно определению ВОЗ, указанные препараты «имеют высокую степень сходства по показателям качества, безопасности и эффективности с препаратом сравнения (оригинальным, референтным)» [18]. По определению Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA), данная группа препаратов «имеет высокую степень сходства по показателям качества, безопасности и эффективности с препаратом сравнения (оригинальным, референтным), а выявленные незначительные различия не имеют клинической значимости» [4]. В руководстве

Авдеева Ж.И. *– д.м.н., проф., главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП*
Бондарев В.П. *– д.м.н., проф., директор Центра экспертизы качества МИБП*
Меркулов В.А. *– д.м.н., проф., зам. генерального директора по экспертизе лекарственных средств*
Олефир Ю.В. *– д.м.н., генеральный директор*

Европейского агентства лекарственных средств (“European Medicines Agency”, EMEA) указано, что «биоподобным препаратом является биологический лекарственный препарат, который содержит новую версию действующего вещества зарегистрированного оригинального (референтного) препарата, и продемонстрировано сходство/подобие биоподобного и референтного препаратов по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности» [15].

В EMEA разработка нормативных требований для оценки качества, доклинического и клинического изучения биоподобных препаратов проводится с начала 2000-х годов; разработаны документы, в которых отражены общие принципы доказательства сходства/подобия вновь разработанного биоподобного и оригинального (референтного) препаратов [12–14]. Агентством также подготовлены руководства, в которых отражены нормативные требования для проведения доклинических и клинических исследований 9 групп биоподобных препаратов на основе рекомбинантных белков – филграстима, эпоэтина, фолликулостимулирующего гормона, соматотропина, интерферона-альфа, интерферона-бета, рекомбинантного инсулина и аналогов инсулина, гепаринов низкой молекулярной массы и моноклональных антител. В настоящее время осуществляется совершенствование и разработка нормативных требований для биоаналоговых (биоподобных) препаратов в Российской Федерации и в странах Евразийского экономического сообщества.

Целью настоящей работы является анализ международных требований и подходов для регистрации, оценки качества, эффективности и безопасности биоподобных лекарственных препаратов.

Основные особенности биологических препаратов. Биотехнологические лекарственные препараты содержат активные субстанции (белки, гликопротеины), полученные из биологических источников с помощью генно-инженерных технологий, в большинстве случаев это использование сложных клеточных систем и технологии рекомбинантных ДНК. Производство биологических лекарственных препаратов характеризуется сложным технологическим процессом, включающим последовательные этапы очистки целевого продукта. Система внутрипроизводственного контроля исходного сырья и промежуточных продуктов, валидация процесса и используемых для контроля аналитических методик обеспечивают получение биотехнологических лекарственных препаратов требуемого качества [5, 17, 20–23, 25, 26].

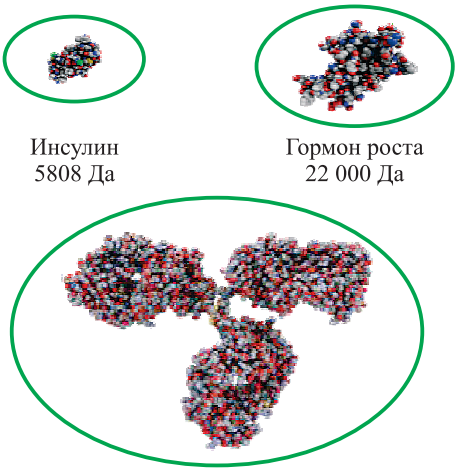

Рис. *Примеры типов белков в биологических лекарственных препаратах*

Строгие требования к производству биотехнологических лекарственных препаратов относятся как к оригинальным, так и к вновь разрабатываемым биоподобным препаратам [7, 16, 19, 31]. Следует учитывать, что, поскольку биологические лекарственные препараты продуцируются живыми организмами, которым свойственна природная изменчивость, белок активной субстанции препарата также может иметь минимальные различия, выявляемые при характеристике серий, а также в случае внесения изменений в процесс производства. То есть минимальная вариабельность/микрогетерогенность оцениваемых показателей качества допустима при условии, что эти отклонения находятся в пределах приемлемого диапазона, и это обеспечивает надежность безопасности и эффективности лекарственного препарата. Биотехнологические препараты, в отличие от препаратов, получаемых путем химического синтеза, характеризуются более сложной молекулярной структурой и большей молекулярной массой; на рисунке приведены примеры типов белков, являющихся действующим веществом некоторых из них.

Поскольку биотехнологические препараты имеют белковую природу и, как правило, используются длительно, иммунная система пациента реагирует на их введение формированием иммунного ответа, проявляющегося синтезом антител к препарату. Антитела, направленные к препарату, могут быть связывающимися или нейтрализующими. В последнем случае они могут нейтрализовать действие препарата и снизить его эффективность. В отдельных редких случаях развитие нежелательного иммунного ответа может вызвать серьезные побочные реакции, такие

как анафилаксия, или привести к развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа. Более часто иммунный ответ на биологические препараты не ассоциируется с серьезными клиническими последствиями, и выявление индуцированных антител к препарату может быть транзиторным [12–14, 31].

Проявления иммуногенности препарата зависят от ряда факторов, таких как:

– физико-химические характеристики препарата, например, изменение структуры белка и образование агрегатов в случае нарушении условий хранения или транспортирования, взаимодействия с компонентами вспомогательных веществ или материалами первичной упаковки;

– особенности клинического применения препарата: например, риск развития иммунного ответа выше при подкожном и внутримышечном введении по сравнению с внутривенным, а также при нерегулярном или повторном введении после длительного перерыва, в случае нарушения схемы лечения по сравнению с краткосрочным регулярным введением препарата в соответствии с рекомендуемой схемой введения;

– особенности, связанные с пациентом, такие как возраст, генетические особенности, иммунный статус, наличие заболевания (например, аутоиммунная патология, онкология);

– препараты, используемые в качестве сопутствующей терапии (например, препараты с иммуностимулирующей или иммуносупрессирующей активностью).

В связи с этим для всех биотехнологических лекарственных препаратов должна быть всегда оценена их потенциальная иммуногенность.

Оценка качества биотехнологических препаратов. Все биотехнологические лекарственные препараты, представляемые для регистрации, включая вновь разработанные биоподобные препараты, должны быть охарактеризованы на их соответствие установленным стандартам качества. Для доказательства качества препарата должны быть проведены исследования по изучению структурных характеристик и других физико-химических свойств; оценено качественное и количественное содержание родственных соединений и производственных примесей с указанием допустимых пределов; определена биологическая активность, отражающая фармацевтические свойства препарата. В материалы, представляемые для регистрации, должны быть включены сведения о вспомогательных веществах, входящих в состав препарата; свойствах и совместимости его компонентов с материалами первичной упаковки; результаты изучения стабильности активной субстанции и готового препарата в течение срока годности при установленных условиях хранения и транспортировки [16, 19, 32].

Биоподобные лекарственные препараты. После окончания периода патентной защиты оригинального препарата (не менее чем через 10 лет) одобрение может получить вновь разработанный биоподобный препарат. Требования к производству и оценке качества, касающиеся всех биотехнологических лекарственных препаратов, в полной мере относятся и к биоподобным препаратам. В связи с этим при регистрации биоподобного препарата прежде всего должны быть оценены материалы, подтверждающие соответствие его качества всем требованиям, предъявляемым к данной группе биотехнологических препаратов, с последующей оценкой результатов проведенных исследований с целью установления подобия референтному препарату [3, 4, 8, 12–15, 31, 33].

Учитывая особенности биотехнологических препаратов, принципы доказательства подобия, используемые для «дженериков» (воспроизведенных препаратов, получаемых путем химического синтеза), не могут быть отнесены к биоподобным препаратам. Это в основном связано с тем, что естественная вариабельность и более сложный процесс производства биологических лекарственных препаратов не позволяют точно воспроизвести молекулярную микрогетерогенность соединения. В связи с этим в отличие от «дженериков» для биоподобных препаратов требуются дополнительные исследования для подтверждения их соответствия нормативным требованиям и доказательства, что выявленные минимальные различия с референтным препаратом не влияют на их безопасность или эффективность.

Принципы доказательства подобия качества, безопасности и эффективности биоподобных препаратов относительно оригинального (референтного) препарата, разработанные EMEA, базируются на ряде основополагающих положений. В основе доказательства подобия лежит принцип пошагового/поэтапного проведения прямых сравнительных исследований по оценке качества, эффективности и безопасности вновь разработанного биоподобного и ранее утвержденного оригинального препарата, выбранного в качестве препарата сравнения (референтного).

Согласно ст. 4, п. 11 ФЗ от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств (ФЗ от 12.04.2010 № 61-ФЗ)”», референтный лекарственный препарат – лекарственный препарат, впервые зарегистрированный в Российской Федерации, качество, эффективность и безопасность которого доказаны на основании результатов доклинических исследований лекарственных

Таблица 1

Основные принципы разработки биоподобного (биоаналогичного) препарата по сравнению с референтным

Оригинальный (референтный) биологический лекарственный препарат	Биоподобный (биоаналогичный) лекарственный препарат
Отсутствие предварительных знаний о безопасности и эффективности	Информация о безопасности и эффективности получена на основе опыта клинического применения референтного препарата
Этапы разработки направлены на доказательство безопасности и эффективности клинического применения	Этапы разработки направлены на доказательство сопоставимости безопасности и эффективности путем установления биоподобия с референтным препаратом
Исследования по сопоставимости проводят только при внесении изменений в процесс производства (например, при масштабировании производства), изучая препарат, полученный до и после внесения изменений	Разработка базируется на комплексных сравнительных исследованиях по сопоставимости с референтным препаратом на этапах оценки качества, доклинических или и клинических исследований
Полный объем исследований по оценке структурных характеристик, физико-химических и биологических свойств препарата	Оценка фармакологических свойств; комплексное сравнительное изучение по доказательству подобия структурных характеристик, физико-химических и биологических свойств с референтным препаратом (этап оценки качества)
Полный объем доклинических исследований (фармакологические и токсикологические исследования)	Объем доклинических исследований определяется результатами сравнительных исследований по доказательству подобия на этапе оценки качества
Рутинные клинические исследования для доказательства эффективности и безопасности при всех показаниях к применению препарата	Сравнительные клинические исследования с целью исключения клинической значимости выявленных различий на предыдущих этапах исследования
Исследования направлены на сравнение клинического эффекта с плацебо или стандартной терапией с оценкой значимых конечных точек (например, долгосрочный результат, выживаемость, степень поражения органа-мишени и др.) и предусматривают участие соответствующей популяции для демонстрации пользы	Исследования направлены на доказательство клинической эквивалентности с референтным препаратом (проводят оценку чувствительных конечных точек в популяции, на которой при определении клинической эффективности могут быть выявлены различия между препаратами)
Положительное соотношение «польза – риск» в основном устанавливается на основании оценки безопасности и эффективности при проведении клинических исследований в соответствующей популяции	Положительное соотношение «польза – риск» основывается на демонстрации подобия при проведении сравнительных клинических исследований при одном из показаний

средств и клинических исследований лекарственных препаратов, проведенных в соответствии с требованиями части 3 статьи 18 настоящего ФЗ, и который используется для оценки биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности, качества, эффективности и безопасности воспроизведенного или биоаналогового (биоподобного) лекарственного препарата.

Референтным может быть препарат, который уже имеет положительный опыт клинического применения. Путь введения и дозировки для биоподобного препарата должен соответствовать таковым для референтного. Некоторые различия между препаратами допустимы, если они не влияют на безопасность и эффективность, например, возможны различия в формулировании лекарственного препарата (состав вспомогательных веществ), форме выпуска (например, лиофилизат или раствор, готовый для инъекций), устройстве для введения (например, тип шприца или шприц-ручки) и др. При доказательстве сходства биоподобного препарата с референтным используется опыт, накопленный при разработке и клиническом применении референтного препарата в отношении его эффективности и безопасности. В табл. 1 приведены данные сравнительного анализа объема основных этапов разработки оригинального биотехнологического лекарственного препарата и вновь разработанного биоподобного препарата.

При регистрации оригинального лекарственного препарата (препарата на основе новой активной субстанции) положительное соотношение пользы и риска определяется главным образом доказательством безопасности и эффективности на основании результатов, полученных при

проведении клинических исследований и подтвержденных обобщенными данными по оценке качества и результатами доклинического изучения. Для биоподобного препарата (препарата на основе новой версии активной субстанции) положительное соотношение пользы и риска основывается на демонстрации подобия, т.е. доказательстве высокого сходства активных субстанций референтного и разработанного лекарственных препаратов. Это достигается путем проведения сравнительных исследований по оценке сопоставимости с референтным препаратом и базируется на комплексе данных по изучению фармацевтического качества, доклинических и/или и клинических исследований. Для демонстрации высокого сходства биоподобного препарата с референтным может в значительной степени быть использован опыт, накопленный при клиническом применении последнего в отношении его эффективности и безопасности.

Принципы проведения прямых сравнительных исследований биоподобного и референтного препаратов. Одним из ключевых положений при доказательстве сходства/подобия препаратов является отсутствие потенциального влияния различий, выявленных на этапах оценки качества и доклинических исследований, на параметры фармакокинетики, эффективность и безопасность, включая иммуногенность. Первым этапом доказательства сходства/подобия препаратов является проведение сравнительных исследований по оценке качества с использованием широкого спектра аналитических методик, характеризующихся достаточной чувствительностью, что обеспечивает возможность выявления потенциальных различий между препаратами.

Этап 1. Сравнительные исследования по оценке качества. При сравнительных исследованиях оценивается сопоставимость структурных характеристик белка, его аминокислотная последовательность и структуры более высокого порядка (фолдинг). Подтверждение идентичности указанных характеристик белка активной субстанции очень важно, поскольку они определяют проявления биологической активности препарата. Проводят исследования других физико-химических, иммунохимических свойств и специфической биологической активности путем использования современных чувствительных методов, способных выявлять даже незначительные различия между биоподобным и референтным препаратами. Для доказательства сходства по показателям качества и отсутствия клинической значимости выявленных различий, как правило, должны быть использованы дополнительные методы исследования, которые не включены в спецификацию на препарат. Для получения максимальной информации по оцениваемому показателю используют методы, основанные на разных принципах. Следует отметить, что исследования по оценке качества по выявлению различий между препаратами значительно чувствительнее, чем клинические испытания, так как среди субъектов, участвующих в последних, как правило, наблюдается неоднородность в отвечаемости на лекарственные препараты.

Вариабельность по оцениваемым показателям (например, профиля гликозилирования) между биоподобным и референтным препаратами должна быть сопоставима с межсерийной вариабельностью по данным показателям референтного препарата. Значимость выявленных на первом этапе различий и возможность влияния на клиническую безопасность, эффективность или иммуногенность должны быть изучены на последующих этапах при проведении сравнительных доклинических и/или клинических исследований. Изучение стабильности биоподобного препарата проводится в соответствии с обычным алгоритмом; с целью выявления различий между биоподобным и оригинальным препаратами рекомендуется проводить сравнительные исследования стабильности в условиях «ускоренного старения» и в «стрессовых условиях» хранения препаратов.

Этап 2. Сравнительные доклинические исследования. Доказательство высокой степени сходства биоподобного и референтного препаратов на этапе оценки качества позволяет сократить объем исследований на доклиническом этапе. Доклинические исследования включают сравнительную оценку биологической активности препаратов путем проведения исследований *in vitro*, в которых определяют способность связывания с антигеном-мишенью (например, рецепторами, ферментами, цитокинами), активацию рецепторов, обусловливающих индукцию или подавление функциональных эффектов на клетках. Для исследования должны быть использованы методы, характеризующиеся достаточной специфичностью и чувствительностью, позволяющие подтвердить, что наблюдаемые различия в показателях качества клинически незначимы.

Фармакодинамические исследования *in vivo* (на модели животных) выполняются только в том случае, если отсутствует соответствующая модель *in vitro*. При этом необходимо учитывать доступность релевантных видов животных или других релевантных моделей (например, трансгенных животных). Если позволяет модель, при проведении фармакодинамических и фармакокинетических исследований оценивают зависи-

мость «доза – эффект», в том числе предполагаемую экспозицию у человека.

При исследовании безопасности, в случае, если единственными релевантными видами животных являются нечеловекообразные приматы, исследования токсичности проводят по измененному дизайну, т.е. применяют многократное введение одной дозы препаратов с оценкой токсикокинетики и иммуногенности. В целом токсикологические исследования *in vivo* необходимы только в некоторых случаях, например, когда биоподобный препарат получают, используя новый тип клеток или организмов, или когда в состав препарата включают новые вспомогательные вещества, которые ранее не использовались.

Этап 3. Сравнительные клинические исследования. Целью проведения сравнительных клинических исследований являются подтверждение сходства/подобия разработанного биоподобного и референтного препаратов и оценка возможного влияния выявленных различий на безопасность и эффективность препаратов. Такие исследования необходимы для выяснения вопросов, которые не были решены при проведении предыдущих сравнительных этапов исследования с использованием аналитических и функциональных методик. Следует учитывать, что безопасность и эффективность клинического применения референтного лекарственного препарата ранее определены, в связи с этим снижается необходимость проведения объемных клинических исследований.

Проведение сравнительных клинических исследований по доказательству подобия проводится поэтапно, начиная с изучения фармакокинетики и фармакодинамики с последующим изучением безопасности и эффективности. Для выявления возможных различий между биоподобным и референтным препаратами исследования фармакокинетики должны проводиться на однородной и чувствительной популяции (здоровые добровольцы или пациенты). Исследования проводят с участием здоровых добровольцев, если они представляют наиболее подходящую популяцию для выявления таких различий и если отсутствуют указания на возможную токсичность лекарственных препаратов.

Предпочтительным является проведение перекрестного исследования с однократным введением с описанием фармакокинетического профиля, включая фазу поздней элиминации. Для препаратов с длительным периодом полувыведения и/или высоким риском иммуногенности требуются параллельные исследования. При исследовании фармакокинетики оценивают не только ее параметры, но и иммуногенность, определяя частоту и титры антител к лекарственному препарату в соответствующих временных точках. Изучение фармакодинамики обычно проводится с параллельным анализом фармакокинетики, что позволяет изучить соотношение «доза – эффект», если исследование выполнено при введении разных доз препарата.

Для сравнительной оценки фармакологических эффектов препаратов должны быть выбраны наиболее чувствительные конечные точки, которые позволяют выявить различия между препаратами. Такими конечными точками являются показатели фармакодинамической активности препарата, соответствующие клиническому эффекту. Во многих случаях выбранные в качестве фармакодинамических конечных точек лабораторные показатели более чувствительны для выявления потенциальных различий между препаратами, чем учет клинических исходов.

В качестве примера можно привести оценку следующих показателей:

– скорость инфузии глюкозы в кламп-тесте вместо учета показателей HbA1c (гликемический индекс) или отдаленных последствий сахарного диабета при исследовании биоподобных инсулинов;

– количество ооцитов в тесте оплодотворения *in vitro* вместо учета количества беременностей и числа новорожденных при исследовании биоподобного фолликулостимулирующего гормона;

– абсолютное количество нейтрофилов вместо учета числа серьезных инфекций при исследовании биоподобных препаратов на основе гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

Если соответствующие конечные точки фармакодинамики отсутствуют, проводят клинические исследования по сопоставимости эффективности биоподобного и референтного препаратов с оценкой конечных точек эффективности. Указанные конечные точки должны зависеть от фармакологической активности лекарственного препарата и быть менее зависимыми от факторов, связанных с пациентом или заболеванием.

Целью проведения исследования эффективности является подтверждение сходства/подобия клинических характеристик вновь разработанного и референтного препаратов, а не оценка эффективности биоподобного препарата *per se*, поскольку она была ранее установлена для оригинального (референтного) препарата. Дизайн сравнительного исследования должен предусмотреть использование достаточно чувствительной модели и условий исследования, позволяющих выявить потенциальные различия в отношении эффективности, а также и безопасности препаратов.

Для первичной конечной точки эффективности должны быть выбраны адекватные пределы для установления эквивалентности эффекта от применения исследуемых препаратов. Допустимые пределы оцениваемых показателей устанавливаются на основе сведений об эффективности референтного препарата, полученных на основе клинического опыта. Границы эквивалентности зависят от выбранной конечной точки и устанавливаются для каждого изучаемого показания. При определении границ эквивалентности необходимо выбрать наибольшие различия в оцениваемых конечных точках эффективности, которые не имели бы значения в конечном клиническом эффекте; т.е. различия в эффективности лечения в этом диапазоне были бы приемлемыми, поскольку не имеют клинической значимости. Принципы выбора критерия эквивалентности для установления биоподобия не являются уникальными, они обычно используются в клинических испытаниях при сравнении альтернативного способа лечения или при сравнении одного и того же лекарственного препарата, полученного до и после внесения изменений в процесс производства, с целью оценки потенциального влияния внесенных изменений на клиническую эффективность препарата.

Оценка «нежелательной» иммуногенности препарата при доказательстве биоподобия. На протяжении всей программы клинических исследований, т.е. при сравнительном изучении фармакокинетики, фармакодинамики, при оценке эффективности препаратов оценивается и клиническая безопасность, которая включает изучение иммуногенного потенциала препаратов [10, 11]. Такие исследования иммуногенности при установлении биоподобия препаратов, как правило, необходимы, при их проведении рассматривают как краткосрочные иммунные (например, инфузионные), так и отсроченные иммуноопосредованные реакции. Объем и характер исследований по оценке сопоставимости иммуногенного потенциала биоподобного и референтного препаратов зависят прежде всего от природы биологического лекарственного препарата и предполагаемых показаний для его применения. Особенно это важно в случае препаратов моноклональных антител, поскольку для них наиболее сложно прогнозировать частоту развития «нежелательной» иммуногенности, характеристику иммунного ответа и клинические последствия, в связи с этим исследования иммуногенности должны быть проведены в полном объеме.

При анализе биологических препаратов с низким иммуногенным потенциалом (например, филграстим) индуцированные их введением антитела определяют в начале и конце клинического исследования, которое характеризуется более коротким периодом наблюдения. В тех случаях, когда имеется информация о наблюдаемых клинически значимых иммунных реакциях при использовании референтного препарата (например, препараты эпоэтинов), тестирование на иммуногенность должно быть более частым. При этом последующее наблюдение за пациентом должно быть более продолжительным, с тщательным мониторингом клинических последствий. Также могут потребоваться специальные исследования по оценке безопасности, связанной с иммуногенностью в пострегистрационном периоде. Объем исследований также зависит и от результатов оценки качественных характеристик препаратов, при этом основное внимание должно быть обращено на выявленные на предыдущих этапах различия между препаратами и возможность их влияния на иммуногенный потенциал. Важна оценка различий структурных характеристик, вариабельность (микрогетерогенность) белка, возможность агрегации белка за счет компонентов, присутствующих в составе препарата или экстрагируемых из материалов первичной упаковки.

Интерпретировать результаты анализа иммуногенности необходимо во взаимосвязи с потенциальным влиянием на параметры фармакокинетики, фармакодинамики, клинической эффективности и безопасности лекарственного препарата. Установленная на основании результатов сравнительных исследований повышенная иммуногенность вновь разработанного препарата не позволяет сделать заключение о его подобии оригинальному (референтному) препарату, в то время как меньшая иммуногенность не препятствует его регистрации в качестве биоподобного (биоаналогичного) лекарственного препарата. На основании результатов проведенных исследований в инструкцию по применению вносятся сведения об иммуногенности, которые включают информацию о частоте, титрах и длительности персистенции антител к биологическому лекарственному препарату (antidrug-antibodies, ADAs). Важна также информация о характеристике индуцированных антител – связывающие или нейтрализующие, поскольку нейтрализующие антитела могут привести к снижению или потере клинической эффективности лекарственного препарата.

Иммуногенность биологических лекарственных препаратов всегда контролируется регулирующими органами после их регистрации. Это особенно важно в плане изучения редко развивающихся иммунных реакций, которые могут быть выявлены только после длительного периода наблюдения при использовании препарата

большим количеством пациентов. В программу пострегистрационного наблюдения биоподобного препарата должны быть включены указания о необходимости сбора сведений о клиническом воздействии антител к нему и описаны меры по управлению потенциальным риском проявления «нежелательной» иммуногенности, т.е. программа должна предусматривать мониторинг побочных реакций, опосредованных иммунной системой, анализ частоты и характера клинических проявлений реакций, сведения о медикаментозной терапии при развитии инфузионных реакций и др.

Таким образом, все этапы разработки биоподобного препарата основаны на демонстрации биоподобия («biosimilarity») с оригинальным (референтным) препаратом путем проведения всесторонних прямых сравнительных исследований их сопоставимости с целью доказательства высокого сходства структуры, физико-химических характеристик, биологической активности, эффективности, безопасности и иммуногенности.

Экстраполяция. ***Общие положения.*** Экстраполяция – хорошо зарекомендовавший себя научный принцип, который изначально применялся в течение многих лет [28], например, в тех случаях, когда в производственный процесс биологического лекарственного препарата, предназначенного для лечения по нескольким утвержденным показаниям, вносятся значительные изменения (например, масштабирование производства с включением нового производственного участка или разработка нового состава вспомогательных веществ). Потенциальное воздействие этих изменений на клиническую эффективность лекарственного препарата оценивают поэтапно путем проведения исследований сопоставимости препаратов, полученных до и после внесения изменений [6, 24, 32]. В основном это сравнительные исследования показателей качества и доклинические исследования в условиях *in vitro*; в случае необходимости проводят клинические исследования. На основании совокупности полученных результатов решается вопрос о возможности экстраполяции данных на другие показания к применению препарата.

Таким образом, экстраполяция – это не новая концепция, но общепринятый научный принцип, который регулярно используется, когда в производственный процесс биологических лекарственных препаратов с несколькими утвержденными показаниями вносятся серьезные изменения. В большинстве таких случаев регулирующие органы утверждают изменения в производстве, основываясь на результатах исследования сопоставимости. Клинические исследования препаратов, полученных до и после внесения изменений, по всем показаниям повторно не проводятся.

Экстраполяция данных клинического исследования. Если биоподобный препарат в высокой степени схож с референтным лекарственным препаратом по показателям качества (подобен ему) и характеризуется сопоставимым профилем безопасности и эффективности при одном терапевтическом показании, данные по безопасности и эффективности могут быть экстраполированы на другие показания, одобренные для референтного препарата, т.е. объем клинических исследований может быть сокращен. При этом экстраполяция данных на другие показания всегда подтверждается научными доказательствами и данными, подтверждающими сопоставимость препаратов, полученными в ходе сравнительных исследований при доклиническом и клиническом изучении.

Ниже перечислены основные условия, которые позволяют экстраполировать данные клинических исследований при одном показании на другие показания.

1) *Механизм действия препарата* опосредован взаимодействием с одними и теми же рецепторами.

В случае взаимодействия с множеством рецепторов (например, препаратов моноклональных антител) трудно установить вклад взаимодействия с каждым из них в проявления конечного эффекта препарата при каждом из показаний. В таком случае требуются дополнительные исследования (доклинические и/или клинические) для доказательства того, что биоподобный и референтный препараты будут проявлять свою активность аналогично при экстраполированном показании.

б) *Исследование соответствующей популяции.* Доказательство высокой степени подобия с референтным препаратом базируется на данных, полученных при сравнительной оценке безопасности, эффективности и иммуногенности препаратов при проведении клинических исследований при основном показании на популяции, в которой могут быть обнаружены потенциальные различия в клинической эффективности препаратов.

Результаты, полученные при одном показании (например, ревматоидный артрит), могут быть не применимы с точки зрения безопасности или эффективности при показаниях, попадающих в другую терапевтическую область, где механизм действия препарата, а также условия дозирования или фармакокинетика могут отличаться (например, онкологические заболевания). В таком случае необходимо проведение сравнительных

клинических исследований для установления сопоставимости профиля эффективности и безопасности препаратов при другом показании.

Экстраполяция данных по безопасности. Данные по безопасности, полученные при установлении сопоставимости профиля безопасности биоподобного препарата при одном терапевтическом показании, могут быть экстраполированы на другие показания при следующих условиях:

– доказана высокая степень подобия препаратов при исследовании структурных характеристик и функциональных свойств;

– механизм действия препарата опосредован взаимодействием с одними и теми же рецепторами;

– установлен сопоставимый профиль параметров фармакокинетики, фармакодинамики и эффективности препаратов.

Только в таком случае можно предполагать, что побочные реакции, обусловленные фармакологическим действием биоподобного препарата, будут одинаковыми и будут проявляться с той же частотой, что и при применении оригинального препарата. Как правило, этих предварительных данных достаточно для регистрации биоподобного препарата, однако в пострегистрационном периоде необходимо проводить дальнейшие исследования безопасности.

Экстраполяция данных по иммуногенности. Данные по оценке иммуногенности не могут быть экстраполированы автоматически, поскольку всегда требуется подтверждение и обоснование представленных данных. Это связано с тем, что иммуногенность обусловлена не только качественными характеристиками лекарственного препарата. Должны быть учтены факторы, связанные с пациентом (генетические особенности, возраст, иммунный статус), заболеванием (сопутствующие заболевания, сопутствующая терапия), особенностями терапевтического воздействия препарата (путь введения, схема и продолжительность приема препарата).

Для большинства биологических лекарственных препаратов данных клинических исследований, полученных в предрегистрационном периоде, недостаточно, чтобы оценить все потенциальные нежелательные реакции, которые могут выявляться при применении биоподобного препарата. В связи с этим в пострегистрационном периоде необходимо проводить контроль безопасности применения препарата. Постмаркетинговые исследования важны, поскольку позволяют контролировать известные риски, а также выявлять редкие побочные реакции, возникающие только при длительном лечении большого числа пациентов.

Мониторинг безопасности биоподобных препаратов. Мониторинг безопасности биоподобных препаратов следует тем же требованиям, которые применяются ко всем биологическим лекарственным препаратам [9]. Особые требования, касающиеся только биоподобных препаратов, отсутствуют. В связи с этим регулирующие органы должны быть информированы обо всех случаях побочных эффектов, не указанных в инструкции по применению лекарственного препарата, о серьезных нежелательных реакциях, непредвиденных нежелательных реакциях, об особенностях взаимодействия с другими лекарственными препаратами, которые были выявлены при проведении клинических исследований и применении препарата.

Как и для каждого нового лекарственного препарата, заявитель должен представлять *план управления рисками* (*ПУР*) для биоподобного препарата, который включает план фармаконадзора и меры по минимизации риска развития побочных эффектов. ПУР для биоподобного препарата основывается на полученной информации и накопленном опыте клинического применения оригинального (референтного) препарата. В странах ЕС все биологические лекарственные препараты, утвержденные после 01.01.2011 и разрешенные в ЕС, являются объектом так называемого «*дополнительного мониторинга*». Препараты, включенные в данный список, подлежат особенно тщательному контролю со стороны регулирующих органов. Это связано с тем, что активная субстанция в препарате является новой или имеются ограниченные данные о его долгосрочном использовании. Особенно тщательно контролируются препараты во время первых лет после их утверждения. Лекарственный препарат, подлежащий дополнительному мониторингу, идентифицируют символом черного треугольника и указанием в инструкции по применению. Следует отметить, что приведенная информация о дополнительном мониторинге не указывает на дополнительные проблемы с безопасностью лекарственного препарата.

С 2006 по апрель 2017 г. EMEA одобрено более 25 биоподобных препаратов («biosimilars») на основе рекомбинантных филграстимов, эпоэтинов, соматотропинов, фолликулотропинов, 3 препарата моноклональных антител. Информацию о них можно найти на веб-сайте EMEA (на целевой странице каждого из препаратов, в разделе «Assessment history»). В табл. 2 приведены сведения о группах биоподобных препаратов, одобренных EMEA [1].

Взаимозаменяемость препаратов. Вопрос о взаимозаменяемости оригинальных препаратов

Таблица 2

Биотехнологические биоподобные лекарственные препараты, утвержденные в ЕС

Группы биологических лекарственных препаратов	Биоподобные препараты, утвержденные в ЕС (до марта 2017 г.)
Полисахариды	
Низкомолекулярные гепарины	Эноксапарин натрия
Белки	
Ростовые факторы	Эпоэтин Филграстим
Гормоны	Фоллитропин альфа Инсулин гларгин Соматропин (гормон роста) Терипаратид
Белки слияния (fusion proteins)	Этанерцепт
Моноклональные антитела	Адалимумаб Инфликсимаб Ритуксимаб

биоподобными приобрел в настоящее время особую актуальность в связи с активным выходом последних на фармацевтический рынок. При решении данной проблемы затрагиваются как экономические (биоподобные препараты дешевле и поэтому финансово более привлекательны), так и этические вопросы, связанные с необходимостью оказания максимально эффективной терапевтической помощи пациентам, страдающим тяжелыми хроническими заболеваниями. Согласно мировой практике, замена одного препарата другим может производиться на разных уровнях, поэтому важна терминология, используемая при рассмотрении вопроса о взаимозаменяемости препаратов, для единого понимания и практического применения как медицинскими работниками, так и другими лицами, имеющими отношение к обращению лекарственных средств.

Согласно ст. 4 п. 12.3 ФЗ от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств (ФЗ от 12.04.2010 № 61-ФЗ)”», взаимозаменяемым считается лекарственный препарат с доказанной терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью в отношении референтного лекарственного препарата, имеющий эквивалентные ему качественный и количественный состав действующих веществ, состав вспомогательных веществ, лекарственную форму и способ введения.

В странах ЕС в отношении взаимозаменяемости биоподобных и оригинальных лекарственных препаратов введены следующие определения. *Взаимозаменяемость* означает возможность замены одного лекарственного препарата на другой, который, как предполагается, будет проявлять тот же клинический эффект; при этом возможна замена оригинального препарата на биоподобный (или наоборот) или замена одного биоподобного препарата на другой. Предусматривается два пути такой замены: *переключение*, когда лечащий врач решает о замене одного лекарственного препарата на другой с той же терапевтической целью, или *замена* (автоматическая), когда без консультации с лечащим врачом, на уровне аптеки, вместо одного лекарственного препарата пациенту выдается другой взаимозаменяемый препарат.

Следует особо отметить, что при рассмотрении EMEA материалов регистрационного досье на биоподобный препарат проводится научный анализ материалов по доказательству сходства/подобия препарата с референтным. Решается вопрос о рекомендации к утверждению препарата в качестве биоподобного для клинического применения. При этом заключительная оценка EMEA не включает в себя рекомендации о его взаимозаменяемости референтным и, следовательно, не решается вопрос, можно ли референтный лекарственный препарат переключить или заменить на биоподобный. Таким образом, EMEA не регулирует взаимозаменяемость, вопрос о переключении и замене оригинального препарата на биоподобный относится к компетенции государств-членов ЕС, т.е. решение о взаимозаменяемости и автоматической замене оригинального лекарственного препарата и биоподобного принимается на национальном уровне.

В большинстве развитых стран мира приняты правовые нормы разного уровня, запрещающие или ограничивающие автоматическую замену оригинального препарата биоподобным. Во Франции и Испании взаимозаменяемость препаратов запрещена, в Германии запрещена замена при отпуске препарата из аптеки без четкого указания врача, в Швеции, Италии и Бельгии замена биологических лекарственных препаратов на биоподобные не рекомендуется. Согласно указанию регуляторного органа Великобритании, «при назначении биологических препаратов рекомендуется использовать торговое наименование», поэтому автоматическая замена оригинального препарата на биоподобный при отпуске фармацевтом становится невозможной. По вопросам практики назначения или взаимозаменяемости лекарственных препаратов информация может быть получена в национальном регуляторном органе соответствующего государства-члена ЕС и на веб-сайте EMEA. Среди стран мира только в

некоторых странах Латинской Америки врач обязан автоматически заменять препараты на более дешевые [2].

В любом случае при назначении биоподобного препарата, так же как и при назначении любого лекарственного препарата, медицинские работники должны тщательно подбирать препарат с учетом показаний и противопоказаний его применения и особенностей течения заболевания у конкретного пациента. Любое решение о переключении препарата должно быть принято с участием лечащего врача и обсуждения с пациентом, при этом следует принимать во внимание имеющийся в стране опыт в отношении назначения и использования биологических, в том числе и биоподобных, лекарственных препаратов. Вопросы о проблемах взаимозаменяемости лекарственных препаратов в отечественной медицинской практике отражены в сообщениях ряда авторов [29, 30, 34, 35].

Согласно статье 27.1 ФЗ «Об обращении лекарственных средств от 12.04.2010 № 61-ФЗ» (ред. от 28.12.2017), взаимозаменяемость лекарственных препаратов для медицинского применения определяется на основании шести параметров, включающих эквивалентность (для биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов) – сопоставимость качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций; эквивалентность лекарственной формы; эквивалентность или сопоставимость состава вспомогательных веществ; идентичность способа введения и применения; отсутствие клинически значимых различий при проведении исследований биоэквивалентности или исследования терапевтической эквивалентности; соответствие производителя лекарственных средств требованиям надлежащей производственной практики. Сравнение параметров лекарственных препаратов осуществляется при проведении экспертизы в процессе их регистрации. Указанный порядок определения взаимозаменяемости отнесен ко всем лекарственным препаратам, включая биотерапевтические.

Однако следует отметить, что для биоаналоговых (биоподобных) препаратов заключение об отсутствии клинически значимых различий базируется на анализе результатов проведенных клинических исследований, подтверждающих отсутствие различий по безопасности, эффективности и иммуногенности препаратов.

Таким образом, регистрация биотерапевтического препарата в качестве биоподобного не должна автоматически решать вопрос о его взаимозаменяемости. Решение о взаимозаменяемости и безопасном переключении пациента с одного препарата на другой должно базироваться на результатах дополнительных пострегистрационных клинических исследований, свидетельствующих о том, что замена оригинального препарата не оказывает негативного влияния на безопасность и/или эффективность препаратов. Это обусловлено тем, что объем клинических исследований при регистрации биоподобного препарата сокращен, и в ряде случаев показания к применению биоподобного препарата утверждаются на основании экстраполяции результатов исследований при одном из показаний, поэтому безопасность при регистрации препарата в полной мере не подтверждена, в частности безопасность, связанная с его иммуногенностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные EMEA регуляторные требования к препаратам «biosimilars» способствовали разработке и внедрению в клиническую практику целого ряда биоподобных препаратов не только в странах ЕС, но и в странах других регионов мира. Основные принципы, лежащие в основе разработки «биосимиляров», были использованы при создании нормативных документов в странах с развитой регуляторной системой. Требования FDA для одобрения биоаналогов в США основаны на той же научной базе, что и в ЕС, но при наличии некоторых различий. Австралийская администрация лекарственных средств (Therapeutic Goods Administration, TGA) использует принципы, изложенные в законодательстве ЕС. ВОЗ разработала собственные руководящие принципы для биоподобных препаратов (так называемых «подобных биотерапевтических продуктов», similar biotherapeutic products, SBPs) и биоподобных препаратов моноклональных антител, которые включают основные научные принципы, изложенные в документах EMEA.

Накопленный за последние 10 лет международный опыт [27] по разработке и внедрению в практику биоподобных препаратов указывает на то, что конкурентное их использование может создать преимущество для системы здравоохранения в целом, обеспечивая доступ пациентов к альтернативным эффективным биотерапевтическим лекарственным препаратам, качество которых соответствует оригинальным препаратам. Гарантия качества биоподобных лекарственных препаратов, применяемых в России и странах Евразийского экономического союза, должна быть обеспечена нормативной базой, регуляторные требования которой основаны на международном опыте разработки нормативных документов для биоподобных биотехнологических

лекарственных препаратов и опыте их клинического применения. Нормативная база, соответствующая действующей в странах с развитой регуляторной системой, будет способствовать более благоприятным условиям разработки, производства и внедрения в клиническую практику современных эффективных биоподобных биотехнологических лекарственных препаратов, что в конечном итоге будет способствовать оптимизации оказания медицинской помощи пациентам, страдающим прогрессирующими, тяжело протекающими заболеваниями, и значительному улучшению их здоровья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biosimilars in the EU. Information guide for healthcare professionals. European Medicines Agency; European Commission, 4 August 2016. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Leaflet/2017/05/WC500226648.pdf

2. European Generic Medicines Association. Handbook on biosimilar medicines. http://www.bogin.nl/files/ega_biosmilarshandbook.pdf

3. Guidance for industry. Quality consideration in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), April 2015. https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm291134.pdf

4. Guidance for industry. Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015. https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm291128.pdf

5. Guidance on virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (EMEA/CHMP/BWP/398498/2005). London, 24 July 2008. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003795.pdf

6. Guideline on comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process. Non-clinical and clinical issues (EMEA/CHMP/BMWP/101695/2006). London, 19 July 2007. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003935.pdf

7. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London: European Medicines Agency, 2016. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/08/WC500211640.pdf

8. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). Annex 2. WHO Technical Report Series No. 977, 2013. http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js19941en/

9. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP). Product- or population-specific considerations iI: Biological medicinal products. EMA/168402/2014. 4 August 2016. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/08/WC500211728.pdf

10. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins (EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006). London: European Medicines Agency, January 2007. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf

11. Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use (EMA/CHMP/BMWP/86289/2010). London: European Medicines Agency. 2012. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128688.pdf

12. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04). London, 30 October 2005. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf

13. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005). London, 30 October 2005). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf

14. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMEA/CHMP/BWP/49348/2005). London, 22 February 2006.). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003953.pdf

15. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) EMEA/CHMP/BWP/247713/2012. London. 22 May 2014. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/06/WC500167838.pdf

16. Guidelines for assuring the quality of monoclonal antibodies for use in humans. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva: World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, No. 822). http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39431/WHO_TRS_822.pdf;jsessionid=31AA9621285F7E7956C3CE5BE4F60F36?sequence=1

17. Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical product. Annex 3 in WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential

Medicines. Sixth report. Geneva, World Health Organization. 1995 (WHO Technical Report Series, No. 850). http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip13e/

18. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 19 to 23 October 2009. http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf

19. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series. No. 814. WHO Expert Committee on biological Standardization, October 2013. http://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA_DB_final_19_Nov_2013.pdf

20. ICH E6 guideline. Guideline for good clinical practice. Geneva, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1996. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf

21. ICH Q2A guideline. Validation of analytical procedures. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1994. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf

22. ICH Q2B guideline. Validation of analytical procedures: Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996. https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073384.pdf

23. ICH Q5A (R1) guideline. Quality of biotechnological products: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, 1999. https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073454.pdf

24. ICH Q5E. Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 18 November 2004. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf

25. ICH Q6B guideline. Note For Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96). September 1999. http://www.ema.europa. eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf.

26. Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95). London, 14 February 1996. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003684.pdf

27. The impact of biosimilar competition. IMS Health, June 2016. http://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2016/08/IMS-Impact-of-Biosimilar-Competition-2016.pdf

28. *Weise M., Kurki P., Wolff-Holz E., Bielsky M.-Ch., Schneider Ch*. Biosimilars: the science of extrapolation // Blood. 2014. 124. (22). 3191–3196.

29. Биологические препараты. Позиция Российской ассоциации эндокринологов // Сахарный диабет. 2013. (3). 121–122.

30. *Василенко И.А*. Взаимозаменяемость лекарственных препаратов: сравнительные аспекты // Разработка и регистрация лекарств. средств. 2014. (1). 162–169.

31. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К, 2013. 328 с.

32. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. III. М.: ПОЛИГРАФ ПЛЮС, 2014. 344 с.

33. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. IV. М.: ПОЛИГРАФ ПЛЮС, 2014. 172 с.

34. *Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П*. Безопасность биологических препаратов. Сообщение 2. Проблемы безопасности биоподобных препаратов // Биопрепараты. 2016. 16. (2). 78–89.

35. *Шаньгин И.В., Смирнов А.С., Шнайдер А.А*. Взаимозаменяемость лекарственных препаратов в России: проблемы и перспективы // Соврем. орг. лекарств. обеспечение. 2014. (3). 10–18.

BIOSIMILARS, PRODUCED USING THE RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY

**Zhanna Il'darovna AVDEEVA, Vladimir Petrovich BONDAREV,
Vadim Anatol'evich MERKULOV, Yuriy Vital'evich OLEFIR**

*Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Product of Minzdrav of Russia
199002, Moscow, Sivtsev Vrazhek lane, 41*

The review presents materials on the scientific principles underlying the development, preclinical and clinical research, registration and control of the safety of biosimilar medicines produced using genetic engineering techniques. The number of biosimilars used in the clinic, defined as «biosimilars», is steadily increasing. The features of biotechnological preparations are presented, that requires a special approach to assessing the newly developed preparation evidence of similarity with the original (reference) preparation. To ensure the effectiveness and safety of their use, the procedure for registration of such medicines is determined by the regulatory framework governing the requirements for proof of similarity with previously approved biological medicinal products. The data concerning the differences in the nature and scope of studies at the stages of quality assessment, preclinical and clinical development of biosimilar and original drugs are performed. The issues related to extrapolation of clinical trial results and the issues of medicines interchangeability are reported. The modern information on international experience of biosimilar medicines registration, scientific achievements and regulatory requirements concerning evidence of similarity in assessing the quality, effectiveness and safety of biosimilar biotechnological medicines («biosimilars») has been reported.

Key words: biosimilars, biotechnological medicines, quality control, preclinical studies, clinical studies, extrapolation, safety, interchangeability.

Avdeeva Zh.I. *– doctor of medical sciences, professor, chief expert of office for allergen expertise, cytokines and other immunomodulators of center for examination and control of medical immunobiological preparations*
Bondarev V.P. *– doctor of medical sciences, professor, director of centre of expertise of the medical immunobiological preparations quality*
Merkulov V.A. *– doctor of medical sciences, professor, deputy director general for the expertise of drugs*
Olefir Yu.V. *– doctor of medical sciences, director general*

УДК 615.281.8 DOI: 10.15372/SSMJ20180304

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА λ-1

Дмитрий Николаевич КИНШТ[1,2], Павел Геннадьевич МАДОНОВ[1,2], Галина Вадимовна КОЧНЕВА[3], Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА[1], Герман Игоревич БАЙКАЛОВ[1]

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

[2] *ООО «Саентифик Фьючер Менеджмент» 630559, Новосибирская обл, р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 10*

[3] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово*

Несмотря на успехи в создании противовирусных препаратов прямого действия, сохраняется актуальность применения интерферонов в повседневной клинической практике. Парентеральное введение интерферонов сопровождается системными побочными эффектами и представляет значительные неудобства для пациентов. Для эффективного лечения гепатотропных вирусов перспективным является лекарственный препарат на основе интерферона λ-1, который должен обладать высокой энтеральной биодоступностью с целью достижения высоких концентраций в печени. **Цель работы** – изучение противовирусной активности перорального лекарственного средства на основе интерферона λ-1, иммобилизированного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза на полиэтиленгликоле-1500. **Материал и методы.** Для изучения противовирусной активности в отношении вируса гепатита С использовались ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг и иммуногистохимический метод. **Результаты и их обсуждение.** Исследуемое средство сохраняет противовирусную активность в отношении вируса гепатита С. Полученные с помощью разных методов результаты согласуются между собой. Пятидесятипроцентная ингибирующая доза лежит в диапазоне концентраций 0,008–0,08 нг/мл. **Заключение.** Иммобилизированный на полиэтиленгликоле с помощью технологии радиационного синтеза интерферон λ-1 можно рассматривать как прототип перорального лекарственного средства для лечения вирусных гепатитов, в частности гепатита С.

Ключевые слова: интерферон λ-1, гепатотропные вирусы, вирусный гепатит С, иммобилизация, электронно-лучевая иммобилизация, иммобилизированный интерферон λ-1.

Для терапии вирусных инфекций в современной медицине широко применяются рекомбинантные интерфероны (ИФН). Несмотря на успехи в создании противовирусных препаратов прямого действия, актуальность применения ИФН в повседневной клинической практике сохраняется. Для достижения терапевтически значимой концентрации лекарственные препараты на основе ИФН, в том числе пегилированных, вводятся парентерально, что сопровождается системными побочными эффектами и представляет значительные неудобства для пациентов.

Перспективным представляется использование третьего типа интерферонов – λ-1. Рецепторы к ИФН λ-1 представлены преимущественно в печени, соответственно, при применении ИФН λ-1 может быть достигнут максимальный ингибирующий эффект в отношении гепатотропных виру-

Киншт 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*
Кочнева Г.В. *– д.б.н., зав. лабораторией вирусных гепатитов*
Тартынова Т.С. *– клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины*
Байкалов Г.И. *– студент 6-го курса лечебного факультета*

сов. По этой же причине ИФН λ-1 будет иметь меньше побочных эффектов, свойственных наиболее распространенным лекарственным средствам на основе ИФН α. Таким образом, совершенно очевидно, что для эффективного лечения гепатотропных вирусов необходим лекарственный препарат на основе ИФН λ-1, который должен обладать высокой энтеральной биодоступностью с целью достижения высоких концентраций в печени.

В Российской Федерации разработана технология радиационного синтеза, обеспечивающая энтеральную биодоступность белковых молекул, иммобилизированных на инертном полимере – электронно-лучевая иммобилизация [1]. Эта технология реализуется с помощью воздействия ионизирующего облучения на раствор, содержащий исходный белок и полимер. Полимер защищает белок от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта, повышает гидрофильность и, как следствие, обеспечивает высокую биодоступность белковых молекул. Однако фармакологические свойства иммобилизированных на полимере белков могут существенно изменяться, что диктует необходимость проведения полного комплекса доклинических исследований [5].

Ранее нами показано, что иммобилизированный на полиэтиленгликоле-1500 с помощью технологии электронно-лучевого синтеза ИФН α-2b сохраняет противовирусную активность и обладает высокой биодоступностью при пероральном приеме [1].

Целью данной работы является изучение противовирусной активности перорального лекарственного средства на основе иммобилизированного ИФН λ-1 (ЛС имм-ИФН λ-1). Для изучения противовирусной активности использован вирус гепатита С.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ЛС имм-ИФН λ-1 был произведен в АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск) из собственного штамма-продуцента и иммобилизирован на полиэтиленгликоле-1500 по электронно-лучевой технологии, описанной в патенте РФ 2409669 [3]. Для оценки антивирусной активности использовалась модель JFH1 клон/Huh-7.5 клетки, являющаяся в настоящее время общепризнанной системой для оценки антивирусной активности противовирусных средств, включая интерфероны. Линеаризованная ДНК плазмиды pJFH1 pUC была использована в качестве матрицы для транскрипции полноразмерной инфекционной РНК вируса гепатита С с помощью набора реагентов TranscriptAid™ для высокоэффективной транскрипции с Т7 РНК-полимеразой («Fermentas», Латвия).

Культуральный вирус гепатита С (JFH1) был получен в результате трансфекции синтезированной РНК в клетки гепатомы человека Huh7.5 с использованием набора для трансфекции РНК Mirus Bio MIR 2250 («Mirus», США). Максимальный выход вируса в культуральную среду был зарегистрирован через восемь пассажей трансфецированных клеток и достигал $1{,}37 \times 10^6$ копий РНК/мл по результатам ПЦР в реальном времени (тест-система «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», ИЛС, Москва). Далее вируссодержащую культуральную жидкость концентрировали центрифугированием в ячейке с отсекающим фильтром Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit (100 кДа) («Millipore», США) и проводили еще четыре субпассажа на клетках Huh7.5 для получения вирусного стока JFH1. Сток титровали на монослое клеток Huh7.5 методом иммуногистохимического определения фокусов инфекционности. С этой целью монослой клеток инфицировали 10-кратными разведениями вируса и через трое суток инкубирования при 37 °С выполняли иммуногистохимическое исследование с использованием в качестве первичных антител моноклональные антитела к белку Core 6G7, а вторичных – конъюгат с пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали хромоген AEC (3-амино-9-этилкарбазол, «Sigma»), который окисляется пероксидазой с образованием нерастворимого осадка красного цвета. Титр составил около 2×10^4 фокусов инфекционности/мл. Сток фасовали по аликвотам 1,5 мкл и хранили при –80 °С до использования.

Для оценки антивирусной активности лекарственного средства вируса гепатита С монослой клеток Huh7.5, выращенный на 24-луночных планшетах, инкубировали с 10-кратными разведениями исследуемого средства в диапазоне 0,008–800 нг/мл в культуральной среде в течение 12 ч при 37 °С. Затем среду с ИФН удаляли и клетки инфицировали одинаковой дозой вируса JFH1 из расфасованного замороженного стока $4{,}37 \times 10^6$ копий РНК/лунку (кроме контроля клеток) по три лунки на одну дозу ИФН. Адсорбцию вируса проводили 2 ч при 37 °С без ЛС имм-ИФН λ-1, затем вирус удаляли и в лунки вновь добавляли среду с соответствующими разведениями исследуемого средства. Планшеты инкубировали двое суток при 37 °С в CO_2-инкубаторе, затем готовили лизаты инфицированных и контрольных клеток: монослой клеток трижды промывали TBS-буфером (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, pH 7,6); обрабатывали лизирующим буфером

100 мкл/лунка (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, pH 7,6, 1 % Тритон X-100) + смесь ингибиторов протеаз (AEBSF, апротинин, бестатин, E-64, EDTA, леупептин) («Sigma», США), переносили в центрифужные микропробирки, выдерживали во льду 10 мин, замораживали; лизаты трижды замораживали-оттаивали, обрабатывали ультразвуком трижды во льду до полного разбиения осадка; центрифугировали 14000 об/мин в течение 30 мин при 4 °С; супернатант расфасовывали по 100 мкл.

Антивирусный эффект с помощью вестерн-блоттинга оценивали по индикации белка Core вируса гепатита С в соответствующих лизатах клеток с помощью моноклональных антител 6G7 (любезно предоставлены Marian Major, FDA, США). Использовали 13%-й ПААГ, белки переносили на мембрану Immun-Blot™PVDF 0,2 мкм. Уровень белковой нагрузки контролировали по β-актину, который визуализировали с помощью кроличьих поликлональных антител к β-актину («Cell Signaling», США). Для проявления использовали соответствующие конъюгаты с фосфатазой, субстрат BCIP (5-бромо-4-хлоро-3-индолилфосфат) и нитросиний тетразолий. Останавливали реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Проводили предварительный эксперимент для оценки цитотоксичности исследуемого лекарственного средства. Цитотоксическую активность ЛС имм-ИФН λ-1 изучали на культуре клеток гепатомы человека Huh7.5 в диапазоне концентраций предполагаемой антивирусной активности 0,08–8000 нг/мл [4] микрометодом на 96-луночных планшетах («Greiner», Австрия) с использованием 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфо-фенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилида (реагент XTT, «Sigma-Aldrich», США). Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый XTT в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью феназинметасульфата и последующая фотометрия позволяют точно соотнести изменение оптической плотности раствора с изменением количества жизнеспособных клеток. Оценивалась специфическая гибель обработанных разными концентрациями белков клеток по отношению к необработанным (контроль, 100 % жизнеспособности). Выявлено, что исследуемое средство не оказывало токсического воздействия на культуру клеток гепатомы человека Huh7.5 во всем диапазоне используемых концентраций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из результатов оценки антивирусной активности лекарственного средства на основе иммобилизированного ИФН λ-1 методом ПЦР в реальном времени, представленных в таблице, ЛС имм-ИФН λ-1 в концентрации 0,008 нг/мл ингибирует репродукцию вируса гепатита С до 56 % от контроля, а в следующей исследуемой концентрации (0,08 нг/мл) – уже до 18 %. Таким образом, 50%-я ингибирующая доза лежит в диапазоне концентраций ЛС имм-ИФН λ-1 0,008–0,08 нг/мл.

Результаты анализа лизатов клеток с помощью вестерн-блоттинга приведены на рис. 1. Из представленных данных видно, что белок Core HCV вируса JFH1 четко детектируется в лизатах клеток, обработанных ЛС имм-ИФН λ-1 в концентрации 0,008 нг/мл, однако практически не обнаруживается при концентрации ЛС 0,08 нг/мл и выше.

Проведена оценка антивирусной активности ЛС имм-ИФН λ-1 иммуногистохимическим мето-

Таблица

Антивирусная активность лекарственного средства на основе иммобилизированного ИФН λ-1 (ПЦР в реальном времени)

Образец (лизаты клеток)	Концентрация вируса в образце	
	МЕ/мл	копий РНК/мл
Неинфицированные клетки Huh7.5 (отрицательный контроль)	$5{,}40 \times 10^2$	$1{,}08 \times 10^3$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 800 нг/мл	$2{,}34 \times 10^6$	$4{,}68 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 80 нг/мл	$2{,}26 \times 10^6$	$4{,}52 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 8 нг/мл	$1{,}80 \times 10^6$	$3{,}6 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 0,8 нг/мл	$3{,}41 \times 10^6$	$6{,}82 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 0,08 нг/мл	$9{,}37 \times 10^6$	$1{,}87 \times 10^7$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 0,008 нг/мл	$2{,}86 \times 10^7$	$5{,}72 \times 10^7$
Инфицированные клетки Huh7.5, не обработанные ЛС имм-ИФН λ-1 (положительный контроль)	$5{,}13 \times 10^7$	$1{,}03 \times 10^8$

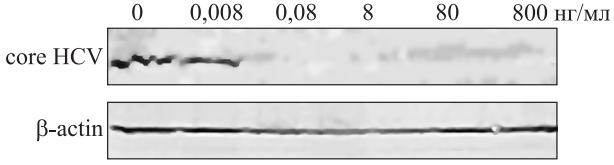

Рис. 1. *Вестерн-блоттинг лизатов клеток Huh7.5, инфицированных стоком JFH1 и обработанных различными концентрациями лекарственного средства на основе иммобилизированного ИФН λ-1*

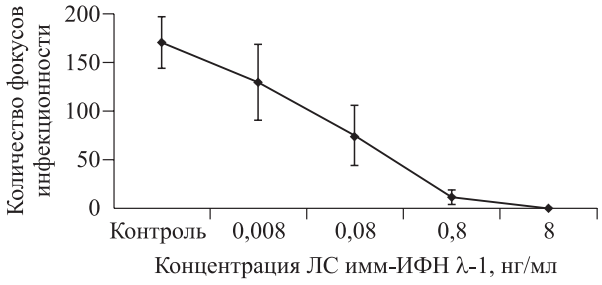

Рис. 2. *Ингибирование репродукции вируса гепатита С, клон JFH1, в клетках гепатомы человека Huh.7.5, обработанных различными концентрациями лекарственного средства на основе интерферона λ-1*

дом подсчета фокусов инфекционности вируса на монослое клеток Huh 7.5. Результаты титрования представлены на рис. 2. Выявлено, что 50%-я ингибирующая доза исследуемого ЛС лежит в диапазоне концентраций 0,008–0,08 нг/мл, что согласуется с данными, полученными методом ПЦР в реальном времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена противовирусная активность перорального лекарственного средства на основе иммобилизированного ИФН λ-1, полученного с помощью электронно-лучевой технологии. Для оценки антивирусной активности использовалась модель JFH1 клон/Huh-7.5 клетки. Оценка антивирусной активности ЛС имм-ИФН λ-1 проводилась методами ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга и иммуногистохимическим методом подсчета фокусов инфекционности вируса на монослое клеток Huh 7.5.

При исследовании антивирусной активности ЛС имм-ИФН λ-1 с помощью ПЦР в реальном времени определено, что концентрация исследуемого лекарственного средства 0,008 нг/мл ингибирует репродукцию вируса гепатита С до 56 % от контроля, а следующая исследуемая концентрация лекарственного средства, 0,08 нг/мл, – до 18 %. Таким образом, установлено, что 50%-я ингибирующая доза лежит в диапазоне концентраций ЛС имм-ИФН λ-1 0,008–0,08 нг/мл. Использование вестерн-блоттинга показало схожие результаты: детекция белка Core вируса гепатита С происходила при обработке клеток исследуемым средством в концентрации 0,008 нг/мл, а при концентрациях 0,08 нг/мл и выше белок Core не детектировался. При подсчете фокусов инфекционности на монослое клеток Huh 7.5 (иммуногистохимический метод) обнаружено, что 50%-я ингибирующая доза исследуемого ЛС имм-ИФН λ-1 лежит в диапазоне концентраций 0,008–0,08 нг/мл, что согласуется с данными, полученными методом ПЦР в реальном времени.

Резюмируя результаты проведенных исследований можно утверждать, что иммобилизированный с помощью электронно-лучевой технологии ИФН λ-1 сохраняет противовирусную активность, что продемонстрировано на примере ингибирования вируса гепатита С. Таким образом, иммобилизированный с помощью технологии радиационного синтеза ИФН λ-1 можно рассматривать как прототип перорального лекарственного средства для лечения вирусных гепатитов, в частности гепатита С.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа проведена в рамках исполнения Государственного контракта от 16 ноября 2015 г. № 14.N08.12.0066, ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (шифр темы проекта «2015-14-N08-0067»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Святченко В.А., Терновой В.А.* Экспериментальное обоснование применения пероральной формы пегилированного интерферона α2-b для терапии энтеровирусной инфекции // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (3). 11–16.

2. *Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий 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: 08.11.2017.

3. Пат. 2409669 РФ. Способ иммобилизации биологически активных веществ на полимерных носителях (варианты) и конъюгаты, полученные данным способом / *А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, Е.И. Верещагин*; Опубл. 20.01.2011.

4. *Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., Rice C.M.*

Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics // Gastroenterology. 2006. 131. 1887–1898.

5. *Veronese F.M., Pasut G*. Protein PEGylation // Long acting injections and implants / Eds. J.C. Wright, D.J. Burgess. N.Y.; Dordrecht; Heidelberg; L.: Springer, 2012. 295–314.

INVESTIGATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF AN ORAL DRUG PREPARATION BASED ON IMMOBILIZED INTERFERON λ-1

Dmitriy Nikolaevich KINSHT[1,2], Pavel Gennad'evich MADONOV[1,2], Galina Vadimovna KOCHNEVA[3], Tatyana Sergeevna TARTYNOVA[1], German Igorevich BAYKALOV[1]

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

[2] *«Scientific Future Management» company*
630559, Novosibirsk region, settlement Koltsovo, Tecnoparkovaya str., 10

[3] *State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»*
630559, Novosibirsk region, settlement Koltsovo

Despite the success in developing direct-acting antiviral drugs, in routine clinical practice the use of interferons remains relevant. Parenteral administration of interferons is accompanied by systemic side effects and presents significant inconveniences for patients. A drug based on interferon λ-1, which has high enteric bioavailability and ensures its high concentration in the liver, is promising for the effective treatment of hepatotropic viruses. The aim of the investigation was to study the antiviral activity of an oral medicine based on interferon λ-1 immobilized on polyethylene glycol-1500 by electron-beam synthesis technology. **Materials and methods**: Real time PCR, Western blot and immunohistochemical method were used to study antiviral activity of tested medicine against hepatitis C virus. **Results and discussion**: The tested medicine retains antiviral activity against hepatitis C virus. All obtained results are consistent with each other. A 50 % inhibitory dose is in the range of 0.008–0.08 ng/ml. **Conclusion**: IFN λ-1 immobilized on polyethylene glycol with the help of radiation synthesis technology can be considered as a prototype of an oral drug for the treatment of viral hepatitis, in particular hepatitis C.

Key words: interferon λ-1, hepatotropic viruses, hepatitis C virus, immobilization, electron-beam immobilization, immobilized interferon λ-1.

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*
Kochneva G.V. *– doctor of biological sciences, head of the laboratory of viral hepatitis*
Tartynova T.S. *– clinical resident of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine*
Baikalov G.I. *– student*

УДК: 616.62-008.222-055.2-091:615.849.19:618.15-076 DOI: 10.15372/SSMJ20180305

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ ЭРБИЕВОГО ЛАЗЕРА В КОРРЕКЦИИ СТРЕССОВОГО НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У ЖЕНЩИН

Галина Анатольевна ЛАПИЙ[1], Ася Юрьевна ЯКОВЛЕВА[1], Натиг Ариф-оглы АБДУЛЛАЕВ[1], Александр Израилевич НЕЙМАРК[2]

[1] *Институт молекулярной патологии и патоморфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины*
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

[2] *Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России*
656038, г. Барнаул, просп. Ленина, 40

Цель исследования – изучить характер патоморфологических изменений передней стенки влагалища у женщин со стрессовым недержанием мочи, получавших лечение с применением эрбиевого лазера Fotona. **Материал и методы.** Проведен комплексный патоморфологический анализ биоптатов слизистой оболочки влагалища (СОВ) у женщин со стрессовым недержанием мочи (СНМ) до и после воздействия Er-YAG-лазером. **Результаты.** Показано, что ведущими характеристиками ремоделирования СОВ при СНМ являются дезорганизация фибриллярных структур (коллагеновых и эластических волокон) межклеточного матрикса, микроциркуляторные нарушения, дистрофические и атрофические изменения эпителия. После применения лазерной технологии IncontiLase в СОВ выявлены признаки стимуляции процессов неоколлагеногенеза и неоэластогенеза, усиление неоангиогенеза, восполнение популяции синтетически активных фибробластов, повышение пролиферации (увеличение индекса Ki-67-позитивных эпителиоцитов на 67 %) и улучшение структуры влагалищного эпителия. **Заключение.** Применение Er:YAG-лазера в коррекции СНМ у женщин потенцирует восстановление морфофункциональной организации СОВ.

Ключевые слова: стрессовое недержание мочи, Er:YAG-лазер, лазерная технология IncontiLase, биопсия влагалища, морфология, морфометрия, иммуногистохимия.

Недержание мочи (НМ) у женщин относится к сложным проблемам урогинекологии в связи с его высокой распространенностью и трудностями диагностики и лечения. Почти каждая четвертая женщина в возрасте от 40 до 60 лет отмечает симптомы непроизвольной потери мочи, и распространенность НМ увеличивается с возрастом [1, 4, 14]. Наиболее частой формой НМ, составляющей до половины от всех форм женской инконтиненции, является стрессовое недержание мочи (СНМ), которым преимущественно страдают женщины активного трудоспособного возраста. Не являясь тяжелым заболеванием, эта проблема негативно влияет на здоровье и социальную активность женщин, ухудшает качество их жизни.

В формировании СНМ у женщин существенное значение имеет несостоятельность мышечно-связочных образований мочеполового тракта, изменение нормального тонуса и механической функции тканей, поддерживающих шейку мочевого пузыря и проксимальный отдел уретры [4]. Так, опущение передней стенки влагалища сопровождается утратой поддерживающей функции уретры, что обусловливает гипермобильность шейки мочевого пузыря и, как следствие, развитие СНМ. В многочисленных исследованиях приводятся данные о разнообразных структурно-метаболических нарушениях соединительнотканных образований малого таза у женщин с расстройствами мочеиспускания [10, 17, 19]. Согласно интегральной концепции, ключевое значение в альтерации соединительной ткани при СНМ у женщин принадлежит нарушениям метаболизма коллагена, эластина и трансформирующего фактора роста β [7]. Тем не менее сведения о морфогенезе СНМ все еще остаются неполными, фрагментарными и до некоторой степени противоречивыми.

Лапий Г.А. *– д.м.н., проф., зав. лабораторией общей патологии и патоморфологии, e-mail: pathol@inbox.ru*
Яковлева А.Ю. *– аспирант, e-mail: pathol@inbox.ru*
Абдуллаев Н.А.-о. *– д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии важнейших заболеваний, e-mail: pathol@inbox.ru*
Неймарк А.И. *– д.м.н., проф., зав. кафедрой урологии и нефрологии, e-mail: rector@agmu.ru*

В последние годы в гинекологической практике активно применяются инновационные лазерные технологии с использованием углекислотного (CO_2) и эрбиевого (Er:YAG) лазеров в лечении генитоуринарных расстройств, в том числе СНМ [1, 3, 11, 15, 18]. Лазерная технология IncontiLase основана на передаче излучения Er:YAG-лазера (λ = 2940 нм) на стенки влагалища специальным пакетным импульсом, что обеспечивает управляемый нагрев тканей до температуры около 60 °С без повреждения слизистой оболочки. В результате лазерного воздействия укорачиваются межмолекулярные поперечные связи тройной спирали коллагена, что приводит к мгновенному сокращению коллагеновых волокон, обработанная ткань при этом сжимается. Принято считать, что фототермическая реконструкция тканей является главным эффектом эрбиевого лазера [9, 12]. В то же время работы, посвященные анализу механизмов структурной реорганизации тканей стенки влагалища, индуцированных Er:YAG-лазером, все еще немногочисленны [2]. Морфологические эффекты лазерного воздействия при коррекции СНМ у женщин изучены недостаточно.

Целью настоящей работы было изучить характер патоморфологических изменений передней стенки влагалища у женщин со стрессовым недержанием мочи, получавших лечение с применением эрбиевого лазера Fotona.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено комплексное патоморфологическое исследование 48 биоптатов слизистой оболочки влагалища (СОВ), полученных от 23 женщин со СНМ на фоне опущения стенок влагалища. Возраст пациенток составлял от 34 до 62 лет (средний возраст 49,0 ± 12,5 года), длительность заболевания варьировала от 1 года до 6 лет. Диагноз СНМ устанавливался на основании клинико-анамнестических данных, анкетирования по опросникам PFIQ-7 и PISQ-12, результатов общего и гинекологического осмотров, лабораторных анализов, ультразвукового и уродинамического обследований [4]. Все исследования выполнены с информированного согласия женщин в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

Всем пациенткам в качестве лечебной процедуры применялась лазерная технология IncontiLase, выполняемая на эрбиевом лазере Fotona (Словения). Проводили лазерную обработку передней стенки влагалища и преддверия в области выхода мочеиспускательного канала в неаблационном тепловом режиме специальным пакетным импульсом. В каждом случае было выполнено две сессии лазерного воздействия с интервалом 1–1,5 мес., за один сеанс женщина получала 3260 (±368) импульсов. Оценку результатов лазерной коррекции проводили через 1–2 мес. после последней сессии.

Для патоморфологического анализа биоптаты передней стенки влагалища получали до начала и через 1,5–2 мес. после проведения лазерной коррекции. Парафиновые срезы (4 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином в сочетании с реакцией Перлса, по ван Гизону с докрашиванием эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили PAS-реакцию. Для приготовления полутонких срезов образцы ткани обрабатывали по методике, предназначенной для электронной микроскопии, и заливали в смесь эпона и араллдита. Полутонкие срезы (1 мкм) получали на ультратоме LKB III (Швеция), окрашивали азуром II и выполняли PAS-реакцию с докрашиванием азуром II. Светооптическое изучение парафиновых и полутонких срезов проводили в универсальном микроскопе Leica DM 4000B (Германия). Микрофотографии получали с помощью цифровой фотокамеры Leica DFC 320 (Германия) и компьютерной программы Leica QWin V3.

Морфометрическое исследование проводили на парафиновых срезах при увеличении в 400 раз с помощью компьютерной программы Leica QWin V3. Определяли толщину многослойного плоского эпителия (мкм), число профилей микрососудов в тестовой площади, диаметр кровеносных капилляров (мкм), объемную плотность капилляров подэпителиальной кровеносной сети (в процентах к общей площади подэпителиальной стромы).

При оценке патоморфологических изменений СОВ применяли полуколичественный анализ в баллах. Выраженность каждого анализируемого признака оценивали по четырехбалльной шкале: 0 – отсутствие признака, 1 – слабо выраженный признак (выявление признака на площади не более 20 % от площади всего среза), 2 – умеренно выраженный признак (выявление признака на площади не более 50 % от площади всего среза), 3 – значительно выраженный признак (выявление признака на площади более 50 % от площади всего среза).

Иммуногистохимическое изучение пролиферативной функции эпителия влагалища выполняли на парафиновых срезах с использованием маркера клеточной пролиферации Ki-67. Применяли непрямой двухшаговый метод (первичные антитела и система визуализации фирмы Spring, США). Первичные антитела использовали в раз-

ведении 1:100, в качестве хромогена применяли DAB. Результаты иммуногистохимических реакций оценивали по величине индекса меченых Ki-67 ядер эпителиоцитов, который определяли путем подсчета количества позитивно окрашенных ядер в базальном и парабазальном слоях эпителия на выборке не менее 500 клеток.

Проверку статистической гипотезы о нормальности распределения и равенстве выборочных дисперсий осуществляли с использованием критериев Шапиро – Уилка и Левена. Для данных, характеризующихся нормальным распределением, определяли средние значения исследуемых параметров, дисперсию и стандартную ошибку среднего; при сравнении связанных выборок использовали парный *t*-критерий Стьюдента. В остальных случаях определяли медиану (Me) и квартили распределения (25-й и 75-й процентили, LQ и UQ), при сравнении данных применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Значимость различий принимали при $p \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате патоморфологического исследования биоптатов передней стенки влагалища, взятых у пациенток со СНМ до проведения лазерной коррекции, во всех случаях выявлены нарушения структурной организации СОВ. Основными признаками, характеризующими патологический процесс, были дезорганизация фибриллярных структур межклеточного матрикса, расстройства микроциркуляции, дистрофические и атрофические изменения многослойного плоского неороговевающего эпителия. Выраженность патоморфологических изменений в различных наблюдениях варьировала и, как правило, нарастала по мере увеличения тяжести заболевания.

Светооптически в образцах СОВ выявлялись участки разрыхления и фрагментации коллагеновых волокон, чередующиеся с очагами фиброзирования, что создавало определенную мозаичность коллагенового каркаса. Поверхностные слои ткани чаще были уплотнены, вдающиеся в эпителий стромальные сосочки редуцированы, в подэпителиальных пространствах определялось накопление грубых эластических фибрилл (рис. 1, *а*). Строма была в различной степени разрыхлена, коллагеновые пучки местами истончены и разволокнены, на других участках – огрублены, нередко фрагментированы.

К характерным особенностям СОВ при СНМ следует отнести пониженное содержание эластических волокон, их фрагментацию, зернистую дегенерацию, литические изменения. В некоторых препаратах эластические структуры были представлены исключительно в виде зерен и гранул или отдельно расположенных укороченных фибрилл.

Кровеносные капилляры в большинстве биоптатов были немногочисленными и характеризовались суженными просветами, выстланными дистрофически измененным эндотелием (рис. 1, *б*). Вместе с тем в субэпителиальной строме, чаще при легкой степени патологического процесса, иногда выявлялись микрососуды с признаками стаза эритроцитов.

Обращала на себя внимание малочисленность популяции соединительнотканных клеток СОВ, в составе которой преобладали фиброциты (рис. 1, *в*). В значительно меньшем количестве были представлены фибробласты с признаками синтетической активности. В некоторых препаратах в небольшом количестве выявлялись рассеянные лимфоцитарные клетки, единичные макрофаги и плазмоциты, но полинуклеарные лейкоциты не встречались.

Многослойный плоский неороговевающий эпителий влагалища в большинстве образцов характеризовался дистрофическими изменениями в виде разрыхления эпителиального пласта, вакуолизации клеток, частичной десквамации поверхностного слоя (рис. 1, *г*). В случаях атрофии эпителиальный пласт был значительно истончен, количество клеточных рядов в нем уменьшено, базальный рельеф заметно сглажен.

Через 1,5–2 мес. после лазерного воздействия в биоптатах передней стенки влагалища обнаружены признаки структурной реорганизации СОВ, отражающие регрессию патологических изменений в сочетании с потенцированием восстановления ее строения. Многослойный плоский неороговевающий эпителий влагалища по сравнению с первичной биопсией отличался значительным уменьшением дистрофических изменений, восстановлением микроархитектоники клеточных слоев, высокой насыщенностью цитоплазмы клеток гликогеном, отсутствием признаков разрыхления и межклеточного отека (рис. 2, *а*). Наблюдалось усложнение базального рельефа эпителия вследствие формирования акантотических выростов. По данным морфометрического исследования, толщина эпителиального пласта, составляющая в биоптатах до лазерной коррекции 114,19 ± 17,31 мкм, после воздействия Er:YAG-лазером увеличилась до 187,83 ± 15,35 мкм (на 64,5 %, $p \leq 0{,}01$), что свидетельствовало о редукции явлений атрофии.

По данным иммуногистохимического анализа, маркер клеточной пролиферации Ki-67 в СОВ при СНМ обнаружен в ядрах клеток парабазаль-

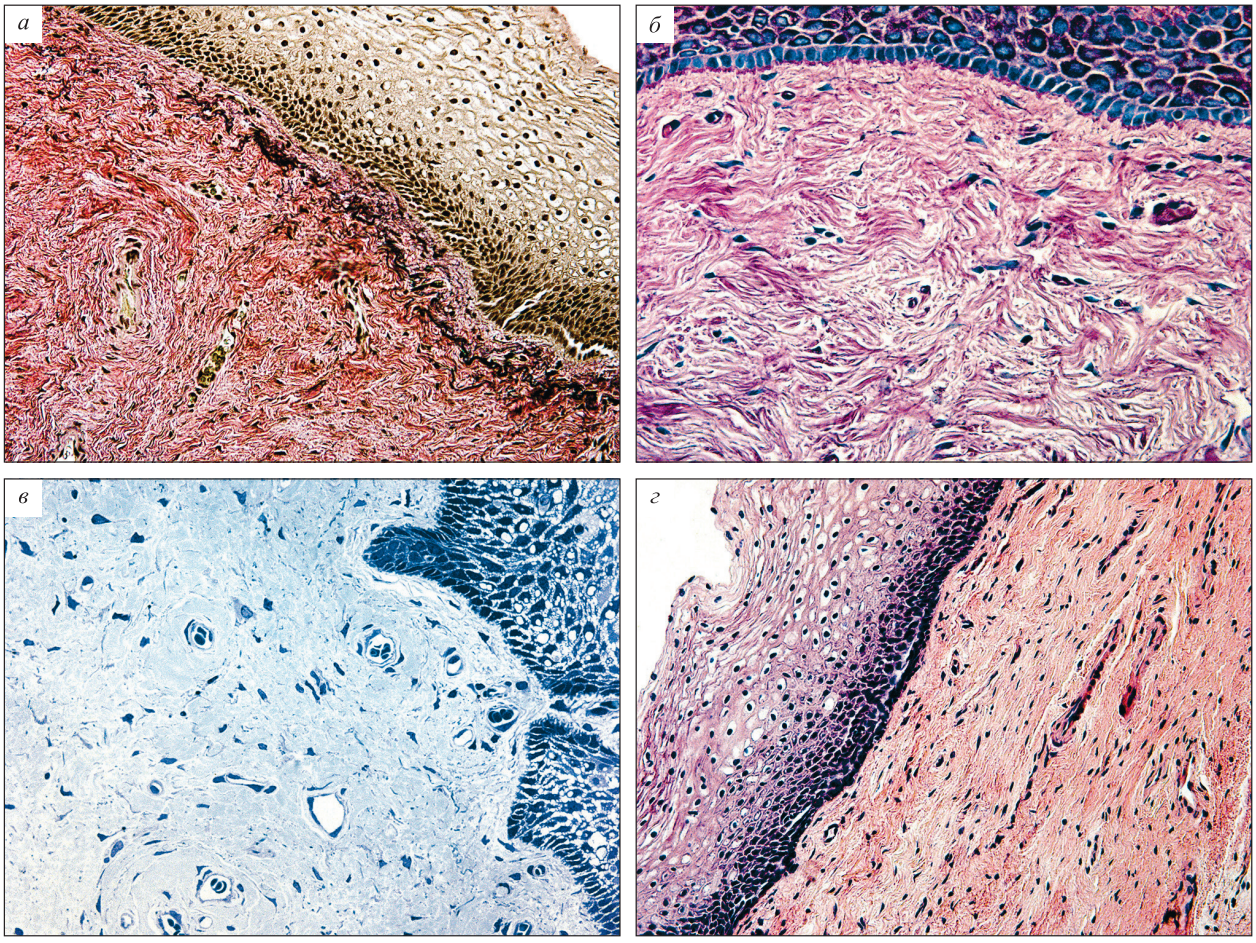

Рис. 1. *Морфологические изменения слизистой оболочки влагалища при стрессовом недержании мочи до применения Er:YAG-лазера. а – утолщение коллагеновых пучков, накопление эластических волокон в подэпителиальной зоне, дистрофические изменения эпителия. Окраска по ван Гизону. × 200. б – дезорганизация и фрагментация коллагеновых волокон, малочисленные кровеносные капилляры. ШИК-реакция. × 400. в – очаги уплотнения и разрыхления межклеточного матрикса, немногочисленные соединительнотканные клетки, дистрофические изменения эпителия. Полутонкий срез, окраска азуром II. × 400. г– эпителий влагалища с признаками выраженной дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином. × 200*

ного и базального слоев эпителия (рис. 3, *а*). Индекс метки Ki-67 до лазерного воздействия составил 19,05 ± 2,86 %, после проведения лазерной коррекции увеличился до 31,79 ± 2,25 % ($p < 0,05$) (рис. 3, *б*). При этом обращало на себя внимание более интенсивное окрашивание клеточных ядер по сравнению с первичным исследованием независимо от исходно регистрируемых дистрофических или атрофических изменений эпителия.

Важным морфологическим признаком СОВ после лазерной коррекции было усиление процессов неоангиогенеза (см. рис. 2, *б*). По результатам морфометрии, число профилей капилляров в тестовой площади, равное до воздействия 8,5±0,63, после воздействия Er:YAG-лазером возросло до 12,1 ± 1,07 ($p \leq 0,05$). Показатели объемной плотности микрососудов соответственно увеличились с 1,8 ± 0,2 до 2,9 ± 0,3 % ($p \leq 0,01$). При этом кровеносные капилляры преимущественно имели типичное строение, явления полнокровия и стаза эритроцитов в препаратах практически не определялись.

Значительным модификациям подвергались фибриллярные структуры межклеточного матрикса, что выражалось появлением очагов разрастания коллагеновых волокон, формированием стромальных сосочков. Наблюдалось более упорядоченное распределение волокон, редукция явлений их разрыхления и фрагментации, что в целом свидетельствовало об улучшении микроархитектоники коллагенового каркаса с равномерным уплотнением стромы без признаков фиброзирования. В большинстве биоптатов стенки влагалища после воздействия Er:YAG-лазером

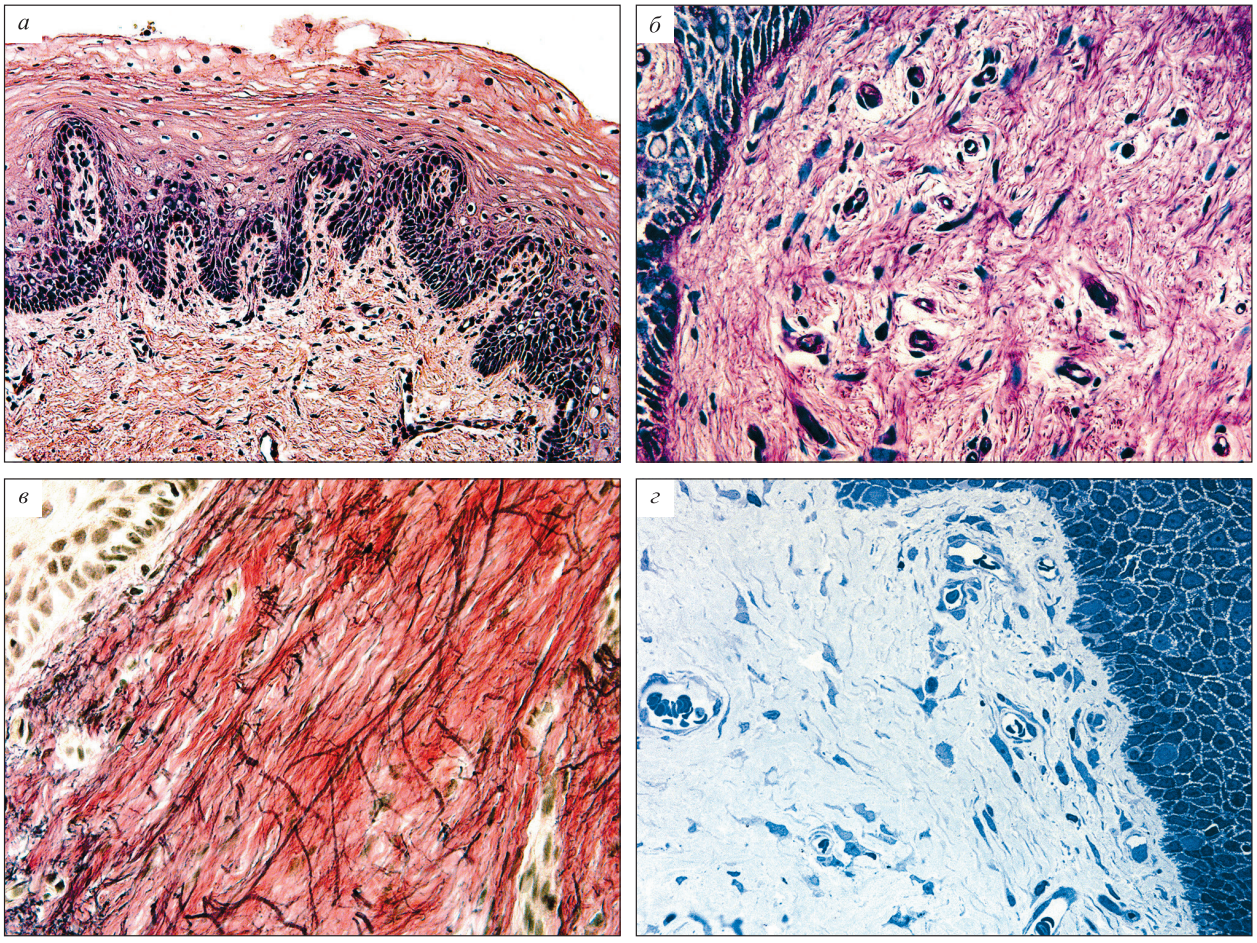

Рис. 2. *Морфологические характеристики слизистой оболочки влагалища при стрессовом недержании мочи после применения Er:YAG-лазера. а – восстановление структуры многослойного плоского неороговевающего эпителия влагалища. Окраска гематоксилином и эозином. × 200. б – в очаге неоангиогенеза многочисленные капилляры и крупные фибробласты. ШИК-реакция. × 400. в – разрастание эластических волокон в слизистой оболочке влагалища. Окраска по ван Гизону. × 400. г – множество фибробластов в подэпителиальной строме. Полутонкий срез, окраска азуром II. × 400*

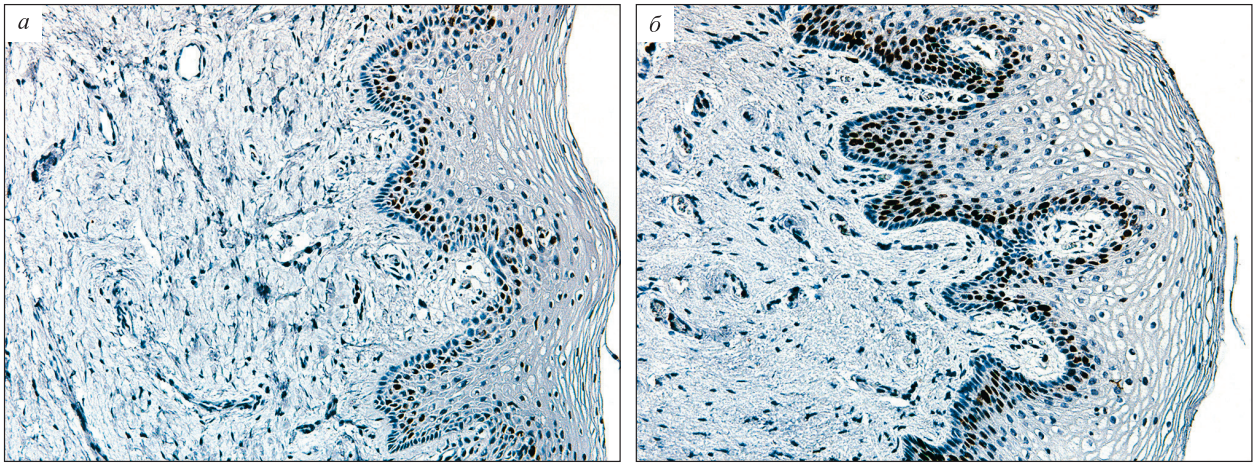

Рис. 3. *Иммуногистохимическое исследование пролиферативной функции эпителия слизистой оболочки влагалища в условиях лазерной коррекции. а – экспрессия Ki-67 в ядрах клеток влагалищного эпителия до воздействия Er:YAG-лазера. × 200. б – экспрессия Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток после воздействия Er:YAG-лазера. × 200*

Таблица

Оценка в баллах патоморфологических изменений слизистой оболочки влагалища при стрессовом недержании мочи в условиях воздействия Er:YAG-лазером, Me (LQ–UQ)

Патоморфологический признак	До воздействия	После воздействия	*p*
Морфологические изменения, ассоциированные с деструктивно-дистрофическими процессами			
Дистрофия эпителия	2,0 (2,0–3,0)	1,0 (1,0–1,0)	0,0015
Атрофия эпителия	2,0 (1,0–3,0)	0,0 (0,0–1,0)	0,0015
Разрыхление коллагеновых волокон	2,0 (2,0–2,0)	0,0 (0,0–0,5)	0,0006
Фрагментация коллагеновых волокон	1,0 (1,0–2,0)	0,0 (0,0–1,0)	0,003
Фрагментация эластических волокон	2,0 (2,0–3,0)	1,0 (1,0–1,5)	0,0006
Очаговое фиброзирование	2,0 (1,0–2,0)	1,0 (0,5–1,0)	0,003
Стаз в микрососудах	2,0 (1,0–2,0)	0,0 (0,0–1,0)	0,006
Лимфомакрофагальная инфильтрация	1,0 (1,0–1,5)	1,0 (0,5–1,0)	0,13
Морфологические изменения, ассоциированные с регенераторно-пролиферативными реакциями			
Содержание микрососудов	2,0 (1,5–2,0)	3,0 (2,0–3,0)	0,002
Содержание эластических волокон	1,0 (1,0–2,0)	2,0 (2,0–3,0)	0,003
Общее количество фибробластов	2,0 (2,0–2,0)	2,0 (2,0–3,0)	0,05
Количество синтетически активных фибробластов	1,0 (1,0–2,0)	3,0 (2,0–3,0)	0,001

отмечены признаки новообразования эластических волокон различной интенсивности. Так, в одних препаратах визуализировались длинные эластические фибриллы, расположенные в верхних участках стромы (см. рис. 2, *в*), в других образцах выявлялись скопления переплетающихся эластических волокон в более глубоких слоях ткани. При этом иногда сохранялись признаки их фрагментации, но менее выраженные по сравнению с первичным исследованием.

Обращало на себя внимание наличие в СОВ значительного числа крупных фибробластов с признаками синтетической активности. Нередко они локализовались в подэпителиальной строме, вблизи микрососудов (см. рис. 2, *г*). В некоторых биоптатах определялась также незначительная лимфомакрофагальная инфильтрация, как правило, при отсутствии полиморфно-ядерных лейкоцитов.

Применение балльной оценки патоморфологических изменений СОВ при СНМ в условиях воздействия Er:YAG-лазером позволило установить снижение выраженности морфологических изменений, ассоциированных с деструктивно-дистрофическими процессами, более чем в 2 раза (таблица). Одновременно происходило заметное повышение балльных оценок морфологических изменений, ассоциированных с регенераторно-пролиферативными реакциями, что можно расценивать как стимуляцию процессов репаративной регенерации в СОВ после использования лазерной технологии IncontiLase.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет считать, что при СНМ в передней стенке влагалища развивается сложный комплекс патоморфологических изменений с вовлечением в патологический процесс всех слоев и структурных компонентов СОВ, прежде всего коллагеновых и эластических волокон, сосудов микроциркуляторного русла, клеточных популяций эпителия и стромы. Принято считать, что аномальное ремоделирование межклеточного матрикса лежит в основе нарушения структурной организации и функциональных свойств парауретральных тканей, обусловливая развитие СНМ [7, 10, 19].

В патоморфологической картине изученных биоптатов наиболее типичными событиями были прогрессирующие по мере утяжеления стрессовой инконтиненции и опущения стенок влагалища дистрофически-дегенеративные изменения фибриллярных, васкулярных и клеточных структур при отсутствии воспалительных элементов, что указывало на низкий уровень регенеративных реакций и тканевого метаболизма. В связи с этим можно высказать предположение, что существенным звеном ремоделирования СОВ при СНМ является недостаточность пластических (регенераторных) резервов ткани, обеспечивающих процессы регенерации и восстановления поврежденных и изношенных структур, что способствует возникновению и развитию морфофункциональной неполноценности стенки влагалища.

После применения лазерной технологии IncontiLase обращали на себя внимание признаки структурной реорганизации СОВ, совокупность которых свидетельствовала о стимуляции процессов репаративной регенерации. Ведущими морфологическими феноменами в биоптатах были явления неоколлагеногенеза и неоэластогенеза, ассоциированные с увеличенной популяцией синтетически активных фибробластов. В этом отношении следует отметить, что локальное воздействие лазерной энергии изменяет уровень секреции основного фактора роста фибробластов и трансформирующего фактора роста β в ткани [13]. Имеются данные, что тепловой шок 60 °С, активируя синтез белков теплового шока, стимулирует дермальные фибробласты к увеличению экспрессии проколлагенов типа I и III [8].

Важной характеристикой СОВ после воздействия Er:YAG-лазера было появление очагов неоангиогенеза с формированием кровеносных капилляров типичного строения, уменьшение явлений стаза в микрососудах, что свидетельствовало о повышении уровня васкуляризации ткани и подтверждалось данными лазерной допплеровской флоуметрии, показавшими значительное улучшение и нормализацию показателей микроциркуляции в стенке влагалища [5]. Реорганизация стромальных компонентов СОВ сопровождалась повышением клеточной пролиферации и восстановлением микроархитектоники влагалищного эпителия, что соответствует концепции эпителиально-соединительнотканных корреляций [6]. Выявленные нами морфологические особенности СОВ у женщин со СНМ после проведения лазерной коррекции согласуются с данными других исследователей [2, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СОВ у женщин со СНМ подвергается значительному ремоделированию, основными патоморфологическими характеристиками которого являются дезорганизация коллагеновых и эластических волокон, микроциркуляторные нарушения, изменения эпителиальных и соединительнотканных клеточных популяций. Применение лазерной технологии IncontiLase приводит к структурной реорганизации СОВ, к наиболее значимым событиям которой следует отнести стимуляцию процессов неоколлагеногенеза и неоэластогенеза, усиление неоангиогенеза, восполнение популяции синтетически активных фибробластов, повышение клеточной пролиферации и редукцию дистрофически-атрофических изменений влагалищного эпителия. Таким образом, выявленные изменения свидетельствуют, что лазерная коррекция СНМ у женщин потенцирует восстановление морфофункциональной организации СОВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аполихина И.А., Додова Е.Г., Бородина Е.А., Саидова А.С., Филиппенкова Е.В.* Дисфункция тазового дна: современные принципы диагностики и лечения // Эффектив. фармакотерапия. 2016. (22). 16–22.

2. *Безменко А.А., Шмидт А.А., Коваль А.А., Карпищенко Ж.М.* Консервативные методы лечения недержания мочи при напряжении у женщин // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. 2014. 45. (1). 227–232.

3. *Доброхотова Ю.Э., Ильина И.Ю., Венедиктова М.Г., Морозова К.В., Суворова В.А., Залесская С.А.* Применение эрбиевого лазера в лечении генитоуринарных расстройств // Акушерство и гинекология. 2017. (10). 84–91.

4. *Неймарк А.И., Раздорская М.В.* Недержание мочи у женщин. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 123 с.

5. *Неймарк А.И., Яковлева А.Ю., Лапий Г.А.* Применение лазерной допплеровской флоуметрии в оценке микроциркуляции в стенке влагалища при лечении стрессового недержания мочи // Лазер. мед. 2017. 21. (1). 27–29.

6. *Непомнящих Г.И.* Биопсия бронхов: Морфогенез общепатологических процессов в легких. М.: Изд-во РАМН, 2005. 384 с.

7. *Chen B., Yeh J.* Alterations in connective tissue metabolism in stress incontinence and prolapse // J. Urol. 2011. 186. (5). 1768–1772.

8. *Dams S.D., de Liefde-van Beest M., Nuijs A.M., Oomens C.W., Baaijens F.P.* Heat shocks enhance procollagen type I and III expression in fibroblasts in *ex vivo* human skin // Skin. Res. Technol. 2011. 17. (2). 167–180.

9. *El-Domyati M., Abd-El-Raheem T., Medhat W., Abdel-Wahab H., Al Anwer M.* Multiple fractional erbium: yttrium-aluminum-garnet laser sessions for upper facial rejuvenation: clinical and histological implications and expectations // J. Cosmet. Dermatol. 2014. 13. (1). 30–37.

10. *Han L., Wang L., Wang Q., Li H., Zang H.* Association between pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence with collagen // Exp. Ther. Med. 2014. 7. (5). 1337–1341.

11. *Gambacciani M., Palacios S.* Laser therapy for the restoration of vaginal function // Moturitas. 2017. 99. 10–15.

12. *Kono A., Oguri A., Yokoo K., Watanabe H.* YAG laser treatment causes rapid degeneration and regeneration of collagen fibres in pig skin and facilitates fibroblast growth // J. Plast. Surg. Hand Surg. 2012. 46. (5). 308–312.

13. *Manolis E.N., Kaklamanos I.G., Spanakis N., Filippou D.K., Panagiotaropoulos T., Tsakris A., Siomos K.* Tissue concentration of transforming growth

factor beta 1 and basic fibroblast growth factor in skin wounds created with a CO_2 laser and scalpel: a comparative experimental study, using an animal model of skin resurfacing // Wound Repair Regen. 2007. 15. (2). 252–257.

14. *Minassian V.A., Stewart W.F., Wood G.C.* Urinary incontinence in women: variation in prevalence estimates and risk factors // Obstet. Gynecol. 2008. 111. (2). Pt. 1. 324–331.

15. *Pardo J.I., Solà V.R., Morales A.A.* Treatment of female stress urinary incontinence with Erbium-YAG laser in non-ablative mode // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2016. 204. 1–4.

16. *Salvatore S., Leone Roberti Maggiore U., Athanasiou S., Origoni M., Candiani M., Calligaro A., Zerbinati N.* Histological study on the effects of microablative fractional CO_2 laser on atrophic vaginal tissue: an *ex vivo* study // Menopause. 2015. 22. (8). 845–849.

17. *Suzme R., Yalcin O., Gurdol F., Gungor F., Bilir A.* Connective tissue alterations in women with pelvic organ prolapse and urinary incontinence // Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2007. 86. (7). 882–888.

18. *Vizintin Z., Lukac M., Kazic M., Tettamanti M.* Erbium laser in gynecology // Climacteric. 2015. 18. (1). 4–8.

19. *Wang L., Han L.Y., Li H.L.* Etiological study of pelvic organ prolapses and stress urinary incontinence with collagen status and metabolism // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2013. 93. (7). 500–503. [In Chinese].

PATHOMORPHOLOGICAL ANALYSIS OF ERBIUM LASER APPLICATION TO CORRECTION OF STRESS URINARY INCONTINENCE IN WOMEN

Galina Anatolevna LAPIY[1], Asya Yurevna YAKOVLEVA[1], Natig Arif-ogly ABDULLAEV[1], Aleksandr Izrailevich NEYMARK[2]

[1] *Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine 630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

[2] *Altaic State Medical University 656038, Barnaul, Lenin av., 40*

The aim of the investigation is to study the pathomorphological changes in the anterior vaginal wall in women with stress urinary incontinence, who received correction using an erbium laser Fotona. **Material and methods.** The complex pathomorphological analysis of the biopsy specimens of the vaginal mucosa (VM) in women with stress urinary incontinence (SUI) before and after exposure Er-YAG-laser was performed. **Results.** It is shown that the main signs of remodeling of VM during SUI are disorganization of fibrillar structures (collagen and elastic fibers) of the intercellular matrix, microcirculation disorders, dystrophic and atrophic changes in the epithelium. After application of laser technology IncontiLase in the VM, signs of stimulation of neocollagenogenesis and neoelastogenesis processes, enhancement of neoangiogenesis, replenishment of a population of synthetically active fibroblasts, increased proliferation (an increase in the index of Ki-67-positive epitheliocytes by 67 %) and improvement of the structure of the vaginal epithelium are revealed. **Conclusion.** The use of an Er-YAG laser in the correction of SUI in women potentiates the restoration of the morphofunctional organization of VM.

Key words: stress urinary incontinence, Er:YAG-laser, laser technology IncontiLase, vaginal biopsy, morphology, morphometry, immunohistochemistry.

Lapiy G.A. *– doctor of medical sciences, head of laboratory for pathology and pathomorphology, e-mail: pathol@inbox.ru*
Yakovleva A.Yu. *– postgraduate student, e-mail: pathol@inbox.ru*
Abdullaev N.A.-o. *– doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory for clinical morphology of main diseases, e-mail: pathol@inbox.ru*
Neymark A.I. *– doctor of medical sciences, professor, head of the chair for urology and nephrology, e-mail: rector@agmu.ru*

УДК:616.12-008.1/318.8:055.2-056.52 DOI: 10.15372/SSMJ20180306

ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С НАРУШЕНИЯМИ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ У ЖЕНЩИН С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ОЖИРЕНИЯ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Ираида Георгиевна МОХОВА, Борис Борисович ПИНХАСОВ, Вера Георгиевна СЕЛЯТИЦКАЯ

НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Цель работы: изучить особенности вегетативной регуляции и их связь с пищевым поведением у женщин с разными типами ожирения и сахарным диабетом 2 типа (СД2). **Материал и методы.** Обследование женщин (n = 106) включало антропометрические измерения, исследование и расчет вариабельности ритма сердца на аппарате «ВНС-микро» («Нейрософт», Россия), анализ пищевых дневников. Тип нарушений пищевого поведения (ПП) определяли с использованием опросника DEBQ. **Результаты и их обсуждение.** Топография жироотложения у женщин связана как с особенностями вегетативной регуляции, так и с нарушениями ПП. Так, у женщин с гиноидным типом распределения жира (ГТРЖ) отмечено повышение мощности спектра как высокочастотных (HF), так и низкочастотных (LF) колебаний, а при андроидном типе распределения жира (АТРЖ), наоборот, наблюдалось общее снижение мощности спектра с остаточным доминированием симпатического звена. У женщин с АТРЖ, отягощенным СД2, выявлено повышение относительного вклада в общую мощность спектра очень низких частот VLF. У лиц с ГТРЖ преобладали эмоциогенные и компульсивные нарушения ПП, с АТРЖ – экстернальные, при этом у женщин с АТРЖ, отягощенным СД2, выраженность нарушений ПП была минимальной. Увеличение активности симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы у женщин с ГТРЖ сочеталось с симпатоадреналовыми и вагоинсулярными реакциями, что подтверждается положительной корреляционной связью эмоциогенного ПП с HF и LF, и отрицательной корреляционной связью ограничительного ПП с LF. У женщин с АТРЖ выявлена отрицательная корреляционная связь эмоциогенного ПП с VLF, а при сочетании АТРЖ с СД2 не обнаружено ни одной корреляционной связи показателей ПП с активностью отделов вегетативной нервной системы, что может быть связано с проявлениями диабетической вегетативной нейропатии.

Ключевые слова: типы распределения жировой ткани, ожирение, сахарный диабет 2 типа, вариабельность ритма сердца, пищевое поведение.

Современные представления о сердечно-сосудистой системе как обобщенном индикаторе адаптивных реакций организма позволяют использовать анализ ритма сердечных сокращений для характеристики состояния механизмов регуляции физиологических функций, включая общую активность регуляторных механизмов, нейрогуморальную регуляцию сердца, активность вегетативной нервной системы (ВНС) и соотношение активностей ее симпатического и парасимпатического отделов [3, 10]. При этом надсегментарные вегетативные аппараты неделимо соединены с мозговыми механизмами поведения, включая лимбико-ретикулярный комплекс, который в тесном взаимодействии с новой корой осуществляет формирование потребностей, конкретные мотивационные цели поведения и осуществляет реализацию поведенческих актов [5].

Учитывая особую важность ожирения как фактора риска развития многих хронических неинфекционных заболеваний, особый интерес вызывает роль ВНС в формировании адекватного пищевого поведения и поддержании массы тела. Через ВНС и соответствующие нейрогуморальные пути осуществляется контроль за использованием и потреблением энергии [9, 15], результатом чего является пищевое поведение (ПП) с высокодифференцированными эмоционально-

Мохова И.Г. *– аспирант лаборатории эндокринологии, e-mail: igmokhova@gmail.com*
Пинхасов Б.Б. *– д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эндокринологии, e-mail: pin@centercem.ru*
Селятицкая В.Г. *– д.б.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории эндокринологии, e-mail: ccem@centercem.ru*

поведенческими и гуморально-вегетативными реакциями как на голод, так и на поступление пищи в организм. При этом работ, посвященных роли ВНС в регуляции ПП в норме и у лиц с избыточной массой тела и ожирением, крайне мало, и зачастую они носят противоречивый характер [1, 5]. В то же время симпатоадреналовые и вагоинсулярные реакции на голод и на прием пищи представляют особый интерес в плане изучения патогенеза нарушений пищевого поведения [5], а следовательно, и для разработки эффективных подходов к борьбе с перееданием и для подбора адекватной диетотерапии.

Ранее проведенные исследования первичного ожирения алиментарно-конституциональной природы у женщин позволили нам выделить два патогенетически различных типа ожирения – гиноидное и андроидное, которые имеют не только особенности распределения жировой ткани в организме, но и существенные различия в метаболических и гормонально-адипокиновых характеристиках [16], ассоциированные с различными доминирующими субстратами энергетического обмена [13].

Целью настоящего исследования было изучить особенности вегетативной регуляции и их связь с пищевым поведением у женщин с разными типами ожирения и сахарным диабетом 2 типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 106 женщин, средний возраст которых составил 54,2 ± 12,9 года. Проведение исследования одобрено локальным Комитетом по биомедицинской этике и соответствовало этическим стандартам, разработанным в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и приказами Минздрава РФ. С пациентками проводили беседу, объясняющую цель и задачи исследования, на участие в котором от каждой из них получено информированное согласие. Критериями включения в исследование были избыточная масса тела и первичное ожирение алиментарно-конституциональной природы без сахарного диабета 2 типа (СД2) или в сочетании с ним; критериями исключения служили вторичное ожирение и сахарный диабет 1 типа.

Проводили антропометрическое обследование, включая измерение массы тела (МТ), роста стоя, обхватов талии (ОТ) и бедер (ОБ); рассчитывали индекс массы тела (ИМТ) как отношение массы тела (кг) к росту в квадрате ($м^2$). Вычисляли отношение ОТ/ОБ, на основании величины которого выделяли гиноидный (ГТРЖ, ОТ/ОБ < 0,85) и андроидный (АТРЖ, ОТ/ОБ ≥ 085) типы распределения жира. Все обследованные были разделены на три группы: группа 1 – женщины с ГТРЖ, ИМТ 29,1 ± 3,3 $кг/м^2$ (n = 31); группа 2 – с АТРЖ без нарушений углеводного обмена, ИМТ 34,7±6,1 $кг/м^2$ (n = 45); группа 3 – с АТРЖ и СД2, ИМТ 35,8±7,6 $кг/м^2$ (n = 30).

Исследование и расчет вариабельности сердечного ритма (ВРС) проводили на аппарате «ВНС-микро» («Нейрософт», Россия) после автоматического исключения артефактов и аритмий в последовательно бравшихся 5-минутных окнах, где анализировали продолжительность последовательных RR-интервалов синусового происхождения. Спектральный анализ выполняли с использованием быстрого преобразования Фурье. Определяли общую мощность спектра (TP), спектральные плотности мощности спектра по диапазонам очень низких (VLF), низких (LF) и высоких (HF) частот, рассчитывали индекс симпатопарасимпатического баланса (LF/HF), относительный вклад в общую мощность спектра компонентов вариабельности VLF, LF и HF в процентах от суммарной мощности колебаний.

Для определения типа нарушений ПП и оценки его выраженности в баллах использовали опросник DEBQ, включающий четыре независимые анкеты. По числу баллов в анкете также выявляли клинически значимые случаи нарушения ПП. За граничные значения, превышение которых указывало наличие клинически значимого нарушения ПП, принимали следующие величины: для эмоциогенного – 2,03, компульсивного – 2,60, экстернального – 2,68, ограничительного – 2,43 балла [21]. Выраженность тревожно-депрессивных нарушений выявляли с помощью госпитальной шкалы тревоги и депрессии (HADS) [22].

Результаты в таблицах и тексте указаны как среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение (M ± SD) или %. Для оценки межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни, для характеристики зависимости параметров применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Минимальную вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5%-м уровне значимости (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние ВНС оценивали на основании спектрального анализа ВРС. Было показано, что женщины из группы 1 имели достоверно более высокие показатели мощности спектра как в области высоких HF, так и низких частот LF, относительно женщин из 2 и 3 групп, что отрази-

Таблица 1

Спектральный анализ вариабельности сердечного ритма у женщин в исследуемых группах

Показатель	Группа			*p*		
	1	2	3	1–2	1–3	2–3
VLF, мс^2	778 ± 166	511 ± 123	720 ± 213	–	–	–
LF, мс^2	1395 ± 301	956 ± 198	1013 ± 278	0,004	0,003	–
HF, мс^2	2217 ± 467	1149 ± 358	1085 ± 334	0,039	0,012	–
TP, мс^2	4390 ± 943	2616 ± 679	2818 ± 843	0,011	0,006	–
LF/HF	0,63 ± 0,21	0,83 ± 0,20	0,93 ± 0,19	0,048	0,001	–
VLF, %	17,7 ± 2,5	19,5 ± 2,2	25,6 ± 3,4	–	0,004	0,049
LF, %	31,8 ± 2,7	36,5 ± 2,6	35,9 ± 2,4	–	–	-
HF, %	50,5 ± 3,9	43,9 ± 3,1	38,5 ± 3,3	–		0,037

Примечание. VLF – мощность спектра очень низких частот; LF – мощность спектра низких частот; HF – мощность спектра высоких частот; TP – общая мощность спектра. Здесь и в табл. 2 «–» – $p > 0,05$.

Таблица 2

Анализ нарушений пищевого поведения и выраженность тревожно-депрессивных расстройств у женщин в исследуемых группах

Показатель	Группа			*p*		
	1	2	3	1–2	1–3	2–3
Эмоциогенное ПП, баллы	1,48 ± 0,89	1,06 ± 0,74	0,68 ± 0,68	0,049	0,001	0,003
Экстернальное ПП, баллы	2,03 ± 0,74	2,39 ± 0,73	1,70 ± 0,69	0,048	–	0,004
Компульсивное ПП, баллы	2,07 ± 0,51	1,75 ± 0,86	1,17 ± 0,88	0,049	0,006	0,001
Ограничительное ПП, баллы	1,68 ± 1,02	1,87 ± 1,00	2,05 ± 1,12	–	–	–
Компонент тревога, баллы	8,93 ± 4,28	9,47 ± 3,71	10,41 ± 2,97	–	–	–
Компонент депрессия, баллы	7,43 ± 3,33	7,61 ± 3,60	9,69 ± 3,12	–	0,047	0,011
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS), баллы	16,36 ± 6,39	17,10 ± 6,28	20,11 ± 5,03	–	0,047	0,049

лось и на показателях общей мощности спектра (табл. 1). Низкие показатели мощности высоко- и низкочастотных колебаний, а также общей мощности спектра у женщин 2 и 3 групп свидетельствуют о снижении адаптивных возможностей сердечно-сосудистой системы. Такие особенности ВРС характерны для пациентов с метаболическим синдромом, артериальной гипертензией и ИБС, а у лиц с нарушениями углеводного обмена, вероятно, связаны с диабетической вегетативной нейропатией [7, 8, 11]. Так, показано, что треть пациентов с СД2 страдает ранней стадией нейропатии, которую можно выявить при помощи оценки ВРС до манифестации заболевания [19]. Следовательно, раннее обнаружение субклинической вегетативной дисфункции у пациентов с избыточной массой тела и ожирением может иметь важное значение для выделения групп риска развития СД2 и проведения соответствующих лечебно-профилактических мероприятий. Увеличение доли VLF у женщин из группы 3 свидетельствует о переходе регуляции ритма с рефлекторного уровня на филогенетически более старый, медленно и недостаточно реагирующий гуморально-метаболический уровень регуляции [7].

Анализ нарушений ПП в обследованных группах показал, что женщины с ГТРЖ имели более выраженное эмоциогенное и компульсивное ПП относительно женщин с АТРЖ (табл. 2). Эмоциогенное ПП и его пароксизмальная форма в виде компульсивного ПП являются чаще реакцией на эмоциональный дискомфорт, а не на голод. Ранее нами и другими авторами была выявлена связь эмоциогенного ПП с потреблением углеводов [4, 14]. Действительно, потребление богатой рафинированными углеводами пищи приводит к снижению тревоги, эмоционального дискомфорта и приносит чувство удовольствия.

Выраженность экстернального ПП была выше у женщин из группы 2. Экстернальный тип ПП считается одним из наиболее распространенных и характеризуется возникновением чувства голода при виде пищи, ее запаха, либо при виде других людей, принимающих пищу. Существует

теория экстернальности, согласно которой пациенты с ожирением имеют более быструю реакцию на пищу, игнорируя внутреннее чувство сытости [17]. У пациентов с экстернальным ПП снижено чувство насыщения и они имеют определенные пищевые предпочтения. Выраженность экстернального ПП коррелирует с потреблением жиров, именно их кулинарные свойства и придают пище повышенные вкусовые качества, что на фоне сниженного чувства насыщения приводит к перееданию [14] .

Несмотря на отсутствие достоверных различий в группах по ограничительному ПП, женщины из группы 3 имели наиболее высокий балл для этого типа нарушений ПП. Скорее всего, это связано с тем, что лечебная и просветительская работа врачей-эндокринологов с данным контингентом влияет на изменение пищевых пристрастий и способствует формированию нового ограничительного стереотипа питания [18]. В данной группе выраженность остальных типов ПП также была достоверно ниже относительно женщин 1 и 2 групп. Этот факт можно объяснить тем, что пациенты с СД2 при лечении начинают более строго контролировать не только свое питание (состав, кратность и т.д.), но и ПП, зачастую прибегая к волевому отказу от нежелательных продуктов.

Нарушения ПП часто ассоциированы с тревожно-депрессивными нарушениями, что и подтвердил проведенный анализ (см. табл. 2). При этом женщины из группы 3 имели достоверно более высокий уровень депрессивных нарушений и тенденцию к повышению по компоненту «тревога» относительно женщин из групп 1 и 2. У женщин в группах 1 и 2 выраженность эмоциогенного и компульсивного ПП прямо коррелировала с выраженностью тревоги ($r = 0,39$; $p < 0,05$ и $r = 0,45$; $p < 0,01$ и $r = 0,39$; $p < 0,01$ и $r = 0,38$; $p < 0,05$ соответственно для групп 1 и 2). Кроме того, у женщин из группы 2 выраженность экстернального ПП прямо коррелировала с выраженностью депрессии ($r = 0,51$; $p < 0,0001$). Следует отметить, что у женщин в группе 3, несмотря на более выраженные тревожно-депрессивные нарушения, корреляционных связей с нарушениями ПП выявлено не было.

Увеличение активности симпатического и парасимпатического отделов ВНС у женщин с ГТРЖ может сочетаться с характерными симпатоадреналовыми и вагоинсулярными реакциями, что подтверждается положительной корреляционной связью эмоциогенного ПП с HF и LF ($r = 0,41$; $p < 0,05$ и $r = 0,45$; $p < 0,05$ соответственно). С одной стороны, эмоциогенное ПП преимущественно проявляется приемом пищи на фоне эмоционального дискомфорта [6], когда можно предполагать повышение уровня симпатической активности. С другой стороны, у женщин с ГТРЖ на углеводную нагрузку выявляется функциональная гиперинсулинемия, которая провоцирует развитие постпрандиальной гипогликемии за счет повышенной утилизации глюкозы инсулинзависимыми тканями [5, 13]. Вейн А.М. [5] относит данные состояния к нейрогенным гипогликемиям (гипогликемия, возникающая после еды), характеризуя ее как типичную вагоинсулярную реакцию, которая проявляется выраженным снижением уровня глюкозы через 3–4 ч после проведения глюкозотолерантного теста или приема углеводной пищи, вслед за чем наступает реактивный рост содержания сахара в крови, связанный с активацией симпатоадреналовой системы. Чаще пациенты не могут перенести состояние гипогликемии и принимают углеводную пищу, тем самым провоцируя переедание. В данной группе также выявлена отрицательная корреляционная связь ограничительного ПП с низкочастотными колебаниями LF ($–r = 0,50$; $p < 0,01$).

В группе 2 обнаружена отрицательная корреляционная связь эмоциогенного ПП с VLF ($–r = 0,37$; $p < 0,01$). Женщины с АТРЖ, у которых преобладает не эмоциогенное, а экстернальное ПП, хорошо переносят голод, у них редко возникает желание «заесть» стрессовую ситуацию, в то же время у них часто снижено чувство насыщения, в связи с чем они и переедают. Скорее всего, у женщин с АТРЖ ожирение обусловлено гиперинсулинемией и инсулинорезистентностью, на фоне которых начинают доминировать частоты VLF. Считается, что VLF характеризует влияние высших вегетативных центров на сердечно-сосудистый подкорковый центр и отражает состояние нейрогуморального и метаболического уровней регуляции [2]. При этом в группе 3 не выявлено ни одной корреляционной связи ПП с активностью того или иного отдела ВНС, что может быть связано с проявлениями диабетической вегетативной нейропатии [20].

Расчет симпатопарасимпатического индекса, отражающего баланс симпатической и парасимпатической активности (LF/HF), подтвердил преобладание активности симпатической нервной системы у женщин из 2 и 3 групп и, напротив, женщины из группы 1 проявляли преобладание активности парасимпатической нервной системы. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что у пациентов с метаболическим синдромом, артериальной гипертензией и ИБС баланс вегетативной нервной системы смещается в сторону преобладания тонуса симпатического отдела [8, 12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вегетативная регуляция тесно связана с топографией жироотложения. Так, если при ГТРЖ выявляется повышение мощности спектра как высоко- (HF), так и низкочастотных (LF) колебаний, то при АТРЖ, наоборот, отмечено общее уменьшение мощности спектра с остаточным доминированием симпатического звена, что не только свидетельствует о снижении адаптивных возможностей сердечно-сосудистой и эндокринной систем, но и указывает на повышенный риск развития СД2.

Выявлены особенности нарушений ПП, ассоциированные с типом ожирения и проявляющиеся преобладанием эмоциогенных и компульсивных нарушений ПП у женщин с ГТРЖ и экстернальных нарушений ПП у женщин с АТРЖ. У лиц с АТРЖ, отягощенным СД2, выраженность нарушений ПП минимальная, что может быть обусловлено их более внимательным отношением к своему ПП, количеству и нутриентному составу потребляемой пищи. У обследованных выявленные нарушения ПП ассоциированы и с особенностями вегетативной регуляции, так, при ГТРЖ доминирует активность парасимпатической, а при АТРЖ – симпатической нервной системы. По мере нарастания тяжести нарушений углеводного обмена в организме начинает преобладать гуморально-метаболическая регуляция, которая обусловлена гиперинсулинемией и инсулинорезистентностью и приводит к развитию вегетативной нейропатии.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что конституционально обусловленные типы распределения жира в организме ассоциированы с доминированием разных отделов вегетативной нервной системы, которые через нейрогуморальные и метаболические уровни регуляции способствуют формированию и закреплению нарушений ПП, определяя таким образом поведенческий контур энергетического обмена при ожирении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аверьянов А.П.* Вегетативный гомеостаз и особенности адаптации у детей с ожирением // Пробл. эндокринологии. 2006. 52. (6). 21–26.

2. *Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В.* Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиологических систем // Вестн. аритмологии. 2001. (24). 65–87.

3. *Баевский Р.М., Минаков Э.В., Стрелецкая Г.Н.* Оценка нарушений вегетативной регуляции при гипертонической болезни и диабете на основе вариабельности сердечного ритма // Вестн. аритмологии. 1998. (8). 110.

4. *Вахмистров А.В., Вознесенская Т.Г., Посохов С.И.* Клинико-психологический анализ нарушений пищевого поведения при ожирении // Журн. неврологии и психиатрии. 2001. (12). 19–24.

5. *Вейн А.М., Вознесенская Т.Г.* Вегетативные расстройства: клиника, лечение, диагностика. М.: МИА, 2000. 752 с.

6. *Вознесенская Т.Г.* Расстройства пищевого поведения при ожирении и их коррекция // Ожирение и метаболизм. 2004. (2). 22–24.

7. *Григоричева Е.А., Мельников И.Ю.* Вариабельность сердечного ритма и функция эндотелия у лиц с изолированной гипертонической болезнью и в ее сочетании с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом // Артериал. гипертензия. 2013. (2). 47.

8. *Кратнов А.Е., Якимова А.В., Силкина Е.Е.* Вариабельность ритма сердца у мужчин с метаболическим синдромом // Сахар. диабет. 2013. 1. (58). 15–18.

9. *Кроненберг Г.М., Мелмед Ш., Полонски К.С., Ларсен П.Р.* Ожирение и нарушение липидного обмена. М.: Рид Элсивер, 2010. 264.

10. *Литвин Ф.Б., Цыгановский А.М., Сбитный С.Н., Забелина Л.Н., Каленникова Н.Г., Станишевская Т.И.* Вариабельность сердечного ритма у студентов с разной двигательной активностью // Учен. зап. ун-та. 2015. 7. (125). 123–129.

11. *Миронова Т.Ф., Миронов В.А., Калмыкова А.В., Давыдова Е.В., Шадрина И.М.* Ритмокардиография для анализа волновой вариабельности синусового ритма // Рос. кардиол. журн. 2007. 67. (5). 41–45.

12. *Мусихина Н.А., Петелина Т.И., Махнева Е.А., Гапон Л.И., Рошаль О.В., Утешева А.Б.* Вариабельность ритма сердца и функциональные свойства эндотелия у больных артериальной гипертонией и ишемической болезнью сердца // Урал. мед. журн. 2013. (1). 107–111.

13. *Пинхасов Б.Б., Селятицкая В.Г., Астраханцева Э.Л., Ануфриенко Е.В.* Суточные ритмы углеводного обмена у женщин с разными типами ожирения // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2016. 161. (3). 296–299.

14. *Пинхасов Б.Б., Шорин Ю.П., Селятицкая В.Г.* Нарушения пищевого поведения и предпочитаемые рационы питания у женщин с алиментарно-конституциональным ожирением // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. 2009. (1). 80–83.

15. *Романцова Т.И.* Молекулярные механизмы регуляции массы тела как мишени патогенетической терапии ожирения // Терапия. 2015. 4. (4). 71–78.

16. *Селятицкая В.Г., Пинхасов Б.Б., Карапетян А.Р., Кузьминова О.И.* Адипокины и риск развития метаболических нарушений при разных типах ожирения у женщин // Терапевт. арх. 2015. 87. (10). 80–84.

17. *Braet C.* Psychological profile to become and to stay obese // Int. J. Obes. 2005. (29). 19–23.

18. *Mannucci E., Tesi F., Ricca V., Pierazzuoli E., Barciulli E., Moretti S., Placidi G.F.* Eating behavior in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus // Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 2002. 26. (6). 848–853.

19. *Schroeder E.B., Chambless L.E., Liao D., Prineas R.J., Evans G.W., Rosamond W.D., Heiss G.* Diabetes, glucose, insulin, and heart rate variability // Diabetes Care. 2005. 28. (3). 668–674.

20. *Tiftikcioglu B.I., Bilgin S., Duksal T., Kose S., Zorlu Y.* Autonomic neuropathy and endothelial dysfunction in patients with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus // Medicine. 2016. 95. (14). 33–40.

21. *Van Strien T., Frijters J.E., Bergers G., Defares P.B.* The Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) for assessment of restrained, emotional, and external eating behavior // Int. J. Eat. Disord. 1986. 5. (2). 295–315.

22. *Zigmond A.S., Snaith R.P.* The Hospital Anxiety and Depression scale // Acta Psychiatr. Scand. 1983. 67. 361–370.

ASSESSMENT OF HEART RATE VARIABILITY IN INTERRELATIONSHIP WITH EATING BEHAVIOR DISORDERS IN WOMEN WITH DIFFERENT TYPE OF OBESITY AND TYPE 2 DIABETES

Iraida Georgievna MOKHOVA, Boris Borisovich PINKHASOV, Vera Georgievna SELYATITSKAYA

Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

Objective: to research features of vegetative regulation and their relation to eating behavior in women with different types of obesity and type 2 diabetes. **Methods.** 106 women were examined; survey of women included anthropometric measurements, study and calculation of heart rate variability were performed with “VNS-micro” (Neurosoft, Russia); recording of food consumption in 24hs were assessed. The types of eating disorders (ED) were detected with DEBQ. **Results and discussion.** Adipose tissue topography (ATT) among women is associated with vegetative regulation, as well with ED. So, the spectrum of both high-frequency (HF) and low-frequency (LF) oscillations are increased in women with gynoid type of ATT. Conversely, android type of ATT is characterized by overall decline of LF and HF oscillations with residual dominance of the sympathetic part. An increase in the relative contribution to the total power of the very low-frequency (VLF) spectrum among women has been revealed. Emotional and compulsive eating behavior disorders were prevalent in women with gynoid type of ATT, external type of ED prevailed among women with android type of ATT. Women with android type of ATT and type 2 diabetes had minimal severity of eating behavior disorders. The increase in activity of the sympathetic and parasympathetic parts of the autonomic nervous system in women with gynoid type of ATT was combined with sympathoadrenal and vagoinsular reactions, which is confirmed by a positive correlation of emotional ED with HF and LF, and there was a negative correlation of restrictive ED with LF. A negative correlation of emotional ED with VLF among women with android type ATT was detected. There are no correlation of ED indices and activity of the autonomic nervous system among women with android type of ATT and type 2 diabetes. It can be associated with manifestations of diabetic vegetative neuropathy.

Key words: types of adipose tissue topography, obesity, type 2 diabetes, heart rate variability, eating behavior.

Mokhova I.G. *– postgraduate student of the laboratory of endocrinology, e-mail: igmokhova@gmail.ru*
Pinkhasov B.B. *– doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory of endocrinology, e-mail: pin@centercem.ru*
Selyatitskaya V.G. *– doctor of biological sciences, professor, chief researcher of the laboratory of endocrinology, e-mail: ccem@centercem.ru*

УДК 617.713-089.843 DOI: 10.15372/SSMJ20180307

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СУСПЕНЗИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В ХИРУРГИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ

Екатерина Олеговна ФИЛИППОВА, Ольга Ивановна КРИВОШЕИНА

Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Цель исследования – изучить эффективность хирургического лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы с помощью оперативного вмешательства, включающего внутрикамерное введение суспензии аутологичных мононуклеаров крови с последующим ее наслоением на внутреннюю поверхность роговой оболочки. **Материал и методы.** Клинические исследования проведены среди 44 пациентов, составивших две группы: основную (21 пациент) и сравнения (23 пациента). В основной группе лечение проводилось новым методом, в группе сравнения применялась традиционная фармакотерапия. **Результаты и их обсуждение**. Уменьшение гидратации роговицы в основной группе отмечалось в течение первых 5 дней после хирургического лечения, в группе сравнения незначительное уменьшение отека роговицы начиналось на 10–12 день. Через 1 мес. после лечения показатель пахиметрии в основной группе уменьшился на 11 %, в группе сравнения – на 3,1 %, острота зрения повысилась в 5,0 и 2,0 раза соответственно. **Вывод**. Применение метода хирургического лечения ЭЭД роговицы способствует более быстрому уменьшению гидратации роговицы с восстановлением ее нормальной толщины и значительным и стабильным улучшением остроты зрения в послеоперационном периоде по сравнению с курсом консервативного лечения.

Ключевые слова: эндотелиально-эпителиальная дистрофия, аутологичные мононуклеары крови, цитокины, эндотелий, пролиферация.

В основе эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы лежит развитие хронического отека ткани роговой оболочки, сопровождающееся значительным снижением остроты зрения и выраженным болевым синдромом [1]. Многие аспекты патогенеза данного заболевания до настоящего времени остаются мало изученными, однако ведущим патогенетическим фактором считается прогрессирующее и необратимое уменьшение численности клеток эндотелия роговицы и, как следствие, утрата ими барьерной и насосной функции [2].

Патогенетически ориентированным и радикальным способом лечения ЭЭД роговицы является кератопластика в различных модификациях с заменой эндотелиального слоя, позволяющая достичь как лечебного, так и оптического эффекта [3, 10]. Однако, как и при всяком хирургическом вмешательстве, в послеоперационном периоде высок риск развития гнойных осложнений и отторжения трансплантата [6]. Использование клеточной терапии, на наш взгляд, является альтернативой радикальной хирургии [4, 11]. Особый интерес в связи с этим представляют мононуклеары крови, являющиеся источником большого числа биологически активных веществ и применяемые в клинической офтальмологии для коррекции воспалительно-репаративных реакций в тканях глазного яблока при различной патологии органа зрения [5, 9].

Цель исследования – изучить эффективность хирургического лечения ЭЭД роговицы с помощью нового метода оперативного вмешательства, включающего внутрикамерное введение суспензии аутологичных мононуклеаров крови с последующим ее наслоением на внутреннюю поверхность роговой оболочки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинические исследования проведены на базе офтальмологической клиники Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) среди 44 пациентов (31 женщина и 13 мужчин в возрасте от 52 до 71 года) с ЭЭД роговицы, которые в зависимости от способа лечения были разделены на две группы: основную и сравнения. Протокол проведения исследова-

Филиппова Е.О. *– к.т.н., ассистент кафедры офтальмологии, e-mail: katerinabosix@mail.ru*
Кривошеина О.И. *– д.м.н., зав. кафедрой офтальмологии, e-mail: oikr@yandex.ru*

ния утвержден локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета от 24.11.2014, регистрационный № 3898.

Основная группа представлена 21 пациентом (21 глаз), которым проводилось лечение новым хирургическим методом. В условиях операционной обработки операционного поля с соблюдением правил асептики и антисептики выполнялась местная анестезия (инстилляции 0,4%-го раствора инокаина, ретробульбарно 3,0 мл 2%-го раствора лидокаина) больного глаза. После выполнения в роговице двух парацентезов в один из них устанавливалась ирригационная система с подачей стерильного воздуха в переднюю камеру. Через второй парацентез с помощью шприца в переднюю камеру на границе между внутренней поверхностью роговой оболочки и воздухом аккуратно на роговицу изнутри наслаивалась суспензия аутологичных мононуклеаров крови. Далее ирригационная система удалялась, края парацентезов гидратировались. Субконъюнктивально вводился раствор антибиотика. Накладывалась монокулярная повязка. Аутологичные мононуклеары крови выделялись методом фракционирования в градиенте плотности смеси фиколла и верографина. Чистота полученных мононуклеаров составляла 96 %, жизнеспособность в тесте с трипановым синим – 97–98 %. Группа сравнения представлена 23 пациентами (23 глаза), получавшими традиционное лечение в виде инстилляций и субконъюнктивальных инъекций метаболических средств, кортикостероидов, кератопротекторов.

Пациенты обеих групп в зависимости от стадии заболевания были распределены на подгруппы: А – II степень заболевания (стромальная стадия), Б – III степень ЭЭД роговицы (буллезная). Группы были сопоставимы по полу, возрасту и тяжести поражения роговицы. При обследовании учитывались данные анамнеза: сопутствующие заболевания, срок давности поражения роговицы, проводимое ранее лечение. Необходимо отметить, что из общего числа обследованных больных 41 пациенту (93,18 %) до поступления в стационар в течение продолжительного времени регулярно проводились курсы консервативного лечения, однако без достижения стабильного положительного клинического эффекта. Всем пациентам проводилось общеофтальмологическое обследование: визометрия, биомикроскопия переднего отрезка глаза, транспальпебральное измерение внутриглазного давления, оптическая пахиметрия, конфокальная биомикроскопия, фоторегистрация. Для корректной обработки значений визометрии данные были преобразованы в единицы LogMAR. Срок наблюдения составил шесть месяцев.

Цифровой материал обработан общепринятыми методами вариационной статистики с расчетом среднего арифметического значения M и ошибки среднего m. Для оценки значимости различий при сравнении средних величин двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна – Уитни (p_U). Статистически значимым считался уровень различий $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациентов основной группы составил 61,5 ± 9,5 года, группы сравнения – 6 3± 7,0 года. Согласно данным анамнеза, поражение роговицы в большинстве случаев (63,63 %, 28 глаз) развилось после факоэмульсификации с имплантацией интраокулярной линзы, в 36,4 % (16 глаз) – после экстракапсулярной экстракции катаракты. Среди системной патологии наиболее часто встречались: ишемическая болезнь сердца – 4 пациента (19,04 %) в основной группе, 7 пациентов (30,43 %) в группе сравнения; гипертоническая болезнь – 9 пациентов (42,85 %) в основной группе, 9 пациентов (39,13 %) в группе сравнения; сахарный диабет 2 типа – 5 пациентов (23,8 %) в основной группе, 6 пациентов (26,08 %) в группе сравнения.

Клиническая картина ЭЭД роговицы у пациентов обеих групп на момент госпитализации в стационар имела сходные черты. У больных выявлялись затуманивание и значительное снижение остроты зрения (табл. 1). При биомикроскопии обнаруживался диффузный отек всех слоев роговицы, складки десцеметовой оболочки, единичные небольшие буллы. Оптический срез роговой оболочки был утолщен, что подтверждалось результатами пахиметрии (табл. 2). Уровень внутриглазного давления у всех обследованных пациентов составлял 19–20 мм рт. ст. Средняя плотность эндотелиальных клеток с учетом возраста 61,5 ± 9,5 года была снижена на 27–29 % от нормальной и составляла 1653 ± 233 кл/мм^2 в основной группе, 1590 ± 247 кл/мм^2 в группе сравнения. Средний размер эндотелиальных клеток был увеличен на 43–47 % и составлял 510 ± 34 мкм^2 в основной группе, 619 ± 29 мкм^2 в группе сравнения. Частота шестигранных клеток была снижена на 31 %: 39 ± 11 % в основной группе, 39 ± 10 % в группе сравнения.

Сравнительный анализ результатов лечения выявил значительную эффективность разработанного метода хирургического лечения ЭЭД роговицы с локальным применением суспензии

Таблица 1

Динамика остроты зрения в единицах LogMAR у больных ЭЭД роговицы в зависимости от вида лечения

Группа больных	Подгруппа	До лечения	Сроки наблюдения после начала лечения						
			1 дн.	3 дн.	5 дн.	10 дн.	1 мес.	3 мес.	6 мес.
Основная, $n = 21$	А	1,3	1,3	1,2	1,0	0,5**	0,5**	0,2**	0,2**
	Б	1,4	1,4	1,3	1,2	1,0	0,7*	0,4**	0,4**
Сравнения, $n = 23$	А	1,3	1,6	1,6	1,2	1,2	1,0	1,1	1,2
	Б	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,3

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих исходных данных: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$.

Таблица 2

Динамика толщины роговицы у больных ЭЭД роговицы в зависимости от вида лечения

Группа больных	Подгруппа	До лечения	Сроки наблюдения				
			5 дн.	10 дн.	1 мес.	3 мес.	6 мес.
Основная, $n = 21$	А	590,2 ± 1,3	582,7 ± 1,3	534,4 ± 1,2*	512,1 ± 1,2*	511,8 ± 1,2**	509,6 ± 1,2*
	Б	638,3 ± 1,3	632,4 ± 1,3	601,3 ± 1,2*	592,9 ± 1,2*	568,6 ± 1,2***	561,7 ± 1,2*
Сравнения, $n = 23$	А	600,9 ± 1,3	598,5 ± 1,3	592,3 ± 1,2	582,2 ± 1,2	583,6 ± 1,2	601,5 ± 1,2
	Б	639,1 ± 1,3	631,3 ± 1,3	628,8 ± 1,2	612,5 ± 1,2	608,2 ± 1,2	612,7 ± 1,2

аутологичных мононуклеарных лейкоцитов. Положительная динамика биомикроскопической картины роговой оболочки в виде постепенного уменьшения гидратации всех слоев роговицы, расправления складок десцеметовой оболочки у пациентов основной группы отмечалась уже в течение первых 5 дней после хирургического лечения. Повышение прозрачности роговицы наблюдалось на 10–12 день у пациентов основной группы, у пациентов группы сравнения – к концу первого месяца лечения.

Согласно результатам пахиметрии (см. табл. 2), через 10 дней после хирургического вмешательства толщина роговицы у пациентов основной группы уменьшилась на 9,4 % (подгруппа А) и на 5,8 (подгруппа Б) ($p < 0,01$), в то время как у пациентов группы сравнения – на 1,5–1,6 %. Через 1 мес. после проведенного лечения данный показатель у пациентов основной группы уменьшился на 13,2 и 7,1 % в подгруппах А и Б соответственно от первоначального значения, через 3 мес. – на 13,2 и 10,8 % ($p < 0,01$), сохраняясь на достигнутом уровне в течение 6 мес. наблюдения. У пациентов группы сравнения через 1 мес. от начала лечения толщина роговицы уменьшилась на 3,1 и 4,1 % в подгруппах А и Б соответственно и сохранялась на достигнутом уровне всего периода наблюдения. Согласно результатам эндотелиальной микроскопии, через 1 мес. после хирургического вмешательства плотность эндотелиальных клеток у пациентов основной группы увеличилась на 7,4 %, через 3 мес. – на 16,9 % от исходного уровня, в то время как у пациентов группы сравнения величина данного показателя была меньше исходного соответственно на 0,2 и 0,7 %. В то же время средний размер эндотелиальных клеток и частота шестигранных клеток статистически значимо не различались у пациентов обеих групп до и после лечения.

Согласно результатам визометрии, уже через 5 дней после проведения оперативного вмешательства средние десятичные значения остроты зрения у пациентов основной группы составляли 0,1 (подгруппа А) и 0,08 (подгруппа Б), в то время как у пациентов группы сравнения – 0,07 и 0,05 подгруппы А и Б соответственно (см. табл. 1). Через 10 дней данный показатель у больных основной группы составил 0,3 и 0,1 ($p < 0,01$), через 1 мес. – 0,3 и 0,2 подгруппы А и Б соответственно. Спустя 3 месяца после проведенного лечения острота зрения у пациентов основной группы увеличилась до значений 0,6 (подгруппа А) и 0,4 (подгруппа Б) и сохранялась на достигнутом уровне в течение всего периода наблюдений (6 мес.). У пациентов же группы сравнения наилучший показатель остроты зрения – 0,09 – был достигнут через 3 мес. после проведенного курса консервативного лечения. В дальнейшем отмечено постепенное снижение величины данного показателя – до 0,08 и 0,06 в подгруппах А и Б соответственно через 6 мес. от начала лечения (см. табл. 1).

Средний период стационарного лечения пациентов основной группы составил 9 ± 1 день, пациентов группы сравнения – 12 ± 2 дня ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно общепризнанному мнению [7], эндотелий роговицы обладает крайне низкой пролиферативной активностью. Это обусловлено, с одной стороны, эффектом контактного торможения, в котором ведущее значение принадлежит не клеточной плотности клеток эндотелия роговицы, а состоянию межклеточных взаимосвязей и взаимодействий, с другой стороны – малой концентрацией во влаге передней камеры биологически активных веществ, в частности, цитокинов, обладающих способностью активировать пролиферацию клеток различных популяций, в том числе эндотелия роговицы [8]. В экспериментах *in vitro* убедительно показано значительное (до 4,5 раза) повышение митотической активности клеток эндотелия роговицы при добавлении в культуру различных цитокинов [12]. При этом необходимо отметить, что важнейшими свойствами данных биологически активных веществ являются плейотропность, отсутствие антигенной специфичности, формирование каскадной цепи [12]. В связи с этим использование естественного комплекса цитокинов, а не отдельных пептидов, с одной стороны, максимально приближает их действие к физиологическому, а с другой – обеспечивает возможность более разносторонне корригировать спектр репаративных процессов в патологическом очаге.

Мононуклеарные лейкоциты являются одним из источников цитокинов, вовлеченных в патофизиологию воспалительного процесса, и цитокинов, регулирующих ангиогенез и фиброгенез [13]. Предположительно, введенные в переднюю камеру и адгезированные при модулирующем влиянии направленного движения внутриглазной жидкости к внутренней поверхности роговицы аутологичные мононуклеарные лейкоциты создают концентрацию биологически активных веществ, которые ослабляют межклеточные контакты и стимулируют митоз, уменьшают выраженность воспалительных реакций, оказывают индуцирующее влияние на клетки эндотелия с повышением их пролиферативной активности и регенераторной способности [3, 14].

Дополнительным механизмом действия введенных в переднюю камеру аутологичных мононуклеарных лейкоцитов может быть их индуцирующее действие на стволовые клетки, локализующиеся в области кольца Швальбе [15], однако данное предположение требует дополнительных экспериментальных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение нового метода хирургического лечения ЭЭД роговицы способствует более быстрому уменьшению гидратации роговой оболочки с восстановлением ее нормальной толщины и значительным и стабильным улучшением остроты зрения в послеоперационном периоде по сравнению с курсом консервативного лечения. Это, в свою очередь, позволяет сократить продолжительность стационарного лечения в 1,4 раза.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00048.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Беляковский П.В., Лобанок Е.С.* Перспективы применения стволовых клеток в офтальмологии // Офтальмология в Беларуси. 2009. (2). 81–91.

2. *Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б.* Цитокины в клинической офтальмологии. Уфа: Уфимский полиграфкомбинат, 2008. 152 с.

3. *Запускалов И.В., Кривошеина О.И.* Современная фармакотерапия язвенных поражений роговицы: применение аутологичных мононуклеаров крови. Саабрюкен: Lambert Academic Publishing, 2013. 121 с.

4. *Каспаров А.А.* Локальная экспресс-аутоцитокинотерапия (комплекс цитокинов) в лечении вирусных и невирусных поражений глаз // Вестн. офтальмологии. 2001. (3). 45–47.

5. *Каспаров А.А., Каспарова Е.А., Фадеева Л.Л.* Персонализированная клеточная терапия ранней буллезной кератопатии (экспериментальное обоснование и клинические результаты) // Вестн. офтальмол. 2013. (5). 53–61.

6. *Каспарова Е.А.* К вопросу о теоретическом обосновании методики локальной экспресс-аутоцитокинотерапии // Вестн. офтальмологии. 2002. (3). 25–27.

7. *Каспарова Е.А., Суббот А.М.* Пролиферативный потенциал заднего эпителия роговицы человека // Вестн. офтальмологии. 2013. (3). 82–88.

8. *Левченко Н.А.* Интрастромальное введение аутологичных мононуклеаров крови в комплексном лечении язвенных кератитов различной этиологии: автореф. дис. … канд. мед. наук. Красноярск, 2012.

9. *Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.* Закономерности регенерации роговицы при эндотелиально-эпителиальной дистрофии на фоне локального применения аутологичных мононуклеаров крови // Соврем. технология в офтальмологии. 2016. (4). 234–238.

10. *Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.* Методы консервативного и хирургического лечения эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы // Точка зрения. Восток – Запад. 2017. (1). 83–86.

11. *Филиппова Е.О., Кривошеина О.И., Запускалов И.В.* Локальное применение аутологичных мононуклеаров крови в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Бюл. сиб. мед. 2016. 15. (2). 70–75.

12. *Acar B.T., Akdemir M.O., Acar S.* Visual acuity and endothelial cell density with respect to the graft thickness in Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: One year results // Int. J. Ophthalmol. 2014. 7. 974–979.

13. *Bhandari V., Reddy J.K., Siddharthan K.S., Singhania N.* Simultaneous Descemet's membrane endothelial keratoplasty and posterior iris-claw-fixated intra ocular lens implantation (IOL) in management of aphakic bullous keratopathy // Int. Ophthalmol. 2016. 36. (3). 305–311.

14. *Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T.* Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy // Mol. Vis. 2014. 20. 683–690.

15. *Forest F., Thuret G., Gain P., Dumollard J.M., Peoc'h M., Perrache C., He Z.* Optimization of immunostaining on flat-mounted human corneas // Mol. Vis. 2015. 21. 1345–1356.

EFFECTIVENESS OF MONONUCLEAR LEUKOCYTE SUSPENSION APPLICATION IN BULLOUS KERATOPATHY SURGERY

Ekaterina Olegovna FILIPPOVA, Olga Ivanovna KRIVOSHEINA

Siberian Medical State University of Minzdrav of Russia
634050, Tomsk, Moskovskiy tract, 2

The aim of the research was to study the effectiveness of bullous keratopathy surgical treatment by modified method of operative intervention including intra-chamber injection of autologous blood mononuclear cells suspension with subsequent layering on the inner surface of the cornea. **Material and methods.** Clinical studies were conducted among 44 patients who comprised two groups: the main group (21 patients) and comparison group (23 patients). The treatment of the main group was carried out by a new method. The treatment of the comparison group was traditional pharmacotherapy. **Results and discussion.** The cornea hydration reduction in the main group was noted during the first 5 days after surgical treatment. The moderate decrease of corneal oedema in the comparison group started on 10–12 days. The pachymetry index decreased by 11 % in the main group and by 3.1 % in the comparison group after 1 month of treatment. Visual acuity increased fivefold in the main group and twofold in the comparison group. **Conclusion**. The use of the modified surgical treatment of the bullous keratopathy promotes a faster decrease in the cornea hydration and stable improvement in visual acuity in the postoperative period compared with the course of conservative treatment.

Key words: bullous keratopathy, autologous blood mononuclear cells, cytokines, endothelium, proliferation.

Filippova E.O. *– candidate of technical sciences, assistant of the department of ophthalmology, e-mail: katerinabosix@mail.ru*
Krivosheina O.I. *– doctor of medical sciences, head of the department of ophthalmology, e-mail: oikr@yandex.ru*

УДК: 616.3+616.98:579.835 DOI: 10.15372/SSMJ20180308

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕЧЕНИ С МАРКЕРАМИ HCV- И HBV-ИНФЕКЦИИ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ КОЛОНИЗАЦИИ *Helicobacter pylori*

Давид Львович НЕПОМНЯЩИХ[1], Ольга Алексеевна ПОСТНИКОВА[1], Елена Ивановна МИГУСЬКИНА[2], Екатерина Эдуардовна АБРАМОВА[1]

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

[2] *Государственная Новосибирская областная клиническая больница 630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130*

Цель исследования – изучить структурные особенности клеточных популяций печени и слизистой оболочки желудка пациентов с маркерами HCV- и HBV-инфекции при различной степени колонизации *Helicobacter pylori*. **Материал и методы**. Проведено клинико-морфологическое исследование 95 пациентов с маркерами HCV- и HBV-инфекции (52 мужчины и 43 женщины в возрасте от 16 до 66 лет) и с желудочной дисфункцией, а также 56 больных с хроническим гастритом; результаты сопоставлены со степенью инфицирования *H. pylori*. **Результаты и их обсуждение**. Показано, что у всех пациентов с хроническим гепатитом в патологический процесс вовлекается слизистая оболочка желудка, при этом преобладает фиброзирующая форма поражения – гастропатия. Существенной корреляции структурных изменений со степенью активности гепатита, а также с наличием *H. pylori* не выявлено. Анализ структурных изменений желудка у пациентов с хроническим гастритом показал, что при высокой степени активности *H. pylori* в слизистой оболочке желудка преобладает катарально-фиброзирующий процесс, при отсутствии *H. pylori* доминируют фиброзирующие изменения.

Ключевые слова: хронические HCV- и HBV-инфекции, гепатопатия, гастропатия, *Helicobacter pylori*.

Микроорганизм *Helicobacter pylori* колонизировал слизистую оболочку желудка, вероятно, много тысяч лет назад, и персистенция его в желудке человека в течение такого длительного периода времени может быть объяснена тем, что он приспособился к своему хозяину [4]. Роль *H. pylori* при патологии печени и желчевыводящих путей окончательно не определена. В последние годы появились данные, указывающие на возможную связь между инфекцией *H. pylori* и поражением других органов и систем [1, 10]. Предполагается что бактерии вида *H. pylori* могут играть кофакторную роль в формировании более тяжелых исходов хронического гепатита С [9]. С другой стороны, вирус гепатита С (HCV) может оказывать влияние на течение гастродуоденальной патологии не только через систему гепатогастральных отношений, но и путем прямого воздействия [6]: у 50 % пациентов с гепатитом С в слизистой оболочке желудка выявляется РНК HCV, причем такое присутствие ассоциировано с наличием *H. pylori*, а также выраженностью лимфоплазмоцитарной инфильтрации [8].

По мнению ряда исследователей, *H. pylori* служит частью микробиоценоза человека и, в зависимости от конкретных условий, выступает в качестве как комменсала, так и патогена, являясь при этом лишь одним из местных факторов патогенеза гастродуоденальных заболеваний [5, 7]. Для более полного понимания характера патологического процесса необходим комплексный анализ структурно-функциональных изменений слизистой оболочки желудка в зависимости от наличия и степени колонизации *H. pylori*, а также учет роли микроорганизма и других факторов неинфекционной и инфекционной природы.

МАТЕРИЛ И МЕТОДЫ

Проведено клинико-морфологическое исследование 95 пациентов (52 мужчины и 43 женщины в возрасте от 16 до 66 лет) с маркерами ин-

Непомнящих Д.Л. *– д.м.н., проф. кафедры внутренних болезней лечебного факультета*
Постникова О.А. *– д.б.н., руководитель кафедры математики*
Мигуськина Е.И. *– к.м.н., зав. гастроэнтерологическим отделением*
Абрамова Е.Э. *– к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней лечебного факультета*

фицирования HCV и вирусом гепатита B (HBV) и с желудочной дисфункцией. Клинико-морфологический анализ состояния желудка проводили в зависимости от степени активности HCV- и HBV-инфекций: 1-я группа (47 пациентов) характеризовалась высокой степенью активности, 2-я группа отличалась выраженной и ранней тенденцией к фиброзу органа II–III стадии (30 человек), в 3-й группе (18 случаев) диагностирована гепатопатия. Выполнено комплексное исследование, включающее анализ биохимических показателей крови, серологических маркеров вирусного гепатита, изучение данных о наличии маркеров репликации HCV и HBV в крови и печени, об уровне виремии, о количестве инфицированных гепатоцитов и генотипах HCV и HBV. Диагностический комплекс включал клинические, биохимические, иммуносерологические методы.

С помощью полимеразной цепной реакции выявляли РНК HCV в сыворотке и мононуклеарных клетках крови, в нативной ткани печени, а также ДНК HBV в образцах крови и ткани печени. Длительность инфицирования устанавливали по первичному обнаружению серологических маркеров HCV- и HBV-инфекции, оценку уровня виремии в сыворотке крови проводили с помощью тест-системы научно-производственной лаборатории ЦНИИ эпидемиологии (Москва), линейный диапазон которой составляет от 1 тыс. до 3 млн геномных копий РНК HCV в 1 мл сыворотки крови. При анализе морфологических изменений в биоптатах печени использованы Лос-Анджелесская классификация хронических гепатитов, выделяющая в качестве ведущей характеристики этиологический фактор, а также определение степени активности инфекционного процесса.

Проведен клинико-морфологический анализ структурных изменений слизистой оболочки желудка у больных с хроническим гастритом в зависимости от степени инфицирования *H. pylori* – 56 клинических наблюдений (26 мужчин и 30 женщин в возрасте от 17 до 64 лет). Пациенты разделены на три группы: 1-я группа – 21 случай со слабой степенью обсеменения *H. pylori*, 2-я группа – 20 человек с выраженной степенью инфицирования; группа сравнения представлена 15 случаями хронического гастрита при отсутствии *H. pylori.* Выполнен сравнительный анализ структурных изменений слизистой оболочки желудка при хроническом «хеликобактерном» гастрите разной степени инфицирования и гастрите при отсутствии *H. pylori*.

Всем пациентам выполняли фиброэзофагогастродуоденоскопическое исследование с использованием гастроскопа GF-B3 («Olympus», Япония), проводили панорамный и прицельный осмотр всех отделов желудка; объектом для исследования были биоптаты из антрального и фундального отделов желудка. Для светооптического анализа парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса, по ван Гизону с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Образцы печени и желудка для электронной микроскопии фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Полутонкие срезы окрашивали реактивом Шиффа и азуром II. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе «JEM 1010» при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для выявления *H. pylori* применяли окрашивание по Гимзе.

Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структурные изменения слизистой оболочки желудка при различной степени колонизации *H. pylori*. Светооптический анализ биоптатов слизистой оболочки желудка выявил патологические изменения, затрагивающие все основные структурные компоненты, независимо от инфицирования. В 1-й группе с одинаковой частотой встречались катарально-фиброзирующие и фиброзирующие изменения, во 2-й группе доминировали катарально-фиброзирующие изменения. При хроническом гастрите при отсутствии *H. pylori* преобладал фиброзирующий гастрит.

При патоморфологическом исследовании слизистой оболочки желудка во всех группах в 100 % случаев обнаружена диффузная дистрофия эпителия. Во всех группах развивались нарушения процессов клеточной дифференцировки эпителия в виде метаплазии и дисплазии. Метапластическая трансформация с большей частотой встречалась в группе со слабой степенью инфицирования *H. pylori*, тогда как во 2-й группе и группе сравнения метаплазия диагностировалась практически с одинаковой частотой. При этом различия с группой контроля были статистически не значимыми. Тяжелая дисплазия чаще выявлялась в группе с высокой степенью микробного обсеменения, различия также были статистически не значимыми.

Анализ структурных изменений покровного эпителия желудка не выявил статистически значимых различий по частоте регистрации таких патоморфологических феноменов, как дистро-

фия, атрофия, метаплазия, дисплазия у больных с хроническим гастритом, неассоциированным с *H. pylori*, и с хроническим «хеликобактерным» гастритом. При эндоскопическом исследовании пациентов с хроническим гастритом доминировала диффузная атрофия слизистой оболочки, наиболее значительная в дистальных отделах желудка, достаточно часто встречались эритематозные изменения. При бактериоскопии биоптатов у большей части пациентов *H. pylori* присутствовали в обоих отделах желудка, бактерии локализовались на поверхности эпителия и в просветах желудочных ямок. При этом в фундальной зоне в 38 % случаев регистрировалась высокая степень колонизации, в 22 % – средняя и в 40 % – низкая [2, 4].

Железистые структуры слизистой оболочки во всех наблюдениях подвергались дистрофическим изменениям, степень выраженности которых варьировала. Атрофия желез чаще формировалась в 1-й и 3-й группах, феномен гиперплазии лимфоидных фолликулов более выражен при гастрите с персистенцией *H. pylori*. При этом статистически достоверных различий между степенью бактериального обсеменения и выраженностью реакции иммунокомпетентных клеток не отмечено.

В пилорической зоне по сравнению с фундальной преобладала более значительная колонизация слизистой оболочки *H. pylori*: в 48 % – высокая, в 28 % – средняя и в 24 % – низкая. В участках кишечной метаплазии эпителия желудка микроорганизмы отсутствовали, но в образцах, где метаплазия имела очаговый характер, нередко обнаруживались в перифокальных зонах сохранившегося желудочного эпителия и выявлялись также в участках дисплазии эпителия слабой и умеренной степени, наиболее отчетливо *H. pylori* выявлялись при ультраструктурном исследовании. В исследовании с умеренной степенью контаминации слизистой оболочки *H. pylori* вблизи апикальных цитолеммфовеолярных клеток обнаружены многочисленные микробные тельца высокой осмиофильности [4].

Персистенция *H. pylori* в желудке сопровождается сложным комплексом структурно-функциональных изменений слизистой оболочки фундального и пилорического отделов, основу которых составляют дистрофический процесс с нарушением пролиферации и клеточной дифференцировки эпителия, полиморфно-клеточная инфильтрация и фиброзирующие преобразования стромального компартмента.

Выявленные структурные изменения эпителия желудка при *H. pylori*-ассоциированной гастродуоденальной патологии не являются специфичными, поскольку встречаются и при хронических патологических состояниях в отсутствие бактерий. Тем не менее они указывают на сложный характер взаимоотношений между макро- и микроорганизмом. Реализация патогенного потенциала *H. pylori* происходит в комплексе с другими экзо- и эндогенными факторами, оказывающими свое воздействие на слизистую оболочку желудка (наследственная предрасположенность, психоэмоциональный и психосоциальный статус человека, экологическое и лекарственное воздействие, состояние иммунитета). Это в конечном итоге и определяет развитие конкретной формы гастродуоденальной патологии, вариации их клинического течения и в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей макроорганизма, что обосновывает целесообразность индивидуального подхода к проведению эрадикационной терапии [5].

Особенности структурных изменений слизистой оболочки желудка при сочетанной гепатогастральной патологии. При клинико-морфологическом анализе установлено, что в большинстве случаев в биоптатах печени преобладал различной степени выраженности фиброз; иногда выраженность фиброза была столь велика, что процесс оценивался как хронический гепатит с трансформацией в цирроз. Чрезвычайно важным представляется обнаружение своеобразных структурных изменений в биоптатах печени, не соответствующих классической картине гепатита, по результатам комплексного морфологического анализа отнесенных к проявлениям синдрома регенераторно-пластической недостаточности и интерпретируемых как гепатопатия. В этих наблюдениях повреждения паренхиматозных клеток печени, выявляемые светооптически, характеризовались «опустошенностью» цитоплазмы, при этом ультраструктурный анализ показал, что основу этого процесса составляет редукция белоксинтезирующих структур, в целом свидетельствующая о снижении пластического обмена в клетках, а следовательно, и регенераторных реакций [3].

При высокой степени активности хронического гепатита визуально преобладал атрофический гастрит – 42 %, некротические формы обнаружены в 16 %, поверхностный гастрит – в 32 % случаев. Во 2-й и 3-й группах эндоскопически доминировал поверхностный гастрит (65 %). При микроскопии биоптатов желудка у всех обследованных пациентов выявлены структурные изменения с различной степенью интенсивности клеточной инфильтрации, фиброзом слизистой оболочки и атрофией железистых структур, в других – хронический катаральный процесс с нерезко выраженной воспалительной инфильтраци-

ей и фиброзом стромы. Важно отметить, что во всех случаях дистрофические изменения сочетались со значительным фиброзом всех слоев слизистой оболочки, включая иногда и мышечный. Это свидетельствует о неблагоприятном прогнозе, так как в дальнейшем фиброзирование стенки желудка приводит к диффузной кишечной метаплазии, атрофии желез и снижению их секреторной функции. Изменения слизистой оболочки желудка отмечены у всех пациентов с различными формами хронического вирусного гепатита, при этом преобладающей была фиброзирующая форма поражения – гастропатия [4].

При бактериоскопическом изучении образцов желудка бактериальная микрофлора обнаружена в 96 % случаев, при этом *H. pylori* – в 86 % наблюдений. При хроническом гепатите с высокой степенью активности *H. pylori* найдены в 81 % случаев, при гепатите с минимальной степенью активности – в 83 % наблюдений, при персистирующем гепатите – в 91 % случаев. *H. pylori* локализовались в поверхностном слое слизистой оболочки вблизи покровного эпителия, иногда определялись в просветах желудочных ямок, располагались вдоль эпикальной мембраны. Необходимо отметить, что *H. pylori* одинаково часто обнаруживались в фундальном и антральном отделах желудка, при наличии образцов из обоих отделов желудка они выявлялись в 100 % случаев [2, 4].

Обращало на себя внимание то обстоятельство, что наличие бактерий и интенсивность колонизации не зависели от формы поражения и его стадии. *H. pylori* выявлялись в биоптатах при хроническом гастрите и гастропатии как в стадию обострения, так и в стадию ремиссии. Нередко при наличии тесных микробно-эпителиальных контактов мукоциты сохраняли нормальную структуру, при этом *H. pylori* располагались вдоль апикальной мембраны, но никогда не обнаруживались внутриклеточно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты комплексного клинико-эндоскопического, патоморфологического и ультраструктурного исследования показали, что у всех пациентов с хроническим гепатитом в патологический процесс вовлекается слизистая оболочка желудка. Важно отметить, что при этом преобладает фиброзирующая форма поражения – гастропатия, существенными особенностями которой являются первично возникающие дистрофия и атрофия паренхиматозных структур (покровно-ямочного и железистого эпителия) и реактивное развитие фиброза [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Исаева Г.Ш.* Хеликобактериоз у больных хроническим гепатитом С // Фундам. исслед. 2012. (12). 266–269.

2. *Лапий Г.А., Бакарев М.А., Непомнящих Г.И., Капустина В.И., Непомнящих Д.Л., Виноградова Е.В., Постникова О.А.* Структурные особенности клеточных популяций желудка при хроническом гастрите и хроническом гепатите в условиях персистенции *Helicobacter pylori* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2015. 160. (10). 523–528.

3. *Непомнящих Г.И.* Биопсия в гепатологии: Общая патология и патоморфология. М.: Изд-во РАМН, 2014. 192 с.

4. *Непомнящих Д.Л., Лапий Г.А., Айдагулова С.В., Бакарев М.А.* Биопсия в гастроэнтерологии: Морфогенез общепатологических процессов. М.: Изд-во РАМН, 2010. 368 с.

5. *Циммерман Я.С.* Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии. М.: МЕДпресс-информ, 2013. 224 с.

6. *Abdel Mageed L.M., Hafez M., El-Hameed A.A., Masoud A.G., Elbasmy A.A.* Contribution of hepatitis C virus and *Helicobacter pylori* co-infection as possible predisposing factors in the occurrence of gastric mucosal dysplasia // J. Egypt Natl. Canc. Inst. 2004. 16. (4). 231–236.

7. *Atherton J.C., Blaser M.J.* Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modem implications // J. Clin. Invest. 2009. 119. (9). 2475–2487.

8. *Cammarota G., Cianci R., Grillo R.L., Martini M., di Campli C., Pompili M., Pignataro G., Cuoco L., de Lorenzo A., Gasbarrini G., Pandolfi F., Larocca L.M.* Relationship between gastric localization of hepatitis C virus and mucosa-associated lymphoid tissue in *Helicobacter pylori* infection // Scand. J. Gastroenterol. 2002. 37. 1126–1132.

9. *Esmat G., El-Bendary M., Zakarya S., Ela M.A., Zalata K.* Role of *Helicobacter pylori* in patients with HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma: possible association with disease progression // J. Viral. Hepat. 2012. 19. (7). 473–479.

10. *Franceschi F., Tortora A., Gasbarrini G., Gasbarrini A. Helicobacter pylori* and extragastric diseases // Helicobacter. 2014. 19. (Suppl. 1). 52–88.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF THE LIVER WITH MARKERS OF HCV- AND HBV-INFECTION AND OF GASTRIC MUCOSA FOR VARYING DEGREES OF *Helicobacter pylori* COLONIZATION

David L'vovich NEPOMNYASHCHIKH[1], Olga Alexeevna POSTNIKOVA[1], Elena Ivanovna MIGUS'KINA[2], Ekaterina Eduardovna ABRAMOVA[1]

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

[2] *Novosibirsk Regional Clinical Hospital*
630087, Novosibirsk, Nemirovicha-Danchenko str., 130

The aim of the investigation was to study the structural features of the liver cell populations and gastric mucosa at varying intensity of *Helicobacter pylori* colonization in patients with HCV and HBV infection markers. **Material and methods**. The clinical and morphological study of 95 patients with markers of HCV and HBV infection and with gastric dysfunction (52 men and 43 women aged 16 to 66 years) and 56 patients with chronic gastritis has been carried out. The results have been compared to the degree of *H. pylori* infection. **Results and discussion**. It is shown that in all patients with chronic hepatitis the gastric mucosa is involved in the pathological process while the fibrosing form of lesions – gastropathy predominated. The significant correlation between structural changes and the hepatitis activity degree as well as with the presence of *H. pylori* has not been revealed. Analysis of the stomach structural changes in patients with chronic gastritis, depending on the presence of *H. pylori* and the infection intensity showed that the catarrhal-fibrotic process predominates in gastric mucosa in case of high degree of *H. pylori* activity and fibrosing changes predominate in the absence of *H. pylori*.

Key words: chronic HCV and HBV infection, hepatopathy, gastropathy, *H. pylori*.

Nepomnyashchikh D.L. *– doctor of medical sciences, professor of the chair for internal medicine of department of general medicine, e-mail: dln_nco@mail.ru*
Postnikova O.A. *– doctor of biological sciences, head of the chair for mathematics, e-mail oap@mail.ru*
Migus'kina E.I. *- candidate of medical sciences, head of the gastroenterology department, e-mail: miguskina_e@mail.ru*
Abramova E.E. *– candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for internal medicine of department of general medicine e-mail: bve52@mail.ru*

УДК 577.175.8:616.71-007.235-089.227.84-053.5:616.632.18 DOI: 10.15372/SSMJ20180309

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОСТЕОТРОПНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА И МАРКЕРОВ ОСТЕОГЕНЕЗА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕСОВЕРШЕННЫМ ОСТЕОГЕНЕЗОМ И ФОСФАТ-ДИАБЕТОМ

Евгения Петровна ВЫХОВАНЕЦ, Светлана Николаевна ЛУНЕВА, Наталья Викторовна НАКОСКИНА, Эдуард Рифович МИНГАЗОВ, Арнольд Васильевич ПОПКОВ

Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России
640014, г. Курган, ул. Марии Ульяновой, 6

В последние годы происходит интенсивный рост числа наследственных заболеваний костно-мышечной системы, таких как несовершенный остеогенез и фосфат-диабет. Восстановление целостности поврежденных костей при данных патологиях остается одной из сложных и до конца не решенных проблем травматологии и ортопедии. Репаративная регенерация костной ткани характеризуется многоэтапностью течения и зависит от многочисленных факторов. Регуляторами костно-клеточного метаболизма при репарации являются факторы роста. Обширные костные дефекты, хроническая гипоксия при наследственных заболеваниях соединительной ткани представляют собой неблагоприятные условия восстановления поврежденных костей. В таких случаях очевидна необходимость изучения концентрации остеотропных факторов роста и их рецепторов в сыворотке крови у пациентов с наследственными заболеваниями костно-мышечной системы. **Материал и методы**. Мы исследовали иммуноферментным методом содержание факторов роста и их рецепторов, маркеров метаболизма костной ткани и витамина D в сыворотке крови пациентов с фосфат-диабетом и несовершенным остеогенезом на этапах хирургического лечения. Анализ проводили в соответствии с методикой из руководства к наборам eBioscience (TGF-β1, TGF-β2, VEGF-A, VEGF-R2, VEGF-R3), Immunodiagnostic systems (IGF-1, остеокальцин, витамин D, С-телопептиды коллагена I типа), Invitrogen (VEGF), RayBiotech Inc. (FGF-1, FGF-2, TGF-α, SCF, SCFsR), Mediagnost (IGF-2), QULDEL (пиридинолин), Enzo (DKK-1). **Результаты.** Нам удалось установить, что концентрация факторов роста IGF-1, VEGF, FGF-2, TGF-β1, TGF-β2 и их рецепторов VEGF-R3, SCFsR, маркеров метаболизма костной ткани остеокальцина и пиридинолина, а также витамина D в крови пациентов разных групп на этапах лечения отличаются между собой. Однако содержание IGF-1, VEGF-R2 до операции и TGF-α на 60 сутки, SCF на 60 сутки у пациентов с фосфат-диабетом и несовершенным остеогенезом одинаково.

Ключевые слова: сыворотка крови, факторы роста и их рецепторы, несовершенный остеогенез, фосфат-диабет, остеосинтез аппаратом Илизарова.

В последние годы происходит интенсивный рост числа наследственных заболеваний [1]. По данным статистики, на 1000 новорожденных приходится 35–40 детей с наследственными патологиями [6]. Так, например, в 1956 г. было известно 700 форм наследственных заболеваний, а на сегодня – более 8000 форм редких патологий, из которых 90 % – наследственные. Восстановление целостности поврежденных костей при данных патологиях остается одной из сложных и до конца не решенных проблем в травматологии и ортопедии. Репаративная регенерация костной ткани характеризуется многоэтапностью течения и зависит от многочисленных факторов. Регуляторами костно-клеточного метаболизма при репарации являются факторы роста, образующиеся в различных тканях и находящиеся в сыворотке крови, которые фиксируются во внеклеточном матриксе, прежде всего во время костеобразования. Во время ремоделирования и после нарушения целостности костей факторы роста освобождаются и принимают активное участие в обмене веществ как остеобластов, так и остеокластов, а также в образовании костной ткани. Обширные костные дефекты, хроническая гипоксия при наследственных заболеваниях соединитель-

Выхованец Е.П. *– аспирант, e-mail: vykhovanets.eva@mail.ru*
Лунева С.Н. *– д.б.н., проф., зав. лабораторией биохимии, e-mail: luneva_s@mail.ru*
Накоскина Н.В. *– младший научный сотрудник лаборатории биохимии, e-mail: tatika1981@mail.ru*
Мингазов Э.Р. *– аспирант, врач-травматолог-ортопед, e-mail: edikmed@mail.ru*
Попков А.В. *– д.м.н., проф.*

ной ткани служат неблагоприятными условиями восстановления поврежденных костей. В таких случаях очевидна необходимость изучения концентрации остеотропных факторов роста и их рецепторов в сыворотке крови у пациентов с наследственными заболеваниями костно-мышечной системы.

Согласно статистическим данным, травмы и болезни костно-мышечной системы занимают 3-е место после заболеваний дыхательной и пищеварительной систем, а число инвалидов вследствие травм и заболеваний костно-мышечной системы за последние годы продолжает возрастать [9, 11]. К наиболее проблемным врожденным патологиям, которые вызывают затруднения в диагностике и лечении болезней опорно-двигательной системы, относятся несовершенный остеогенез и фосфат-диабет.

Несовершенный остеогенез – генетическая патология, проявляющаяся в повышенной ломкости костей [10]. Согласно международной классификация болезней (МКБ 10), несовершенный остеогенез относится к группе редких (орфанных) патологий: частота его встречаемости в разных странах мира колеблется от 1 на 200 000–500 000 новорожденных [9]. Основной причиной несовершенного остеогенеза являются мутации генов проколлагена типа I – *COL1A1* и *COL1A2*, вследствие которых развивается недостаточность количества либо качества коллагена и возникают «ломкие», «хрупкие» кости [14]. По типу наследования несовершенный остеогенез разделяют на аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный [9]. Лечение больных начинается, как правило, с медикаментозной терапии в том случае, если заболевание прогрессирует. В тяжелых случаях течения заболевания назначают хирургическое лечение (коррекция с помощью остеотомии; остеосинтез аппаратом Илизарова; интрамедуллярное армирование спицами с биоактивным покрытием гидроксиапатитом) и др. [2, 7].

Фосфат-диабет представляет собой генетическое заболевание, обусловленное нарушением обратного всасывания фосфата в почечных канальцах и характеризующееся изменением химического состава костной ткани (ее минерализации) [8, 16]; одна из его разновидностей, Х-сцепленный гипофосфатемический рахит, встречается у 1 из 20000 новорожденных [8]. У больных с этим рахитоподобным заболеванием изменяется морфологическая картина костной ткани [12]. Первые проявления фосфат-диабета наблюдаются уже в раннем возрасте: низкий рост, варусная деформация нижних конечностей, гипофосфатемия и гиперфосфатурия, иногда аномалия зубов [8, 19].

Таким образом, фосфат-диабет и несовершенный остеогенез являются наследственными, системными, редкими патологиями, характеризующимися нарушениями процессов костного ремоделирования, а молекулярные механизмы их развития до сих пор не выявлены, вследствие чего ортопедическое лечение в ряде случаев оказывается малоэффективным. В настоящее время известно, что процесс костного ремоделирования проходит под контролем местных и системных факторов роста [15]. Факторы роста (полипептиды с молекулярной массой 5–50 кДа, в состав которых входит 100 и более аминокислот [5, 24]) обладают широким спектром биологического действия, например, стимулируют или ингибируют митогенез, хемотаксис, дифференцировку клеток и т.п. [11, 13, 23]. Целью нашего исследования являлось изучение концентрации некоторых факторов роста и их рецепторов, маркеров метаболизма костной ткани и витамина D в сыворотке крови у пациентов с несовершенным остеогенезом и фосфат-диабетом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа основана на измерении концентрации факторов роста и их рецепторов, маркеров метаболизма костной ткани и витамина D в сыворотке крови пациентов с несовершенным остеогенезом (7 человек: 1 мужчина, 6 женщин) и фосфат-диабетом (27 человек: 12 мужчин, 15 женщин). Пациенты обеих групп пролечены методом чрескостного остеосинтеза по Г.А. Илизарову. В группу исследования были включены лица с высокой комплаентностью в возрасте от 4 до 44 лет, с нормальной функцией экскреторных органов. В исследование не включали лиц с аллергическими, соматическими и психоневрологическими заболеваниями, беременных женщин, тучных и истощенных людей, а также при наличии сопутствующих заболеваний: язвенная болезнь желудка, хронические холецистит и панкреатит, хронические обструктивные заболевания легких, инфекционные заболевания.

Поскольку ранее нами были выявлены возрастные и половые различия в содержании подавляющего большинства факторов роста у здоровых людей, значения, полученные при обследовании пациентов, мы сравнивали со значениями референсной группы, учитывая пол и возраст. Референсная группа составила 180 соматически здоровых людей. Результаты представлены в процентах по отношению к референсным значениям.

Исследование проводили на комплексе оборудования фирмы Thermo Fisher Scientific (США):

детектор Multiscan FC, встряхиватель Shaker-401, автоматический промыватель планшетов WellWash. Биологическим материалом для иммуноферментных исследований служила сыворотка крови, которую забирали до операции и на 30-е, 60-е, 90-е сутки после операции. Анализ проводили в соответствии с методикой из руководства к наборам eBioscience (TGF-β1, TGF-β2, VEGF-A, VEGF-R2, VEGF-R3), Immunodiagnostic systems (IGF-1, остеокальцин, витамин D, С-телопептиды коллагена I типа), Invitrogen (VEGF), RayBiotech Inc. (FGF-1, FGF-2, TGF-α, SCF, SCFsR) (США) и Mediagnost (IGF-2), QULDEL (пиридинолин), Enzo (DKK-1) (Германия).

Исследование выполнено с разрешения комитета по этике при Российском научном центре «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова и в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 года, «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Результаты исследования обработаны методами вариационной статистики, применяемыми для малых выборок, с принятием уровня значимости $p \leq 0{,}05$. Достоверность различий между двумя несвязанными выборками определяли по критериям Вилкоксона, Данна и Манна – Уитни для независимых выборок [4]. При статистической обработке результатов исследования был использован интеграторный модуль AtteStat 1.0 для программы Microsoft Exel, разработанный в лаборатории информационно-вычислительного центра Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова И.П. Гайдышевым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациентов с несовершенным остеогенезом до оперативного вмешательства максимальные значения концентраций обнаружены для ответственных за ангиогенез фактора роста фибробластов FGF-2 (537 %) и рецептора фактора роста эндотелия сосудов VEGF-R2 (307 %), наиболее низкое содержание установлено для рецептора VEGF-R3 (61 %), трансформирующего ростового фактора TGF-β2 (66 %) и пиридинолина (7 %) (рис. 1). Послеоперационная динамика концентрации эндотелиальных рецепторов имела различные закономерности. Так, например, повышенное на дооперационном этапе содержание VEGF-R2 в процессе лечения продолжало увеличиваться, уменьшаясь к 60-м суткам наблюдения; изначально сниженная концентрация VEGF-R3 уменьшалась еще больше (до 18 %). Крайне высокая концентрации FGF-2 после лече-

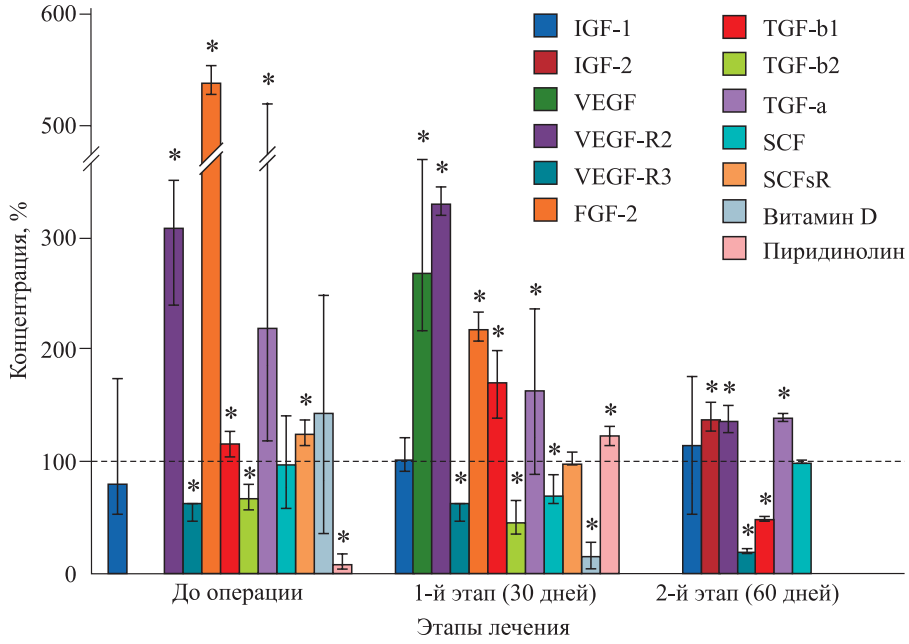

Рис. 1. *Содержание факторов роста, маркеров метаболизма костной ткани и витамина D в сыворотке крови пациентов с несовершенным остеогенезом на этапах лечения. Здесь и на рис. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя референсной группы статистически значимо при $p < 0{,}05$*

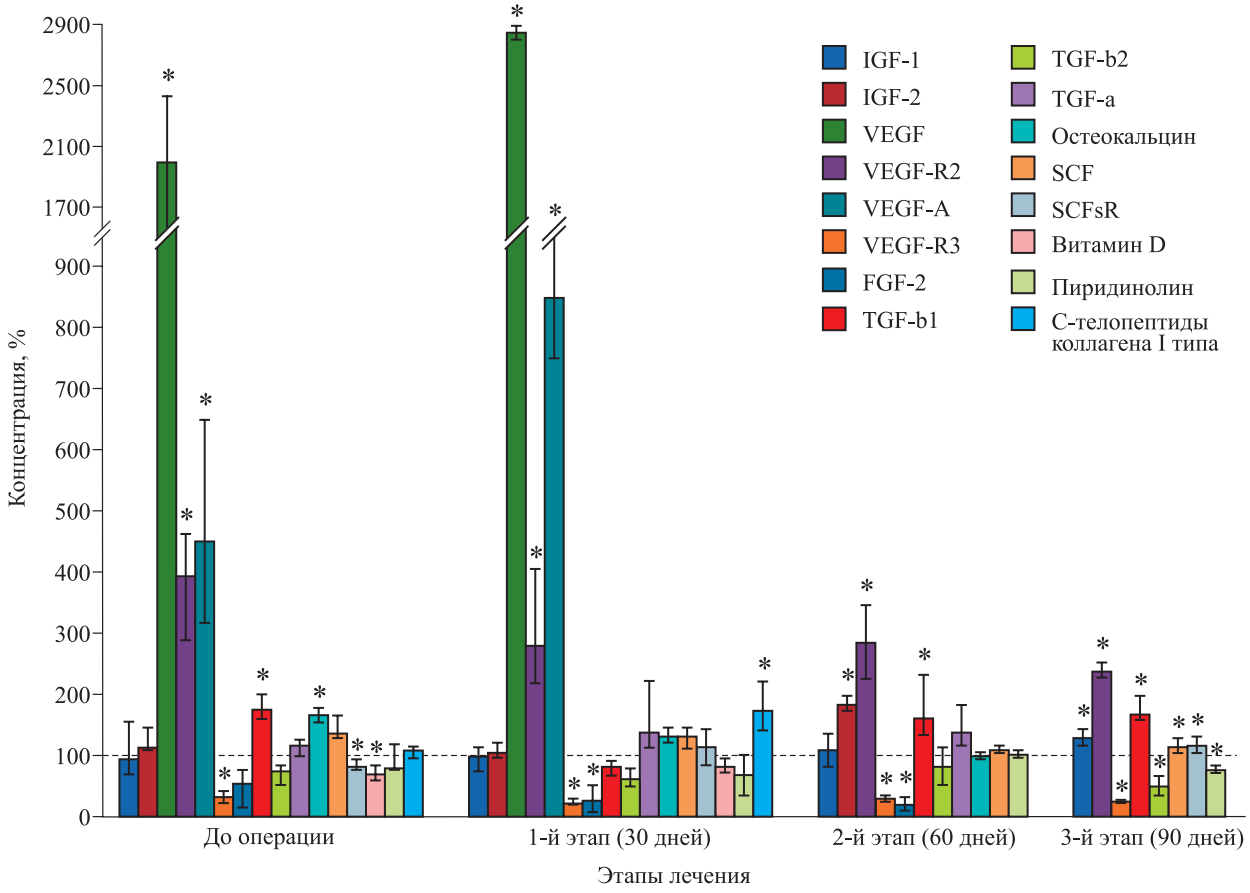

Рис. 2. *Содержание факторов роста, маркеров метаболизма костной ткани и витамина D в сыворотке крови пациентов с фосфат-диабетом на этапах лечения*

ния снизилась практически в 2 раза, не имея при этом статистически значимых отличий от величины соответствующего показателя референсной группы.

Концентрация TGF-β1 в сыворотке крови пациентов с несовершенным остеогенезом на дооперационном этапе была выше контрольных значений, в процессе лечения снижалась, к концу лечения составив 47 % от нормальных и 41 % от дооперационных величин. Более низкое по сравнению с контрольными значениями содержание TGF-β2 на дооперационном этапе после хирургического вмешательства продолжало падать (см. рис. 1). Концентрация пиридинолина на дооперационном этапе была очень низкой (7 % от нормы), в процессе лечения показатель возрос до 122 %. Обратная картина наблюдалась для витамина D: на дооперационном этапе его содержание было высоким, а после хирургического вмешательства – сниженным. Аналогичная динамика выявлена для факторов роста TGF-α и FGF-2: на дооперационном этапе концентрация была высокой, после хирургического вмешательства – сниженной.

Концентрация инсулиноподобного фактора роста IGF-1 в сыворотке крови пациентов с несовершенным остеогенезом на дооперационном этапе, во время и после лечения находилась в пределах контрольных значений (см. рис. 1). Содержание фактора роста стволовых клеток SCF на дооперационном этапе было в пределах нормы, после ортопедического вмешательства уменьшилось, а на 60-е сутки после лечения возвратилась к референсным значениям. Концентрация растворимого рецептора SCFsR на дооперационном этапе была выше значений контрольной группы, в процессе лечения стабилизировалась.

На дооперационном этапе у пациентов с фосфат-диабетом в сыворотке крови обнаружено более низкое содержание витамина D и рецепторов VEGF-R3, SCFsR, чем у лиц контрольной группы, и более высокое – практически всех остальных исследуемых факторов (IGF-2, остеокальцин, VEGF, VEGF-A, VEGF-R2, TGF-β1). Максимально высокие отличия от нормы имели факторы роста эндотелия сосудов и их рецептор (VEGF – 1990 %, VEGF-A – 450 %, VEGF-R2 – 392 %) (рис. 2). После хирургического лечения

концентрации VEGF и VEGF-A увеличились еще больше (до 2843 и 849 % соответственно). Содержание VEGF-R2 и VEGF-R3 после хирургического вмешательства постепенно снижалось, такая же тенденция наблюдалась для FGF-2. Концентрация витамина D после лечения несколько возрастала, в то же время оставаясь достоверно меньше нормы.

Концентрация С-телопептидов коллагена I типа после хирургического вмешательства возросла по сравнению и с дооперационными значениями, и с референсной группой (см. рис. 2).

Изменения содержания TGF-β1 и TGF-β2 в сыворотке крови больных фосфат-диабетом относительно нормы имели разную направленность. Так, концентрация TGF-β2 была снижена как на дооперационном этапе, так и во время лечения и после него. Напротив, на всех этапах лечения концентрация TGF-β1 роста имела высокие значения. Содержание пиридинолина на дооперационном этапе и во время лечения соответствовало нормативным показателям, однако к 90-м суткам достоверно снизилось (см. рис. 2). На дооперационном этапе и вплоть до 60-х суток после хирургического вмешательства сохранялась нормальная концентрация IGF-1, к 90-м суткам она повысилась до 129 %, статистически значимо отличаясь от нормы. После оперативного пособия концентрация IGF-2 пришла к референсным значениям, но спустя 60 дней снова возросла. Содержание остеокальцина на дооперационном этапе было высоким по сравнению с референсной группой, к 60-м суткам пришло к нормативным значениям. В отличие от SCF, имевшего практически нормативное содержание в крови как во время лечения, так и после него, концентрация SCFsR на дооперационном этапе была низкой, а после лечения начала стремительно увеличиваться, и на 90-е сутки имелись достоверные отличия от контрольной группы.

Концентрация фактора роста VEGF-C, растворимого рецептора sVEGF-R1, факторов FGF-1 и Dickkopf-1 (DKK-1) в крови субъективно здоровых людей и пациентов с врожденными заболеваниями скелета была ниже интервала обнаружения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, нам удалось установить, что, несмотря на кардинальные различия в патогенезе исследуемых заболеваний, в сыворотке крови пациентов, страдающих несовершенным остеогенезом, и больных фосфат-диабетом наибольшие отличия от референсных значений наблюдаются в содержании сосудистых факторов роста. VEGF принимают основное участие в эмбриональном васкуло- и ангиогенезе [17, 24], физиологическом и репаративном ангиогенезе [26, 27], влияют на формирование костной ткани в онтогенезе и участвуют в трансформации хряща в кость (эндохондриальная оссификация) [22] при формировании дистракционного регенерата [25]. Повышение содержания VEGF в крови свидетельствует о его повышенной секреции [18]; активность VEGF регулируется определяемым в крови антиангиогенным фактором – растворимым рецептором 1 (sVEGF-R1) [3, 20]. В ряде исследований указывается, что VEGF может влиять на контрактильность сосудистой стенки, взаимодействуя с flk-1/KDR (VEGF-R2) и активируя продукцию простациклина, одного из самых мощных вазодилататоров [21]. При этом эффективность действия факторов роста семейства VEGF напрямую зависит от факторов, влияющих на их активность, и прежде всего от количества и доступности VEGF-рецепторов.

Среди изученных сосудистых факторов роста и их рецепторов наибольшее значение имел VEGF-R3; концентрация VEGF-R3 и других сосудистых факторов имела разнонаправленную динамику: уменьшение содержания рецептора VEGF-R3 сопровождалось многократным увеличением VEGF, VEGF-A, VEGF-R2 и FGF-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с фосфат-диабетом и несовершенным остеогенезом наблюдается дисбаланс сывороточных концентраций факторов роста, маркеров метаболизма костной ткани и витамина D, при этом величины многих параметров различаются как при разных наследственных костных патологиях, так и на разных этапах лечения. Наибольшие отличия исследуемых показателей от соответствующих значений референсной группы наблюдались у пациентов с фосфат-диабетом: концентрация факторов роста, отвечающих за ангиогенез, превышала референсные значения более чем в 8 раз, содержание рецептора VEGF-R2 – более чем в 4 раза, в то время как концентрация рецептора VEGF-R3 была снижена более чем на 60 %. Концентрация фактора FGF-basic была максимальной у пациентов с несовершенным остеогенезом (537 %). Содержание маркера резорбции коллагена пиридинолина у пациентов с несовершенным остеогенезом составило менее 10 % от контроля.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бочкова Н.П.* Медицинская генетика. М.: Мастерство, 2002. 43–45.

2. *Волков М.В.* Болезни костей у детей. М.: Медицина, 1974. 46 с.

3. *Воробьева И.С., Никитина В.В., Гладилин Г.П., Шахмартова С.Г., Пучиньян Д.М.* Фактор роста эндотелия сосудов как предиктор возникновения тромботических осложнений у больных деформирующим коксартрозом // Тромбоз, гемостаз и реология. 2017. 69. (1). 50–54.

4. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.

5. *Захарова Н., Воскресенская О., Тарасова Ю.* Ангиогенез и фактор роста эндотелия сосудов при цереброваскулярной патологии // Врач. 2014. (10). 12–14.

6. *Иванов В.И.* Генетика: учебник для вузов. М.: Академкнига, 2006. 19–27.

7. *Козлова С.И.* Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. М.: Медицина, 1996. 416 с.

8. *Левиашвили Ж.Г., Савенкова Н.Д., Мусаева А.В., Белов Д.Ю.* Показатели неорганического фосфата, паратиреоидного гормона крови и почечной канальцевой реабсорбции фосфатов у детей с наследственным гипофосфатемическим рахитом // Нефрология. 2014. 18. (3). 45–56.

9. *Марычева Н.М., Надыршина Д.Д., Хусаинова Р.И., Жученко Н.А., Асанов А.Ю.* Несовершенный остеогенез: внутрисемейный клинический полиморфизм этилогически единой формы заболевания // Педиатрия. 2014. 93. (6). 198–199.

10. *Мензорова Н.В., Кузнецова Н.Л., Смагина М.В.* Анализ инвалидности в структуре заболеваний костно-мышечной системы и последствий травм у детей Свердловской области // Вестн. травматологии и ортопедии. 2010. 2. (2). 39–41.

11. *Морозов Ю.А.* Маркеры метаболизма костной ткани // Справ. зав. КДЛ. 2014. (1). 25–33.

12. *Новиков П.В.* Рахит и наследственные рахитоподобные заболевания у детей. М., 2006. 336 с.

13. *Побел Е.А., Бенгус Л.М., Дедух Н.В.* Маркеры костного метаболизма при сращении переломов длинных костей // Остеопороз и остеопатии. 2012. (2). 25–32.

14. *Сергеев В.С., Тихоненко Т.И., Буклаев Д.С., Баиндурашвили А.Г., Афанасьев Б.В.* Клеточная терапия несовершенного остеогенеза // Гены и клетки. 2016. 11. (4). 22–23.

15. *Сертакова А.В., Норкин И.А., Рубашкин С.А.* Биомаркеры ремоделирования костной ткани и ростовые факторы роста в диагностике стадий остеонекроза головки бедра у детей // Молекул. медицина. 2014. (6). 25–29.

16. *Стогов М.В., Лунева С.Н., Ткачук Е.А.* Биохимические показатели в прогнозировании течения остеорепаративных процессов при травме костей скелета // Клин. лаб. диагностики. 2010. (12). 5–7.

17. *Ульянина Е.В., Фаткуллин И.Ф., Хайруллина Г.Р.* Маркеры ангиогенеза и ультразвукового исследования в оценке степени тяжести синдрома задержки развития плода // Вестн. соврем. клин. медицины. 2016. (5). 79–82.

18. *Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н.* Динамика факторов роста эндотелия сосудов и фибробластического фактора роста при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН. 2007. (6). 169–174.

19. *Щукин А.А., Аранович А.М., Попков А.В., Попков Д.А.* Оценка результатов удлинения нижних конечностей у больных с системными заболеваниями скелета, сопровождающимися патологически низким ростом // Гений ортопедии. 2014. (2). 44–51.

20. *Яковлева Н.Ю., Хазова Е.Л., Васильева Е.Ю., Зазерская И.Е.* Соотношение ангиогенных и антиангиогенного факторов при преэклампсии // Артериал. гипертензия. 2016. 22 (5). 488–494.

21. *Gelinas D.S., Bernatchez P.N., Rollin S., Bazan N.G., Sirois M.G.* Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways // Br. J. Pharmacol. 2002. 137. (7). 1021–1030.

22. *Haigh J.J., Gerber H.P., Ferrara N., Wagner E.F.* Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state // Development. 2000. 127. (7). 1445–53.

23. *Kubisz P., Chud P., Stasko J., Galajda P., Holly P., Vysehradsky R., Mokan M.* Circulating vascular endothelial growth factor in the normo-and/or microalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus // Acta Diabetol. 2010. 47. (2). 119–124.

24. *Shimer A.L., Oner F.C., Vaccaro A.R.* Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: open questions // Injury. 2009. 40. (3). 32–38.

25. *Stogov M.V., Luneva S.N., Novikov K.I.* Growth factors in human serum during operative tibial lengthening with the Ilizarov method // J. Orthop. Res. 2013. 31. (12). 1966–1970.

26. *Vecchiarelli-Federico L.M., Cervi D., Haeri M., Li-Y A., Nagy Y.* Vascular endothelial growth factor – a positive and negative regulator of tumor growth // Cancer Res. 2010. 70. (3). 863–867.

27. *Witsch E., Sela M., Yarden Y.* Roles for growth factors in cancer progression // Physiology (Bethesda). 2010. 25. (2). 85–101.

CONTENTS OF SOME OSTEOTROPIC GROWTH FACTORS AND OSTEOGENESIS MARKERS IN BLOOD OF PATIENTS WITH OSTEOGENESIS IMPERFECTA AND HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS

Evgeniya Petrovna VYKHOVANETS[1], Svetlana Nikolaevna LUNEVA[1], Nataliya Viktorovna NAKOSKINA[1], Eduard Rifovich MINGAZOV[1], Arnold Vasilyevich POPKOV[1]

Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of Minzdrav of Russia 640014, Kurgan, Marii Ul'yanovoy str., 6

In recent years there is intensive growth of the number of genetic diseases such as imperfect osteogenesis and hypophosphatemic rickets. Treatment of this category of patients includes surgical intervention, however in many cases there are recurrences of the disease and the patients have to undergo multiple surgeries. It is known that study of concentration of growth factors and regulatory polyproteins can help in understanding of pathogenetic course of genetic diseases. **Material and methods.** We studied growth factors and their receptors, bone markers and vitamin D by enzyme-linked immunoassay in blood serum of patients with hypophosphatemic rickets and osteogenesis imperfecta during surgical treatment. The analysis was carried out according to technique from manual to sets eBioscience (TGF-β1, TGF-β2, VEGF-A, VEGF-R2, VEGF-R3), Immunodiagnostic systems (IGF-1, osteocalcin, vitamin D, β-CrossLaps), Invitrogen (VEGF), RayBiotech Inc. (FGF-1, FGF-2, TGF-α, SCF, SCFsR), Mediagnost (IGF-2), QULDEL (pyridinoline), Enzo (DKK-1). **Results.** It has been established that concentration of growth factors IGF-1, VEGF, FGF-2, TGF-β1, TGF-β2 and their receptors VEGF-R3, SCFsR, bone markers osteocalcin, pyridinoline, as well as vitamin D in blood of patients of different groups at different stages of treatment varied. However, concentration of IGF-1, VEGF-R2 before surgery and TGF-α on the 60th day, SCF on the 60th day in patients with hypophosphatemic rickets and osteogenesis imperfecta did not differ.

Key words: blood serum, growth factors and their receptors, bone markers, osteogenesis imperfecta, hypophosphatemic rickets, osteosynthesis with the Ilizarov fixator.

Vykhovanets E.P. *– postgraduate student, e-mail: vykhovanets.eva@mail.ru*
Luneva S.N. *– doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory, e-mail: luneva_s@mail.ru*
Nakoskina N.V. *– junior researcher of laboratory of biochemistry, e-mail: tatika1981@mail.ru*
Mingazov E.R. *– postgraduate student, traumatologist-orthopedist, e-mail: edikmed@mail.ru*
Popkov A.V. *– doctor of medical sciences, professor*

УДК 616.348-002.4-053.31-037 DOI: 10.15372/SSMJ20180310

КУМУЛЯТИВНЫЙ БАЛАНС ИНФУЗИОННОЙ ТЕРАПИИ НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕКРОТИЧЕСКИМ ЭНТЕРОКОЛИТОМ

Игорь Алексеевич АЛЬЯНОВ[1], Кристина Владимировна БУДАРОВА[2], Сергей Иванович СИРОТА[3], Алексей Николаевич ШМАКОВ[1,4]

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

[2] *Городская детская клиническая больница скорой медицинской помощи 630007, г. Новосибирск, Красный просп., 3*

[3] *Детская городская клиническая больница № 1 630048, г. Новосибирск, ул. Вертковская, 3*

[4] *Государственная Новосибирская областная клиническая больница 630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко,130*

Цель исследования – изучить связь пятисуточного кумулятивного водного баланса с исходом критического состояния у хирургической группы новорожденных. **Материал и методы**. В исследовании участвовали 30 новорожденных с некротическим энтероколитом в стадии IIIB по Уолшу – Клигмену. Группы сформированы по критерию исхода. Анализируемые параметры: возраст и масса тела участников, гематокритное число; кумулятивный водный баланс за 5 суток наблюдения, выраженный в процентах к исходной массе тела. Статистическая обработка результатов проведена методиками непараметрической статистики. **Результаты и их обсуждение.** Единственным независимым фактором, определяющим вероятность летального исхода при некротическом энтероколите новорожденных, является гестационный срок и его производное – масса тела. Вероятность неблагоприятного исхода при некротическом энтероколите новорожденных не зависит от пятисуточного кумулятивного водного баланса.

Ключевые слова: кумулятивный баланс, некротический энтероколит, инфузионная терапия, критическое состояние, гиповолемия.

Период увлечения высокообъемной инфузионной терапией при сепсисе, заболеваниях, для которых характерны дегидратация и риск гиповолемии, закончился осознанием отсутствия у этой методики детоксицирующего и жизнеспасающего эффекта. Стало очевидным отсутствие безопасных инфузионных сред, не повреждающих гликокаликс сосудистого эндотелия, характерное скептическое отношение анестезиологов-реаниматологов к коллоидным волюмокорректорам, за исключением инфузионного купирования массивной кровопотери. В целом инфузионная терапия в современной интенсивной терапии занимает две основные ниши: экстренная регидратация (противошоковая терапия) и парентеральное питание. В общей практике интенсивной терапии наиболее эффективным показателем адекватности объема инфузии большинство исследователей признает кумулятивный водный баланс, выраженный в процентах превышения объема инфузии над объемом экскреции или в процентах от исходной массы тела [1, 4, 10, 12]. Наиболее привлекательная с позиции безопасности для пациента концепция инфузионной терапии с аббревиатурой «*ROSE*» (*Rescue; Optimization; Stabilization; Evacuation* или *(de)-*

Альянов И.А. *– ординатор кафедры анестезиологии и реаниматологии лечебного факультета, e-mail: alyanovigor1993@mail.ru*

Бударова К.В. *– врач-анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии, e-mail: bcv@yandex.ru*

Сирота С.И. *– к.м.н., зав. отделением анестезиологии и реанимации, e-mail: sirota_serg@mail.ru*

Шмаков А.Н. *– д.м.н., врач-анестезиолог-реаниматолог отделения плановой и экстренной консультативной помощи, проф. кафедры анестезиологии и реаниматологии лечебного факультета, e-mail: alsmakodav@yandex.ru. http://orcid.org/0000-0002 -6214-3897*

Escalation) [5], согласно которой пятисуточный кумулятивный баланс не должен превышать 10 % исходной массы тела, признается рядом авторов безоговорочно, другие исследователи подвергают ценность концепции сомнению. Точные расчеты объемов инфузионной регидратации при интенсивной терапии новорожденных многими авторами признаны излишними в связи с характерной для детей этой возрастной группы высокой мобильностью интерстициального депо воды [8, 9]. Более того, доказано, что объем регидратации или суточного потребления воды, физиологичный для здоровых новорожденных, провоцирует избыточный натрийурез и гипонатриемию у детей этой возрастной группы в критических состояниях [7, 9].

В неонатальной хирургии объемы инфузии преимущественно определяются клинической ситуацией. При этом доказано, что инфузионная профилактика интраоперационной гиповолемии увеличивает продолжительность послеоперационной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) в следующем соотношении: 1 сут ИВЛ на 17 мл/кг избытка инфузионной воды [6]. Убедительно показано, что возмещение предшествующих потерь воды в связи с 24-часовым голоданием новорожденных детей с хирургической патологией полностью корректируется последующей инфузией 25 мл/кг солевых растворов в течение 1 часа [2]. В более современных работах это положение подтверждено [3]. Тем не менее точность расчета объемов регидратации как при парентеральном, так и при энтеральном способе ее возмещения в неонатологии остается преобладающим принципом.

Таким образом, обоснованного мнения о значимости кумулятивного баланса для эффективности инфузионной терапии у новорожденных не существует, чем и обусловлена актуальность предпринятого исследования.

Цель исследования – доказательство наличия или отсутствия связи пятисуточного кумулятивного водного баланса с исходом критического состояния у новорожденных в условиях однородной клинической группы участников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обсервационное исследование выполнено в 2015−2017 годах в отделении анестезиологии-реанимации Детской городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска. В исследовании участвовали 42 новорожденных с некротическим энтероколитом в стадии IIIB по Уолшу – Клигмену [11]. Потенциально опасные методики лечения и обследования не применяли, исследование было полностью анонимным, одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике Новосибирского государственного медицинского университета. Из первоначальной сплошной выборки детей, поступавших для хирургического лечения, исключены из разработки новорожденные: умершие до 5 суток с момента поступления (три человека); не нуждавшиеся в искусственной вентиляции легких более 24 ч (шесть человек); не нуждавшиеся в инфузионной терапии более 24 ч (три человека). В окончательную разработку включено 12 выживших и впоследствии выписанных новорожденных (группа 1) и 18 новорожденных детей с последующим летальным исходом (группа 2). Тактика хирургического лечения, методика интенсивной терапии в исследуемых группах были идентичны, все участники находились в открытых реанимационных системах. Трансфузии эритроцитов в связи с исходным гематокритом ниже 0,33 л/л потребовались в группе 1 у трех больных, в группе 2 – у шести. Различие незначимое (p = 0,704; точный двусторонний критерий Фишера). Гиперэритроцитоз (гематокрит выше 0,6 л/л) отмечен у одного участника в группе 1 и у двух – в группе 2 (p = 1,000; точный двусторонний критерий Фишера).

Формулировка исследуемой гипотезы: «Пятисуточный кумулятивный баланс воды прямо коррелирует с динамикой массы тела и гематокритным числом новорожденных в хирургической стадии некротического энтероколита. При этом в группе 2 корреляционные связи должны быть теснее, чем в группе 1, что будет принято как доказательство гипотезы». Анализируемые параметры: возраст участников на момент поступления; масса на момент поступления и к моменту перевода из отделения анестезиологии-реанимации (или смерти); гематокритное число (в крови из верхней полой вены) на момент поступления и к моменту перевода из отделения анестезиологии-реанимации (или смерти); кумулятивный баланс воды, полученной участниками за 5 суток наблюдения и выделенной за то же время с учетом перспирации (выраженный в процентах к исходной массе тела). Нормальное распределение данных мы исключали априори с подтверждением по критерию Шапиро – Уилка, поэтому вся статистическая обработка результатов проведена методиками непараметрической статистики с использованием критерия Манна – Уитни, рангового корреляционного анализа по Спирмену, сравнения в таблицах сопряженности по двустороннему точному критерию Фишера. Все данные и результаты представляли в виде: «медиана [минимум; нижний квартиль; верхний квартиль; максимум]» (Me [min; Q25; Q75; max]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируемые показатели представлены в табл. 1, из которой видно, что межгрупповые различия касались гестационного срока, массы тела и способности детей восстанавливать массу тела в послеоперационном периоде, указанные показатели имели статистически значимо более низкие значения у пациентов с неблагоприятным исходом в сравнении с выжившими. Остальные анализируемые показатели статистически значимых межгрупповых различий не обнаружили. Кумулятивный баланс воды у выживших и умерших также не различался и зависел от темпа и объема регидратации в периоде экстренной регидратации (коррекции гиповолемии), т.е. в пределах двух часов с момента поступления пациентов в отделение анестезиологии-реанимации.

В табл. 1 продемонстрировано отсутствие различий между сроками развития хирургической стадии некротического энтероколита у новорожденных пациентов с последующим благоприятным или неблагоприятным исходом. Это позволяет критически переосмыслить часто встречающееся в литературе мнение о более поздних сроках развития некротического энтероколита и его хирургических осложнений у недоношенных детей по сравнению с доношенными, поскольку связь низкой массы тела и степени недоношенности по данным табл. 1 представляется очевидной и статистически значимой. Отсутствие статистически значимого межгруппового различия между пятисуточным кумулятивным водным балансом и исходом лечения свидетельствует о приоритете вазоплегических механизмов развития критических состояний у новорожденных в сравнении с гиповолемическими механизмами. В самом деле, гемодинамика новорожденных характеризуется постоянной и напряженной зависимостью от гиперфункции симпатической системы, что опасно срывом регуляции периферического сосудистого тонуса при превышении адаптивных возможностей этой системы. При этом возможность компенсации гиповолемии у новорожденных очень высока, поскольку избыток внеклеточной воды (40 % массы тела!) гарантирует мобилизацию этой воды в сосудистое русло («аутоперфузию») без развития типичной клинической картины гиповолемии.

При рассмотрении корреляционных связей исследуемых показателей с пятисуточным кумулятивным водным балансом (табл. 2) характерно отсутствие сильных связей в обеих группах, поэтому основная исследуемая гипотеза отвергнута: кумулятивный баланс не может считаться существенным фактором вероятности летального исхода у новорожденных с некротическим энтероколитом в хирургической стадии. Для рассмотрения интересны лишь тенденции: гестационный срок и исходная масса у выживших прямо коррелировали с кумулятивным балансом, а у умерших зависимость была обратной. При этом только гестационный срок обнаружил корреляционную связь средней силы с кумулятивным балансом (R = 0,505; R^2 = 0,25) при статистической значимости p = 0,094.

ВЫВОДЫ

1. Гестационный срок менее 28 недель и масса при рождении менее 1500 г (по нижнему квартилю группы 1) являются независимыми объективными предикторами летального исхода при некротическом энтероколите новорожденных.

Таблица 1

Анализируемые показатели участников в выделенных группах, Me [min; Q25; Q75; max]

Показатель	Группа 1 (n = 12)	Группа 2 (n = 18)	p
Гестационный срок, нед	30,5 [26; 28; 32; 34]	26,5 [23; 25; 29; 36]	0,024
Возраст при поступлении, сут	8 [3; 5; 11; 25]	7 [1; 4; 12; 27]	0,497
Масса при поступлении, кг	2,34 [1,14; 1,5; 2,85; 3,33]	1,1[0,63; 1,0; 1,97; 3,58]	0,000
Масса в момент перевода (смерти), кг	2,6 [1,5; 2,2; 2,9; 3,86]	1,18 [0,61; 1,1; 2,1; 3,4]	0,000
Прирост массы за время наблюдения, кг	0,58 [0; 0,4; 0,8; 1,07]	0,08 [-0,18; 0,05; 0,4; 0,8]	0,004
Прирост массы за время наблюдения, %	25 [0; 12; 35; 61]	6 [-12; 6; 30; 45]	0,024
Прирост массы суточный, г/сут	19,5 [-30; 5; 28; 92]	3 [-11; 0; 21; 67]	0,043
Гематокрит при поступлении, л/л	0,48 [0,23; 0,42; 0,54; 0,6]	0,37 [0,19; 0,24; 0,4; 0,65]	0,227
Гематокрит при переводе, л/л	0,33 [0,24; 0,3; 0,41; 0,47]	0,35 [0,19; 0,31; 0,45; 0,54]	1,000
Динамика гематокрита за время наблюдения, % к исходному	81 [46; 64; 83; 146]	83 [54; 78; 92; 133]	0,942
Кумулятивный баланс за 5 суток, % к массе при поступлении	18,5 [4; 12; 25; 60]	22,5 [-2; 5; 32; 56]	0,899

Таблица 2

Корреляционные связи исследованных показателей с кумулятивным балансом воды на пятые сутки лечения в выделенных группах (ранговый анализ по Спирмену)

Показатель	Коэффициент корреляции *r* (*p*)	
	для выживших (*n* = 12)	для умерших (*n* = 18)
Гестационный срок, нед	0,505 (0,094)	–0,182 (0,462)
Масса при поступлении, кг	0,301 (0,331)	–0,295 (0,232)
Прирост массы суточный, г/сут	–0,050 (0,837)	–0,228 (0,357)
Прирост массы за время наблюдения, кг	–0,126 (0,683)	0,102 (0,680)
Прирост массы за время наблюдения, % к исходной	–0,199 (0,514)	0,079 (0,748)
Динамика гематокрита за время наблюдения, % к исходному	0,154 (0,619)	–0,256 (0,302)
Время на ИВЛ, сут	–0,486 (0,110)	–0,318 (0,194)

2. Время формирования хирургической стадии энтероколита новорожденных не зависит ни от срока гестации, ни от массы тела при рождении.

3. Кумулятивный баланс воды у новорожденных с некротическим энтероколитом определяется темпом экстренной (противошоковой) регидратации и необходимостью коррекции количества циркулирующих эритроцитов.

4. Кумулятивный баланс воды, выраженный в процентном приросте массы тела к пятым суткам лечения, не может рассматриваться в качестве предиктора летального исхода у новорожденных с некротическим энтероколитом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Acheampong A., Vincent J.-I.* A positive fluid balance is an independent prognostic factor in patients with sepsis // Crit. Care. 2015. 19. 251.

2. *Berry F.A.* Practical aspects of fluid and electrolyte therapy // Anesthetic management of difficult and routine patients / Ed. F.A. Berry. N.Y.: Churchill Livingstone, 1990. 89–120.

3. *Busto-Aguirreurreta N., Suarez J.J.J.* Perioperative fluid therapy in the pediatric patient: Recommendations // J. Perioper. Crit. Intensive Care Nurs. 2016. 2. 129.

4. *Chao W.C., Tseng C.-H., Chien Y.-C., Sheu C.-C., Tsai M.-J., Fang W.F., Chen Y.M., Kao K.C., Hu H.C., Perng W.C., Yang K.Y., Chen W.C., Liang S.J., Wu C.L., Wang H.C., Chan M.C.* Association of day 4 cumulative fluid balance with mortality in critically ill patients with influenza: A multicenter retrospective cohort study in Taiwan // PLoS One. 2018. 13. (1). e0190952.

5. *Hoste E.A., Maitland K., Brudney C.S., Mehta R., Vincent J.L., Yates D., Kellum J.A., Mythen M.G., Shaw A.D.* Four phases of intravenous fluid therapy: a conceptual model // Br. J. Anaesth. 2014. 113. (5). 740–747.

6. *Jansen L.A., Safavi A., Lin Y., MacNab Y.C., Skarsgard E.D.* Preclosure fluid resuscitation influences outcome in gastroschisis // Am. J. Perinatol. 2012. 29. (4). 307–312.

7. *Lynch S.K., Mullett M.D., Graeber J.E., Polak M.J.* A comparison of albumin-bolus therapy versus normal saline-bolus therapy for hypotension in neonates // J. Perinatol. 2008. 28. 29–33

8. *O'Brien F., Walker I.* A Fluid homeostasis in the neonate // Paediatr. Anaesth. 2014. 24. (1). 49–59.

9. *Oh W.* Fluid and Electrolyte Management of Very Low Birth Weight Infants // Pediatr. Neonatol. 2012. 53. (6). 329–333.

10. *Sirvent J.M., Ferri C., Baro A., Murcia C., Lorencio C.* Fluid balance in sepsis and septic shock as a determining factor of mortality // Am. J. Emerg. Med. 2015. 33. 186–189.

11. *Walsh M.C., Kliegman R.M.* Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria // Pediatr. Clin. North Am. 1986. 33. (1). 179–197.

12. *Wang N., Jiang L., Zhu B., Wen Y., Xi X.-M.* Fluid balance and mortality in critically ill patients with acute kidney injury: a multicenter prospective epidemiological study // Crit. Care. 2015. 19. 371.

CUMULATIVE FLUID BALANCE OF INFUSION THERAPY OF NEWBORNS WITH NECROTIZING ENTEROCOLITIS

Igor' Alekseevich AL'YANOV[1], Kristina Vladimirovna BUDAROVA[2], Sergey Ivanovich SIROTA[3], Aleksey Nikolaevich SHMAKOV[1,4]

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

[2] *City Children's Clinical Emergency Hospital 630007, Novosibirsk, Krasny av., 3*

[3] *Children City Clinical Hospital № 1 630048, Novosibirsk, Vertkovskaya str., 3*

[4] *State Novosibirsk Regional Clinical Hospital 630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 130*

The aim of the research is to study the connection between the five-day cumulative fluid balance and the outcome of a critical condition in the surgical group of newborns. **Material and methods**. The study involved 30 newborns with necrotizing enterocolitis in stage IIIB according to Walsh – Kliegman. Groups were formed by the criterion of outcome. Analyzed parameters were age and body weight of participants, hematocrit number; the cumulative five-day fluid balance expressed as a percentage of the initial body weight. The data were carried out by nonparametric statistics. **Results and discussion**. The only independent factor determining the probability of death from necrotizing enterocolitis of newborns is the gestational age and the body weight as its derivative. The likelihood of an unfavorable outcome in necrotizing enterocolitis of the newborn doesn't depend on the five-day cumulative fluid balance.

Key words: cumulative fluid balance, necrotizing enterocolitis, infusion therapy, critical condition, hypovolemia.

Al'yanov I.A. *– resident physician of the department of anesthesiology and intensive care medical faculty*
Budarova K.V. *– anesthesiologist-resuscitator of intensive care unit*
Sirota S.I. *– candidate of medical sciences, head of the unit of anesthesiology and intensive care*
Shmakov A.N. *– doctor of medical sciences, professor of department of anesthesiology and intensive care medical faculty, e-mail: alsmakodav@yandex.ru*

УДК 616.8-009 DOI: 10.15372/SSMJ201803011

ЦЕРВИКАЛЬНАЯ ДИСТОНИЯ: ИСТОРИЧЕСКИЕ И СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Оксана Аркадьевна ДРУЖИНИНА[1], Лариса Павловна ШПЕРЛИНГ[2], Наталья Григорьевна ЖУКОВА[3]

[1] *Городская клиническая поликлиника № 1*
630099, г. Новосибирск, ул. Серебренниковская, 42

[2] *Областной центр экстрапирамидных заболеваний с кабинетом ботулинотерапии*
630099, г. Новосибирск, ул. Серебренниковская, 42

[3] *Сибирский государственный медицинский университет*
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Дистония является гиперкинезом, характеризующимся непроизвольно повторяющимися сокращениями мышц в одной или нескольких областях тела и приводящих к возникновению патологической позы и нарушению произвольных движений [22, 29]. Такое определение наиболее распространено, но, учитывая фенотипический полиморфизм, характерный для этой патологии, не является полностью исчерпывающим. Отсутствие единой методологии и полиморфизм клинических проявлений заболевания затрудняют проведение эпидемиологических исследований, что сказывается на их полноте и достоверности. Механизм реализации дистонического гиперкинеза остается до сих пор недостаточно изученным. В настоящее время в качестве ведущей гипотезы выступает мультифакториальность заболевания, согласно которой генетическая детерминированность может проявиться под воздействием экзогенных факторов. Диагноз цервикальной дистонии является клиническим и устанавливается на проявлениях патологической позы головы и шеи. Заболевание начинается в трудоспособном возрасте и протекает с формированием функционального дефицита, приводящего к трудностям бытового и профессионального характера. Это в свою очередь формирует предпосылки для возникновения психологической, социальной дезадаптации, а также инвалидизации больных [2, 3, 10, 15]. Доказанным и эффективным методом лечения цервикальной дистонии является применение ботулинического токсина типа А (класс рекомендации А).

Ключевые слова: цервикальная дистония, эпидемиология, мультифакториальность, классификация, ботулинотерапия.

Цервикальная дистония (ЦД) характеризуется непроизвольными болезненными мышечными спазмами шейного отдела, формирующими патологические, инвалидизирующие позы головы и шеи [35]. Дистонические мышечные сокращения нельзя предсказать, они носят постоянный или спазматический характер и возникают не только в мышцах-агонистах, но и в антагонистах [14]. В патологическом паттерне участвуют ременная мышца, трапециевидная, кивательная, передняя лестничная и мышца, поднимающая лопатку. При длительном тоническом сокращении формируются гипертрофии. Часто клинически ЦД сочетается с блефароспазмом, оромандибулярными гиперкинезами и писчим спазмом, поэтому до сих пор дискутируется вопрос о самостоятельности формы или принадлежности ее к генерализованной. В.Н. Шток предложил рассматривать ЦД в рамках сегментарной [25]. Многими авторами отмечено, что заболевание начинается в возрасте между 20 и 60 годами, когда человек трудоспособен и социально активен. Постепенное формирование функционального дефицита, приводящее к инвалидизации, сопровождается как профессиональной, так и социальной дезадаптацией, что свидетельствует о высокой медико-социальной важности научно-исследовательских задач, направленных на более глубокое изучение основных клинико-функциональных проявлений ЦД и методов ее лечения [2, 3].

Дружинина О.А. *– аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, врач-невролог, e-mail: oxi-novosib@mail.ru*
Шперлинг Л.П. *– к.м.н., врач-невролог, e-mail: Lima.1963@mail.ru,*
Жукова Н.Г. *– д.м.н., проф. кафедры неврологии и нейрохирургии, e-mil: Znatali@yandex.ru*

Исторические аспекты. Дистония известна более ста лет и рассматривалась исключительно как аномалия, в том числе анатомического характера. Различные формы заболевания описывались как спорадические случаи со своей интерпретацией и формулировкой. Термин «тортиколлис» впервые применен в XVI веке Франсуа Рабле [20]. Говерс (1888) описал «тетаноидную хорею», по клиническим проявлениям напоминающую торсионную дистонию; Швальбе (1908) наблюдал в одной семье, у сестры и двух братьев, мышечные спазмы в виде заведения рук за спину [20]. Циен представил два случая гиперкинеза в виде хореи и атетоза [4, 20]. Оппенгеймер (1911) опубликовал четыре случая «деформирующей мышечной дистонии», при которой наблюдал насильственное сокращение мышц туловища, бедер и таза. Он предположил, что эта форма является прогрессирующим детским заболеванием [4, 20]. Стерлинг и Флатау (1911) дали определение – «прогрессирующий торсионный спазм детского возраста» [20]. Клиническую картину генерализованной дистонии описывали С.Н. Давиденков (1918, 1921), Розе (1922), Рихтер (1923), Виммер (1926), Б.Н. Маньковский и Л.И. Черни (1928), Т.Е. Любарская (1934), Лермитт (1937), а также другие авторы [13].

Эпидемиология дистонии. Несмотря на то что эпидемиологические исследования дистонии проводятся с периода первых ее описаний и по настоящее время, они остаются не полными и даже противоречивыми. Точная распространенность дистонии не известна, и встречается заболевание значительно чаще, чем диагностируется в популяции [63]. Выявление этого двигательного расстройства осложняет тот факт, что многие пациенты не обращаются своевременно за медицинской помощью либо им устанавливается некорректный диагноз. Как показало исследование, значительные трудности в диагностике начальных проявлений фокальной дистонии возникали у коллег с меньшим опытом [50].

Трудность проведения эпидемиологических исследований объясняется также недостаточностью применяемой до настоящего времени методологии, патогномоничных диагностических критериев заболевания и многообразием клинических проявлений [1, 5, 8]. Так, например, Ротчестерское исследование (1988) показало встречаемость фокальных форм дистонии в 29,5 случая на 100 000 населения, а в Нью-Кастле – 12,9 [53, 54]. Эпидемиологическое исследование ESDE (Epidemiological Study of Dystonia in Europe, 2000), проведенное в 8 странах Европы, определило частоту распространенности первичной дистонии в 15,2 случая, фокальной – в 11,7 [39]. В штате Миннесота (США) распространенность генерализованных форм первичных дистоний составляет до 3,4, фокальных – до 29,5 случая на 100 000 населения [43, 54]. Метаанализ 15 эпидемиологических исследований первичных дистоний от 2012 г. показал общую частоту встречаемости 16,43 на 100 000 населения. Однако при этих формах отмечались существенные вариации в различных популяциях [63]. В общей популяции ЦД регистрируется в 1,2–5,7 случая [5]. Дистония с поздним проявлением встречается с частотой от 30 до 7320 случаев на 1 млн населения [43]. Более точное эпидемиологическое исследование, с хорошо разработанным методологическим дизайном, выявило в районе Нью-Йорка у евреев-ашкенази встречаемость ЦД с ранним дебютом в 11,1 случая на 100 000 населения [41]. В Северной Англии распространенность дистонии с поздним развитием болезни составляет 60 случаев, в Северном Тироле у лиц старше 50 лет – 300 случаев на 100 000 населения [1]. V.L. Soland и соавт. опубликовали данные о гендерных различиях фокальной дистонии, в их исследовании соотношение женщин к мужчинам варьировало от 1,6:3 до 3:1 [61]. C.D. Marsden, описывая 39 случаев краниальной дистонии, отметил среди них преобладание женщин с соотношением 25:14 [51]. D.D. Duane высказал предположение, что непроизвольные движения могут объясняться специфическим воздействием рецепторов эстрогенов [44]. Российские исследователи приводят соотношение между мужчинами и женщинами для ЦД как 1:1,5 [15].

Долгое время недостаточность точных эпидемиологических сведений позволяла считать это заболевание довольно редким. Сегодня ЦД находится на третьем месте среди двигательных нарушений, уступая болезни Минора (эссенциальный тремор) и болезни Паркинсона [22, 48]. Фокальные формы встречаются в 10 раз чаще по сравнению с генерализованными, самой распространенной среди них является ЦД [11].

Этиология и патогенез ЦД. Патогенетические механизмы развития ЦД остаются недостаточно изученными. Психогенная теория, активно рассматриваемая в начале XX в., предполагала развитие заболевания у людей, имеющих психические отклонения разной степени выраженности. Проводимые в последующем работы показали, что неспецифические поведенческие реакции характерны для любого хронического заболевания. Специфические изменения личности у больных с дистонией не были выявлены, что доказало несостоятельность этой теории [4, 7, 19, 62]. Инфекционная теория возникла в первой половине XX в., когда наблюдался рост заболеваемо-

сти эпидемическим летаргическим энцефалитом Экономо. Предполагалось, что вирусное поражение подкорковых структур ведет к развитию ЦД. Эту гипотезу поддерживали отечественные ученые Л.С. Петелин (1970), П.М. Альперович и В.Д. Билык (1987). По современной классификации дистонии, вызванные энцефалитами, следует рассматривать как вторичные [15, 42].

В середине XX в. описывались случаи развития ЦД в результате приема нейролептиков [19], при отравлении угарным газом, при дегенеративных, онкологических и сосудистых процессах, приводящих к поражению подкорковых структур. Авторы доказали корреляцию между ЦД и тиреотоксикозом [12, 62]. Периферическая теория рассматривала рефлекторное воздействие патологических процессов в позвоночнике и корешковые реакции, приводящие к мышечным спазмам и нефизиологической установке головы и шеи [21, 24]. Теория нейроваскулярного конфликта между интракраниальной частью добавочного нерва и рядом лежащими сосудами, зубчатыми связками, находила интраоперационное подтверждение [24]. О.Р. Орлова показала изменения надъядерной регуляции мотонейронов, отметив, что патологические изменения в базальных ганглиях, в верхних отделах ствола мозга и корковых областях приводят к мышечной гиперактивности [15].

В 1989 г. L. Ozelius с соавт. картировали патологический ген в локусе DYT1, расположенный на хромосоме 9q34, что способствовало развитию генетической теории ЦД. По данным литературы, влияние генетического фактора достигает 30–40 %. На долю наследования фокальных форм дистоний приходится от 2 до 15 % [26, 34, 49]. Генетическая детерминированность реализуется под воздействием факторов окружающей среды [47]. Описано более 20 вариантов дистонии с четким менделевским наследованием. Самой распространенной формой является DYT1, имеющая связь с геном *TOR1A* [9]. Мутации DYT6, реже DYT7 и DYT13 проявляются краниоцервикальной дистонией [6, 33]. В литературе представлены случаи этой формы с DYT1-делецией [67]. Дистония DYT6, характеризующаяся началом в среднем в 16-летнем возрасте, составляет от 1 до 25 % всех случаев первичной дистонии с ранним дебютом, с пенетрантностью гена от 40 до 60 % [8, 55]. Клинические проявления этой формы, как правило, дебютируют с гиперкинеза в руке (50 %), затем вовлекаются краниальные (25 %) или цервикальные (25 %) мышцы. Более чем в половине случаев происходит генерализация патологического процесса [56].

Механизм биохимической дерегуляции, приводящий к развитию дистонии, до сих пор окончательно не изучен. Одни работы показывают развитие цервикальной мышечной гиперактивности при недостатке дофамина и избытке ацетилхолина. Другие исследователи отмечают увеличение содержания норадреналина в верхних буграх четверохолмия, красных ядрах и дефицит нейромедиатора в постеролатеральных ядрах гипоталамуса (медиальном и латеральном мамиллярных, заднем гипоталамическом, над- и предмамиллярном и вокругсводовом), а также в ядре Льюеса и голубом пятне [15, 27, 62].

В реализации гиперкинезов известна роль дофаминергических, холинергических и ГАМКергических систем мозга. Однако недостаточно эффективная терапия препаратами, воздействующими на эти медиаторы, дает основание предположить наличие и других биохимических нарушений [14]. Представлены работы по изучению морфологического субстрата в головном мозге с использованием экспериментальных моделей у животных. Одни авторы описывали клинические проявления ЦД при повреждении покрышки среднего мозга и верхней ножки мозжечка. Другие исследователи получили результаты наблюдений при одностороннем повреждении ретикулярной формации на уровне каудальной и дорсальной проекций красного ядра и верхней мозжечковой ножки. Отмечена заинтересованность вентролатерального и интерстициального ядер зрительного бугра и субталамической области [7, 12, 15, 26].

X.O. Breakefield с соавт. при фокальных формах дистонии с помощью методов нейровизуализации (воксел-ориентированной морфометрии и диффузионно-тензорной магнитно-резонансной томографии) зарегистрировали в веществе головного мозга тонкие анатомические нарушения [32]. С.Л. Тимербаева с применением воксел-ориентированной морфометрии, функциональной магнитно-резонансной томографии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии показала наличие изменений в активации моторной области поясной извилины. Были выявлены нарушения объема серого вещества в полушариях мозжечка и хвостатом ядре, а также локальное увеличение перфузии в скорлупе, сенсорной области правого полушария и в премоторной коре левого полушария. Автором было сделано предположение о связи данного паттерна с функциональным состоянием головного мозга, приводящим к нейрональной активации и гиперкинезам. В основе современной теории патогенеза дистонии лежит патологическая пластичность мозга с участием моторного и сенсорного кругов, а также структурные изменения вещества головного мозга [22].

Заслуживают внимания работы, показывающие наличие клеточной дегенерации. K.S. McNaught с соавт. у 4 пациентов с DYT1-дистонией выявили перинуклеарные агрегаты в ретикулярной формации на уровне среднего мозга и в нейронах серого вещества околоводопроводной области, а также обнаружили тау-протеин- и убиквитин-иммунореактивные комплексы в голубом пятне и пигментированных клетках компактной области черной субстанции. В группе контроля патологические включения отсутствовали [52].

Классификация и клиническая картина. Заболевание относится к фокальным формам и может возникать как спорадически, так и быть генетически обусловленным. Объем накопленной информации по дистоническим гиперкинезам способствовал созданию классификации, претерпевающей изменения и в наши дни. Последние обновления были представлены Консенсусным комитетом по изучению дистонии в 2013 г. [29]. В основу современной классификации положена клиническая картина и этиология заболевания. По этиологии выделяют первичную и вторичную формы ЦД. Первичная ЦД характеризуется наличием патологической установки головы и шеи, являющейся единственным и ведущим симптомом. Вторичная форма ЦД проявляется при гепатоцеребральной дистрофии, пантотенаткиназы-ассоциированной нейродегенерации (PKAN), образованиях задней черепной ямки и вентрикулярной области, болезни Гентингтона, сосудистых и других заболеваниях головного мозга.

В.Н. Шток предложил делить ЦД по преобладанию характера гиперкинеза: тонический тип ЦД характеризуется напряжением мышц, участвующих в патологическом паттерне, при клоническом варианте доминирует тремор головы, а их комбинация говорит о тонико-клонической форме заболевания [25]. G. Reichel и соавт. предложили концепцию ЦД, в которой выделяют форму ротации шеи и головы по отношению к туловищу [58]. По данным литературы, наиболее частым проявлением ЦД является тортиколлис – насильственный поворот головы и шеи в сторону. Для заболевания характерно волнообразное течение. В среднем прогрессирование патологического процесса происходит в течение 2–5 лет с вовлечением новых мышц и изменением паттерна, после чего ЦД может принять стационарный характер. Тяжесть заболевания определяют скорость прогрессирования и степень выраженности клинических проявлений, а также частота и продолжительность ремиссий. Так, Э.И. Кандель предложил выделить четыре степени тяжести ЦД: 1-я степень – гиперкинез появляется при нагрузках с возможностью его контроля; 2-я степень – сохраняется вертикальное удержание головы без применения корригирующих жестов лишь на непродолжительное время; 3-я степень – голова выводится в прямое положение только с помощью жестов-агонистов, больные испытывают трудности при самообслуживании и профессиональной деятельности, приводящие к инвалидизации; 4-я степень – стойкая патологическая установка головы, приводящая к резкому нарушению самообслуживания. Корригирующие жесты не эффективны [7].

Кроме того, разработаны рейтинговые шкалы, позволяющие объективно оценивать степень тяжести заболевания. Шкала TWSRS (Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale) определяет степень выраженности проявлений гиперкинеза, боли и дезадаптации [38], другая шкала оценки тяжести ЦД помогает оценить амплитуду и длительность тремора, подъем плеча [66]. Клинические рекомендации по диагностике и лечению дистонии, утвержденные решением Президиума Всероссийского общества неврологов 17.06.2014, отмечают важность использования оценочных шкал, видео- и фоторегистрации. Документирование патологического паттерна необходимо для оценки результатов лечения и планирования дальнейших этапов терапии [16, 27].

Необходимо помнить, что диагноз «дистония», как и прежде, остается клиническим. Выделяют основные критерии диагностики заболевания [28]:

1. Дистоническая поза.

2. Наличие дистонии действия. Пациенты испытывают затруднения при вертикализации головы и шеи, но свободно выполняют другие движения, где задействованы те же мышцы.

3. Взаимосвязь выраженности гиперкинеза со статическими нагрузками: усиливается при передвижении и стоя, ослабевает в положении лежа.

4. Корреляция с психоэмоциональным состоянием: возрастание симптомов при повышении нагрузок эмоционального характера. Свойственны суточные колебания: ослабление гиперкинеза после сна. Малые дозы алкоголя уменьшают клинические проявления.

5. Применение корригирующих приемов, купирующих либо уменьшающих патологическую позу: касание подбородка или щеки, легкое надавливание на нижнюю челюсть, заведение рук за спину или за голову, имитация поправления прически и другие. Корригирующие жесты обнаруживаются у 70 % пациентов и указывают на заинтересованность сенсорных афферентных систем [59].

6. Смена характера движений вызывает парадоксальные кинезии: выраженность клинических симптомов ЦД ослабевает или купируется при

беге, ходьбе спиной вперед или вождении автомобиля;

7. Временное исчезновение или уменьшение клинических проявлений заболевания.

8. Инверсия, проявляющаяся изменением стороны поворота головы и шеи.

9. Динамичность, характеризующаяся комбинацией и трансформацией вариантов фокальной дистонии, смена паттерна, наличие спонтанных ремиссий.

В последние годы у исследователей возрос интерес к немоторным симптомам заболевания, влияющим на качество жизни больных ЦД. Боль, тревога, депрессия, сенсорные расстройства, диссомния и когнитивные изменения отягощают течение заболевания. Самым распространенным коморбидным синдромом при ЦД является боль, которая встречается у 70 % пациентов [57, 65]. Заболевание может дебютировать с болевых ощущений задолго до проявления гиперкинеза. 60 % больных ЦД жалуются на боли тянущего характера в области шеи и затылка [31]. Авторы многочисленных работ часто подтверждают комбинацию дистонии с тревожно-депрессивным расстройством, связанным с изменениями в кортико-лимбо-стриарной системе [64]. Исследование G. Fabbrini и соавт. демонстрирует у 57,3 % больных с фокальными формами психические нарушения разных характера и степени проявлений, сформировавшиеся за 18,4 ± 13,9 года до начала дистонии. Корреляция между тяжестью гиперкинеза и степенью депрессивных расстройств не выявлена [46]. Взаимосвязь дистонии и тревожно-депрессивных нарушений остается недостаточно изученной, а большинство работ имеет методологические неточности [23].

По литературным данным, от 40 до 70 % пациентов с фокальной дистонией страдают нарушениями сна, не зависящими от тяжести дистонии, но коррелирующими со степенью депрессии [40, 45]. Полученные данные позволяют предположить вторичный характер диссомнии. Исследование J. Yang и соавт. продемонстрировало, что у больных с ЦД качество сна хуже, чем при блефароспазме [68]. Представлены работы по изучению когнитивной функции, где отмечался дефицит внимания. В исследовании Е.В. Гузановой показаны изменения у пациентов с ЦД в виде ригидности мышления, затруднения при обобщении и абстрагировании [3]. Другие работы отмечают отсутствие когнитивного снижения у носителей гена *DYT1* [30]. Во многих работах оценивались боль и тревожно-депрессивные нарушения, ухудшающие качество жизни. Авторы отмечают, что у больных ЦД качество жизни хуже, чем при иных вариантах фокальной дистонии [57, 60].

Лечение ЦД. Целью терапии больных ЦД является достижение устойчивой ремиссии и социально-профессиональной активности. Медикаментозная коррекция гиперкинеза до сих пор остается недостаточно эффективной. Разрабатывались различные техники оперативного вмешательства: селективная денервация жевательных мышц, невролиз добавочного нерва, ризотомия, глубокая стимуляция мозга (Deep Brain Stimulation, DBS). Однако оперативное лечение лишь отчасти улучшает качество жизни больных, а у большинства оказывается не эффективным. Проведение DBS рекомендовано только при устойчивости к ботулинотерапии и генерализации гиперкинеза.

В 1985 г. J.K. Tsui впервые использовал ботулотоксин типа А в лечении ЦД. На современном этапе эта терапия признана наиболее эффективной. По данным литературы, средняя эффективность ботулинотерапии достигает 70–85 %, средняя продолжительность – до 3,5 мес. Проводимые работы показали, что ботулотоксин реализуется как периферический миорелаксант, осуществляя прямое ингибирование на уровне мионевронального и мотонейронального холинергического синапсов. Клинический эффект проявляется уменьшением боли и спастичности. Ботулинический токсин типа А, модулируя афферентный вход из дистоничных мышц, воздействует на корковую пластичность, позволяя рассматривать данное лечение как патогенетическое [17]. Европейская федерация неврологических обществ (European Federation of Neurological Societies, EFNS) рекомендовала ботулотоксин для лечения ЦД как препарат первой линии, класс рекомендации А [28]. К настоящему времени накоплен существенный опыт эффективного проведения ботулинотерапии. Инъекции проводятся 2–4 раза в год, в зависимости от выраженности клинических проявлений. По данным литературы, побочные эффекты чаще проявляются в виде дисфагии (10–15 %), слабости мышц шеи (8 %), цервикалгии (8 %), астенического синдрома (5 %), ксеростомии (2 %), сомноленции (2 %), краниалгии (2 %) [37]. Для повышения надежности и результативности ботулинотерапии процедуру рекомендовано проводить с применением электромиографии, ультразвукового исследования или компьютерной томографии [18].

Необходимость коррекции немоторных симптомов ЦД пероральными препаратами остается обсуждаемой. Слепые рандомизированные плацебо-контролируемые исследования в этой области, демонстрирующие свой терапевтический эффект, не проводились. Напротив, имеются данные, что нейролептики или антидепрессанты из

группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина могут ухудшать течение заболевания [36]. Очевидна необходимость применения мультимодального подхода для эффективной терапии дистонического гиперкинеза и коррекции коморбидных состояний [23].

Проведенный обзор исторических и современных аспектов дистонии демонстрирует актуальность проблемы. Многочисленные теории развития ЦД не полностью раскрывают вопрос патогенеза заболевания. Активное изучение проблемы дистонии получило свое наибольшее развитие в последние десятилетия. Это связано с внедрением в практику лабораторных и нейровизуализационных методов исследования. Более того, были организованы Фонд по изучению дистонии (Dystonia Medical Research Foundation) и Коалиция по изучению дистонии (Dystonia Coalition), к которым присоединились Европейская федерация неврологических обществ и Общество Двигательных расстройств (European Federation of Neurological Societies / Movement Disorders Society, EFNS/MDS). В результате были выделены ключевые ступени диагностики заболевания и представлена современная классификация, которая тесно перекликается с клинической картиной. На сегодняшний день наиболее эффективным методом лечения ЦД признана ботулинотерапия (класс рекомендации А). Однако лечение этой патологии до сих пор остается симптоматическим, а концепция комплексного подхода в терапии требует дальнейших работ. Применение в практической деятельности результатов исследований, посвященных патофизиологическим, генетическим, диагностическим аспектам ЦД, позволяет повысить качество лечения при этом сложном заболевании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Голик В.А., Марченко С.В.* Современные подходы к диагностике и лечению дистоний // Укр. мед. часопис. 2007. (1). 59–67.

2. *Голубев В.Л., Вейн А.М.* Неврологические синдромы. Руководство для врачей. М.: Эйдос Медиа, 2002. 832 с.

3. *Гузанова Е.В.* Нейропсихологические расстройства и возможности их коррекции у больных спастической кривошеей. Автореф. дис. … канд. мед. наук. М., 2009.

4. *Давиденков С.Н.* Многотомное руководство по неврологии. М.: Гос. изд-во мед. лит., 1960. 7. 317–322.

5. *Залялова З.А.* Современные классификации мышечных дистоний, стратегия лечения // Журн. неврологии и психиатрии. 2013. (3). 85–89.

6. *Залялова З.А.* Краниальные дистонии: клинические проявления, дифференциальная диагностика, методы лечения. Руководство для врачей по материалам III Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием) / Ред. С.Н. Иллариошкин, О.С. Левин. М.: Соверо пресс, 2014. 250–252.

7. *Кандель Э.И.* Функциональная и стереотаксическая нейрохирургия. М.: Медицина, 1981. 368 с.

8. *Краснов М.Ю., Тимербаева С.Л., Абрамычева Н.Ю., Степанова М.С., Шпилюкова Ю.А, Ершова М.В.* DYT6-форма идиопатической дистонии // Анналы клин. и эксперим. неврологии. 2016. 10. (2). 52–56.

9. *Краснов М.Ю., Тимербаева С.Л., Иллариошкин С.Н.* Генетика наследственных форм дистонии // Анналы клин. и эксперим. неврологии. 2013. (2). 55–62.

10. *Левин О.С., Московцева Ж. М.* Современные подходы к диагностике и лечению тиков. Диагностика и лечение экстрапирамидных заболеваний / Ред. В.Н. Шток. М., 2000. 110–123.

11. *Левин О.С.* Тремор // Рос. мед. журн. 2001. (5). 36–40.

12. *Лис А. Дж.* Тики. М.: Медицина, 1989. 336 с.

13. *Лихачев С.А., Рушкевич Ю.Н.* Спастическая кривошея: эпидемиология, этиология, патогенез, клиника, лечение // Мед. журн. 2004. (2). 18–22.

14. *Мякотных В.С.* Неэпилептические пароксизмальные состояния: учеб.-методич. пособие. Екатеринбург, 2010. 111 с.

15. *Орлова О.Р.* Клинико-физиологический анализ спастической кривошеи: автореф. дис. … канд. мед. наук. М., 1989.

16. *Орлова О.Р.* Фокальные дистонии: клиника, патогенез, лечение с использованием токсина ботулизма: автореф. дис. … д-ра мед. наук. М., 2000.

17. *Орлова О.Р., Тимербаева С.Л., Куренков А.Л.* Клинико-физиологические основы ботулинотерапии. Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей / Ред. С.Н. Иллариошкин, Н.Н. Яхно. М., 2011. 227–231.

18. *Орлова О.Р., Тимербаева С.Л., Хатькова С.Е., Котляров В.В., Коренко Л.А., Залялова З.А., Фальковский И.В., Шперлинг Л.П., Антипова Л.Н., Антипенко Е.А., Мингазова Л.Р., Сойхер М.И., Красавина Д.А.* Фокальные дистонии и их лечение препаратом диспорт (ботулинический токсин типа А) // Журн. неврологии и психиатрии. 2012. (5). 81–89.

19. *Петелин Л. С.* Экстрапирамидные гиперкинезы. М.: Медицина, 1970. 25 с.

20. *Прохоров А.М.* Большая медицинская энциклопедия: в 30 т. 3-е изд. М.: Сов. энциклопедия, 1969–1978.

21. *Савченко Е.И.* Клиника и нейрохирургическое лечение спастической кривошеи: автореф. дис. … канд. мед. наук. Киев, 1987.

22. *Тимербаева С.Л.* Фокальные и сегментарные формы первичной дистонии: клинические, патофизиологические и молекулярно-генетические аспекты: автореф. дис. … д-ра мед. наук. М., 2012.

23. *Толмачева В.А.* Фокальные дистонии: *немоторные* симптомы и коморбидность // Мед. сов. 2017. (10). 81–86.

24. *Штанге Л.А., Рощина Н.А.* О *клинике*, патогенезе и лечении нейроваскулярной спастической кривошеи // Журн. неврологии и психиатрии. 1992. (1). 56–59.

25. *Шток В.Н., Иванова-Смоленская И.А., Левин О.С.* Экстрапирамидные расстройства: Рук-во по диагностике и лечению. М.: МЕДпресс-информ, 2002. 700 с.

26. *Яхно Н.Н., Штульман Д.Р., Мельничук П.В.* Болезни нервной системы. Рук-во для врачей: в 2 т. М.: Медицина, 1995. 2. 512 с.

27. *Яхно Н.Н, Штульман Д.Р.* Болезни нервной системы. М.: Медицина, 2001. 119 с.

28. *Albanese A., Asmus F., Bhatia K.P., Elia A.E., Elibol B., Filippini G., Gasser T., Krauss J.K., Nardocci N., Newton A., Valls-Sole J.* EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias // Eur. J. Neurol. 2011. 18. (1). 5–18.

29. *Albanese A. Bhatia K., Bressman S.B., Delong M.R., Fahn S., Fung V.S., Hallett M., Jankovic J., Jinnah H.A., Klein C., Lang A.E., Mink J.W., Teller J.K.* Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update // Mov. Disord. 2013. 28. (7). 863–873.

30. *Anca M.H., Zaccai T.F., Badarna S., Lozano A.M., Lang A.E., Giladi N.* Natural history of Oppenheim's dystonia (DYT1) in Israel // J. Child. Neurol. 2003. 18. (5). 325–330.

31. *Bezerra M.E., Rocha-Filho P.A.* Headache attributed to craniocervical dystonia – A little known headache // Headache. 2017. 57. (2). 336–343.

32. *Breakefield X.O., Blood A.J., Li Y., Hallett M., Hanson P.I., Standaert D.G.* The pathophysiological basis of dystonias // Nat. Rev. Neurosci. 2008. 9. (3). 222–234.

33. *Bressman S.B., Raymond D., Fuchs T., Heiman G.A., Ozelius L.J., Saunders-Pullman R.* Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study // Lancet Neurol. 2009. 8. (5). 441–446.

34. *Bressman S.B., Warner T.T., Almasy L., Uitti R.J., Greene P.E., Heiman G.A., Raymond D., Ford B., de Leon D., Fahn S., Kramer P.L., Risch N.J., Maraganore D.M., Nygaard T.G., Harding A.E.* Exclusion of the DYT1 locus in familial torticollis // Ann. Neurol. 1996. 40. (4). 681–684.

35. *Brin M.* Fundamentals of dystonia / Handbook of botulinum toxin treatment, Second ed. / Eds. P. Moore, M. Naumann. John Wiley & Sons, 2003. 101–118.

36. *Gerber P.E., Lynd L.D.* Selective serotonin-reuptake inhibitor-induced movement disorders // Ann. Pharmacother. 1998. 32. 692–698.

37. *Comella C.L., Jankovic J., Brin M.F.* Use of botulinum toxin type A in the treatment of cervical dystonia // Neurology. 2000. 55. (12, Suppl. 5). S15–S21.

38. *Comella C.L., Stebbins G.T., Goetz C.G., Chmura T.A., Bressman S.B., Lang A.E.* Teaching tape for the motor section of the Toronto Western Spasmodic Torticollis Scale // Mov. Disord. 1997. 12. (4). 570–575.

39. *Collaborative Group.* A prevalence study of primary dystonia in eight European countries. The Epidemiological Study of Dystonia in Europe (ESDE) // J. Neurol. 2000. 247. (10). 787–792.

40. *Dauvilliers Y., Tafti M.* Catechol-O methyltransferase, dopamine, and sleepwake regulation // Sleep Med. Rev. 2015. 22. 47–53.

41. *Defazio G., Abbruzzese G., Livrea P., Berardelli A.* Epidemiology of primary dystonia // Lancet Neurol. 2004. 3. (11). 673–678.

42. *Defazio G., Berardelli A., Abbruzzese G., Lepore V., Coviello V., Acquistapace D., Capus L., Carella F., de Berardinis M.T., Galardi G., Girlanda P., Maurri S., Albanese A., Bertolasi L., Liguori R., Rossi A., Santoro L., Tognoni G., Livrea P.* Possible risk factors for primary adult onset dystonia: a case-control investigation by the Italian Movement Disorders Study Group // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1998. 64. (1). 25–32.

43. *Defazio G.* The epidemiology of primary dystonia: current evidence and perspectives // J. Neurol. 2010. 17. 9–14.

44. *Duane D.D.* Sex and Tremor Location: Similarities Between Essential Tremor and Cervical Dystonia // Mov. Disord. 2005. 20. (1). 119–120.

45. *Eichenseer S.R., Stebbins G.T., Comella C.L.* Beyond a motor disorder: a prospective evaluation of sleep quality in cervical dystonia // Parkinsonism Relat Disord. 2014. 20. (4). 405–408.

46. *Fabbrini G., Berardelli I., Moretti G., Pasquini M., Bloise M., Colosimo C., Biondi M., Berardelli A.* Psychiatric disorders in adult-onset focal dystonia: a case-control study // Mov. Disord. 2010. 25. (4). 459–465.

47. *Hallett M., Evinger C., Jankovic J., Stacy M.* Update on blepharospasm: report from the BEBRF International Workshop // Neurology. 2008. 71. (16). 306–312.

48. *Hertenstein E., Tang N.K., Bernstein C.J., Nissen C., Underwood M.R., Sandhu H.K.* Sleep in patients with primary dystonia: A systematic review on the state of research and perspectives // Sleep Med. Rev. 2016. 26. 95–107.

49. *Holmgren G., Ozelius L., Forsgren L., Almay B.G., Holmberg M., Kramer P., Fahn S., Breakefield X.O.* Adult onset idiopathic torsion dystonia is excluded from the DYT 1region (9q34) in a Swedish family // J. Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995. Aug 59. (2). 178–181.

50. *Logroscino G., Livrea P., Anaclerio D., Aniello M.S., Benedetto G., Cazzato G., Giampietro L.,*

Manobianca G., Marra M., Martino D., Pannarale P., Pulimeno R., Santamato V., Defazio G. Agreement among neurologists on the clinical diagnosis of dystonia at different body sites // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2003. 74. (3). 348–350.

51. *Marsden C.D.* The treatment of dyskinesias // Dyskinesias / Eds. G.W. Bruyn, J.S. Bruma, R.A. Roos. Uden: Sandoz, 1984.

52. *McNaught K.S., Kapustin A., Jackson T., Jengelley T.A., Jnobaptiste R., Shashidharan P., Perl D.P., Pasik P., Olanow C.W.* Brainstem pathology in DYT1 primary torsion dystonia // Ann Neurol. 2004. 56. (4). 540–547.

53. *Nutt J.G., Muenter V., Aronson A., Kurland L., Melton L.J.* Epidemiology of focal and generalized dystonia in Rochester, Minnesota // Mov. Disord. 1988. 3. (3). 188–194.

54. *Nutt J.G., Muenter M.D., Melton L.J., Aronson A., Kurland L.T.* Epidemiology of dystonia in Rochester, Minnesota // Adv Neurol. 1988. 50. 361–365.

55. *Ozelius L.J., Bressman S.B.* THAP1: role in focal dystonia? // Neurology. 2010. 74. 192–193.

56. *Ozelius L.J., Lubarr N., Bressman S.B.* Milestones in dystonia // Mov. Disord. 2011. 26. 1106–1126.

57. *Pekmezovic T., Svetel M., Ivanovic N., Dragasevic N., Petrovic I., Tepavcevic D.K., Kostic V.S.* Quality of life in patients with focal dystonia // Clin. Neurol. Neurosurg. 2009. 111. (2). 161–164.

58. *Reichel G., Stenner A., Jahn A.* Zur Phänomenologie der zervikalen Dystonien // Fortschr. Neurol. Psychiatr. 2009. 77. (5). 272–277.

59. *Schramm A., Classen J., Reiners K., Naumann M.* Characteristics of sensory trick-like manoeuvres in jaw-opening dystonia // Mov. Disord. 2007. 22. (3). 430–433.

60. *Soeder A., Kluger B.M., Okun M.S., Garvan C.W., Soeder T., Jacobson C.E., Rodriguez R.L., Turner R., Fernandez H.H.* Mood and energy determinants of quality of life in dystonia // J. Neurol. 2009. 256. (6). 996–1001.

61. *Soland V.L., Bhatia K.P., Marsden C.D.* Sex prevalence of focal dystonias // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1996. 60. (2). 204–205.

62. *Stacy M.* Idiopathic cervical dystonia: an overview // Neurology. 2000. 55. (12, Suppl. 5). S2–S8.

63. *Steeves T.D., Day L., Dykeman J., Jette N., Pringsheim T.* The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis // Mov. Disord. 2012. 27. (14). 1789–1796.

64. *Stefurak T., Mikulis D., Mayberg H., Lang A.E., Hevenor S., Pahapill P., Saint-Cyr J., Lozano A.* Deep brain stimulation for Parkinson's disease dissociates mood and motor circuits: a functional MRI case study // Mov. Disord. 2003. 18. (12). 1508–1516.

65. *Tepavcevic D.K., Svetel M., Pekmezovic T., Petrovic I., Kostic V.S.* Craniocervical Dystonia Questionnaire (CDQ-24): validation and cross-cultural adaptation in Serbian patients // Coll. Antropol. 2009. 33. (4). 1185–1189.

66. *Tsui J.K.S., Stoessl A.J., Eisen A., Calne S., Calne D.B.* Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis // Lancet. 1986. 2. (8501). 245–247.

67. *Xiao J., Bastian R.W., Permutter J.S. et al.* High-put mutational analysis of TOR1A in primary dystonia // BMC Med. Genet. 2009. 10. 24.

68. *Yang J., Shao N., Song W., Wei Q., Ou R., Wu Y., Shang H-F.* Nonmotor symptoms in primary adult-onset cervical dystonia and blepharospasm // Brain Behav. 2017. 7. (2). e00592.

CERVICAL DYSTONIA: HISTORICAL AND MODERN ASPECTS (REVIEW)

Oksana Arkadyevna DRUZHININA[1], Larisa Pavlovna SHPERLING[2], Nataliya Grigorevna ZHUKOVA[3]

[1] *City Polyclinic № 1*
630099, Novosibirsk, Serebrennikovskaya str., 42

[2] *Regional Center for Extrapyramidal Diseases with Botulinum Therapy Room*
630099, Novosibirsk, Serebrennikovskaya str., 42

[3] *Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia*
634050, Tomsk, Moscow highway, 2

Dystonia is hyperkinesis characterized by involuntarily repetitive muscle contractions in one or more body areas. It leads to the appearance of a pathological posture and disruption of arbitrary movements. This definition is the most common, but not completely exhaustive, because of the phenotypic polymorphism of the disease. There is not unitary methodology for epidemiological research. Also the disease clinical symptoms are very polymorphic. These reasons make the results of the study incomplete and inaccurate. Implementation mechanism of dystonic hyperkinesia is still insufficiently studied. At the present time the disease multifactorial nature is the leading hypothesis whereby the genetic determinacy can be realized under the influence of exogenous factors. The diagnosis of the cervical dystonia is clinical and sets on the manifestations of the pathological posture of the head and neck. The disease begins at the active working age and proceeds with the functional deficit formation leading to difficulties of domestic and professional nature. This leads to psychological, social dysaptation and disability of patients. The proven effective treatment for the cervical dystonia is the use of botulinum toxin of type A (the grade of recommendation A).

Key words: cervical dystonia, multi-factoriality, classification of dystonia, botulinum toxin treatment.

Druzhinina O.A. *– postgraduate student of the chair for neurology and neurosurgery, e-mail: oxi-novosib@mail.ru*
Shperling L.P. *– candidate of medical sciences, neurologist, e-mail: Lima.1963@mail.ru*
Zhukova N.G. *– doctor of medical sciences, professor of the chair for neurology and neurosurgery, e-mil: Znatali@yandex.ru.*

УДК 617.751.62, 65, 68 DOI: 10.15372/SSMJ201803012

ДИСТАНТНЫЙ СКРИНИНГ ЗРЕНИЯ ШКОЛЬНИКОВ КАК ПРАКТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРИМЕНЕНИЯ ТЕЛЕМЕДИЦИНЫ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Валерий Вячеславович ЧЕРНЫХ, Игорь Леонидович ПЛИСОВ, Наталья Геннадьевна АНЦИФЕРОВА, Варвара Борисовна ПУЩИНА

МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Минздрава России, Новосибирский филиал
630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

Раннее выявление нарушений зрения детей позволяет офтальмологам своевременно назначать профилактические мероприятия и лечение, стабилизировать развитие патологии и предотвращать возникновение осложнений. Тем не менее существующая система офтальмологической службы не позволяет проводить регулярные медицинские осмотры всех детей школьного возраста. Целью нашего исследования было разработать и внедрить в практику метод дистанционного скринингового обследования школьников с использованием средств телекоммуникации. **Материал и методы.** Мы разработали интерактивную компьютерную программу для дистанционного исследования остроты зрения, функционального состояния рефракции, диагностики астигматизма и патологии макулярной области. Результаты исследования автоматически записывались в компьютерную базу данных. Программа была размещена на сайте нашей клиники. Скрининг проводился одновременно для 5 школьников, которые сидели в компьютерном классе своих школ. В зависимости от количества проводимых тестов исследование длилось от 4 до 8 мин для группы. **Результаты и их обсуждение.** Дистантный скрининг зрения проведен 28983 школьникам. Острота зрения 1,0–0,9 выявлена у 14 345 человек (49,5 %), 0,8–0,2 – у 11 187 человек (38,6 %) и ниже 0,1 – у 3451 человека (11,9 %). Тест не является специфичным по виду патологии, но позволяет сделать вывод, что сниженное зрение имеет место более чем у половины школьников. Метод дистанционного обследования зрения надежен и высокоэффективен. База данных результатов обследования помогает диагностировать патологию на ранней стадии, отслеживать ее динамику и своевременно информировать родителей о необходимости расширенного обследования и офтальмологического лечения их детей.

Ключевые слова: телемедицина, скрининг зрения, оптотипы Ландольта, острота зрения, миопия, косоглазие, амблиопия.

Основной задачей, стоящей перед детскими офтальмологами, является своевременное выявление и устранение факторов, препятствующих должному развитию зрительных функций или способствующих их снижению. У детей первых 7 лет жизни такие функциональные расстройства бинокулярного и монокулярного зрения приводят к возникновению амблиопии – остроты зрения ниже возрастной нормы. Эта проблема диагностируется у 2–3 % населения вне зависимости от пола и у 1,2 % пациентов является неустранимой при позднем выявлении и несвоевременном назначении адекватных лечебных мероприятий [11, 13, 17]. Следует подчеркнуть, что к числу основных этиологических причин развития амблиопии относятся косоглазие, которое имеет место у 2–5 % детского населения (от 576 000 до 1 441 000 человек в Российской Федерации) [6, 7, 9] (дисбинокулярная амблиопия), и аметропии – у более чем 25 % (более 7 200 000 человек) [12] (рефракционная амблиопия). Причем около 10 % пациентов с нарушениями рефракции не ставится своевременный диагноз и не назначается адекватная очковая коррекция [5]. Поэтому именно на выявление этих амблиогенных факторов должен быть направлен скрининг зрения у детей дошкольного возраста.

Анизометропическая амблиопия является наиболее частой при рефракционных нарушениях (до 50 % случаев из 75 % всех причин) [10]. На второе место среди причин ставятся нарушения глазодвигательной системы (19 %) [4].

Черных В.В. *– д.м.н., проф., директор, e-mail: chernych@mntk.nsk.ru*
Плисов И.Л. *– д.м.н., зав. 3-м офтальмологическим отделением, e-mail: plisov_rus@mail.ru*
Анциферова Н.Г. *– к.м.н., врач-офтальмолог 3-го офтальмологического отделения, e-mail: dr_anz@mail.ru*
Пущина В.Б. *– врач-офтальмолог 3-го офтальмологического отделения, e-mail: calypso_shadow@rambler.ru*

В 27 % случаев причина комбинированная [4]. Однако дисбинокулярная амблиопия, сопутствующая косметическому дефекту (косоглазие), выявляется раньше (достоверно с 6 мес. жизни), чем анизометропическая, поскольку признаки последней можно достоверно установить только при проверке по таблице в вербальном возрасте (в 2–3 года) [14]. В более старшем возрасте дети даже с оптимальной оптической системой подвержены риску развития миопии. По данным литературы, в различных регионах эта рефракционная проблема может быть выявлена у 9,2–49,7 % [8, 15].

Клиническая острота зрения может быть измерена различными способами и для самых разных целей. На второе место по своей актуальности выделяется исследование остроты зрения для скрининга (например, школьных тестов), чтобы предположить наличие или отсутствие глазных аномалий. Целесообразно, чтобы все оптотипы в наборе оценивались для равной узнаваемости и калибровались на стандартный тестовый объект. Наиболее широко распространенным эталонным оптотипом для тестирования зрения служат кольца Ландольта [16]. Эти оптотипы могут быть ориентированы в четырех или восьми позициях. Аргументы в пользу четырехпозиционного теста заключаются в следующем:

1) тест проще объяснить пациенту и его легче провести;

2) визуальное разрешение в косых меридианах в обычном наблюдателе меньше, чем в вертикальных и горизонтальных меридианах;

3) большинство астигматизма с прямыми осями;

4) тест лучше коррелирует с общими клиническими оптотипами.

Скрининг в медицине – методологический подход, используемый, в частности, для массового обследования населения (его отдельных контингентов) с целью выявления определенного заболевания (группы заболеваний) или факторов, способствующих его развитию (факторов риска) [1]. Оптимальное скрининговое обследование должно отвечать трем требованиям: оно должно быть проведено максимально быстро, максимально полно охватить контингент обследуемых и требовать минимальных денежных затрат.

В век современных технологий эти критерии могут быть учтены только с помощью использования средств телекоммуникаций. В настоящее время в практику здравоохранения активно внедряются возможности телемедицины. Согласно тексту закона «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросам применения информационных технологий в сфере охраны здоровья», вводится возможность оказания медицинской помощи с применением телемедицинских технологий путем проведения консультаций и консилиумов, обеспечивающих дистанционное взаимодействие врачей между собой, врача и пациента или его законного представителя, а также дистанционный мониторинг состояния здоровья пациента [3].

Целью исследования явилось проведение анализа эффективности дистантного скринингового обследования зрения у школьников, планирование путей его эффективного внедрения в практику, разработка перспективных направлений совершенствования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Рабочей группой Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Минздрава России в результате научно-практической деятельности в период с 2007 по 2009 г. создана программа для ЭВМ, получившая регистрацию в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам [2] и позволяющая провести в интерактивном режиме четыре вида оптометрического и офтальмологического обследования:

1. Исследование остроты зрения: применяется таблица оптометрических оптотипов Ландольта, которые считаются наиболее достоверными при исследовании этой функции центрального зрения. Угловой размер оптотипов задается после количественной верификации тест-полоски перед проведением исследования работником школы, ответственным за проведение скрининга. Количество оптотипов, предъявляемых пациенту, и количество допустимых ошибок строго соответствует мировому стандарту при исследовании остроты зрения в офтальмологическом кабинете.

2. Определение состояния рефракции школьника на момент проведения обследования, ее сдвиг в сторону гиперметропии или миопии – дуохромный тест: напомним, что близорукий человек видит более четкими оптотипы, расположенные на красном фоне, а дальнозоркий – на зеленом. Тест является значимым – контроль рефракции на фоне школьной зрительной нагрузки позволяет судить о функциональной готовности к ней ребенка. Полное контрольное офтальмологическое обследование в ряде случаев не подтвердило наличие у обследованного школьника близорукости, но выявленное при скрининге зрительное перенапряжение позволяет судить о высоком риске возникновения миопии.

3. Тест «лучистая фигура» позволяет выявить астигматизм путем субъективной оценки четко-

сти видения разнонаправленных отрезков лучистой фигуры. Если оптика физиологически относительно симметрична, то обследуемый не будет указывать на эти различия.

4. Тест Амслера позволяет косвенно выявить или исключить патологию макулярной зоны – участка сетчатки, ответственного за состояние центрального зрения.

По завершении обследования результаты автоматически заносятся в базу данных и хранятся в ней персонализированно. Особенности введения паспортных данных обследуемых позволяют контролировать результаты скрининга вне зависимости от того, продолжает ли ребенок обучаться в этой школе или другой после смены места жительства. Регламент проведения скрининга подразумевает использование программы, размещенной на сайте нашей клиники через интернет-провайдера. Обследование проводится в компьютерном классе одномоментно группе из 5 школьников. В зависимости от количества тестов обследование занимает от 4 до 8 минут. Таким образом, за один академический урок возможно выполнение скринингового обследования зрения всем ученикам среднестатистического по наполнению класса общеобразовательной школы (30–40 человек). Сроки проведения скринингового обследования школьников согласованы с главными управлениями здравоохранения, образования, связи и информатизации мэрии г. Новосибирска, родительскими комитетами школ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С февраля 2008 по июль 2017 г. дистантное скрининговое исследование зрения было проведено 28983 школьникам г. Новосибирска (таблица). Тест не является специфичным по виду патологии органа зрения, но позволяет сделать вывод, что проблемы со сниженным зрением имеют место более чем у половины школьников. Углубленный анализ динамики остроты зрения в каждой из групп по степени выявленной остроты зрения показал следующую тенденцию.

Группа с остротой зрения 1,0–0,9. С 1 по 8 класс отмечается динамическое увеличение относительного количества школьников, которым был проведен дистантный скрининг зрения и у которых был верифицирован данный уровень развития монокулярных зрительных функций, годичный градиент роста детской популяции с должными показателями центрального зрения составил 3,75 % (от $p = 0{,}0084$ до $p = 0{,}0000$, критерий χ^2; коэффициент корреляции Пирсона $r = 0{,}93$, $p = 0{,}001$). К числу причин такого увеличения можно отнести следующие. Во-первых, в подгруппе рефракционно-оптимальных детей уровень остроты зрения 0,9–1,0 достигается в возрасте 6–8 лет. Во-вторых, в подгруппе пациентов с рефракционной и дисбинокулярной амблиопией при аметропиях средней и высокой степени, анизометропиях, гетеротропиях, леченных некачественно, порог достижения этого уровня центрального зрения смещается до 9–10 лет. В-третьих, в подгруппе детей, у которых амблиопия была диагностирована в прогностически неблагоприятном возрасте (5–7 лет) и при нистагме, эти показатели достигаются в более старшем возрасте, вплоть до достижения пубертатного периода (13–15 лет, в зависимости от пола и социальных условий).

В более старших классах эта динамика стабилизируется, годичное изменение составляет ± 0,85 %. В первой подгруппе более 50 % школь-

Таблица

Результаты дистантного скринингового исследования остроты зрения

Класс	Всего человек, *n*	1,0–0,9		0,8–0,2		Ниже 0,1	
		n	%	*n*	%	*n*	%
1	3124	985	31,53	1697	54,32	442	14,15
2	3119	1288	41,30	1360	43,60	471	15,10
3	3226	1535	47,58	1225	37,97	466	14,45
4	3097	1519	49,05	1216	39,26	362	11,69
5	3060	1573	51,41	1116	36,47	371	12,12
6	2800	1482	52,93	1037	37,04	281	10,04
7	2939	1573	53,52	1005	34,20	361	12,28
8	2531	1462	57,76	823	32,52	246	9,72
9	2328	1322	56,79	766	32,90	240	10,31
10	1441	843	58,50	502	34,84	96	6,66
11	1318	763	57,89	440	33,38	115	8,73
Итого	28983	14345	49,49	11187	38,60	3451	11,91

ников с нормальной рефракционной предрасположенностью и соблюдением щадящего режима зрительной нагрузки вблизи остаются миопически неуязвимыми. Во второй подгруппе продолжающиеся лечебные плеоптические мероприятия гарантируют относительную рефрактерность аккомодационного аппарата у более чем 70 % детей к современному зрительному переутомлению, адаптационному угасанию и компенсаторной миопизации оптической системы. Школьники третьей группы также находятся в сфере постоянного офтальмологического внимания в период второй волны потенциального развития миопии в наиболее неблагоприятном возрасте.

Группа с остротой зрения 0,8–0,2. У исследуемых с 1 по 6 класс выявлено уменьшение относительных показателей, годичный градиент составил 3,46 % (r = 0,84; p = 0,038). Гипотетическое объяснение одно – реабилитационная тенденция школьников со сниженным зрением в первой группе является зеркальным отражением повышения качества зрения в данной группе. С 7 по 11 класс эта динамика изменилась, величина показателя не изменялась (±0,16 %). Можно с уверенностью говорить о стабилизации патологических механизмов, влияющих на функциональное и начальное необратимое снижение некорригируемой остроты зрения.

Группа с остротой зрения ниже 0,1. Стоит подчеркнуть, что данное сниженное зрение возможно у пациентов как с некорригированной, так и с корригированной остротой зрения. В любом случае этот критерий говорит о далеко зашедшей офтальмологической патологии, требующей проведения специализированного обследования и лечения. У обследованных учеников с 1 по 7 класс годичные колебания этого показателя составляют ±0,84 % (r = 0,77, p = 0,041)). Патогенетическое влияние длительной ближней зрительной нагрузки на дисфункцию аккомодационного аппарата органа зрения достоверно способствует миопизации (приспособительный механизм) оптической системы школьников и значимому снижению дальней некорригированной остроты зрения. Отрицательная динамика при этом относительно стабильная. С 8 по 11 класс эти колебания увеличиваются, составляя в среднем в год ±1,22 %. Возрастает школьная (увеличение количества предметов, педагогических рекомендаций по использованию информационных интернет-ресурсов и выполнению заданий с помощью презентаций) и социальная (увеличение времени нахождения в социальных сетях, общения с использованием смартфонов, планшетов, ноутбуков и настольных компьютеров) зрительная нагрузка. Все это является очевидной причиной усугубления рефракционной миопической офтальмопатологии.

Перспективы. Несомненно, программа для дистантного скрининга зрения школьников является эффективной и оптимальной. Однако 49,5 % человек при этом нуждается в столь же быстром и точном офтальмологическом обследовании для оперативного уточнения диагноза и принятия четкого решения о назначении оптимального объема лечебных мероприятий. Поскольку основной выявленной проблемой, приводящей к снижению качества центрального зрения, является аметропия, целесообразно следующим этапом обследования выполнить исследование рефракции. И этот этап должен максимально отвечать критериям скрининга (второго уровня), быстрым, всеобъемлющим и финансово малозатратным.

Наиболее оптимальным для этих целей в настоящее время является использование переносного педиатрического авторефрактора Plusoptix в исполнении A12C (Plusoptix GmbH, Германия), зарегистрированного в Российской Федерации: оборудование является мобильным (масса 1,0 кг, габариты 260 × 140 × 140 мм), время проведения исследования не более 5 с, возможен простой и быстрый обмен информацией между двумя базами данных (ДВС и Plusoptix) через Wi-Fi. Таким образом, для проведения второго этапа скрининга зрения школьников понадобится одна мобильная единица, состоящая из любого транспортного средства, водителя и медицинского оптика (средний медицинский персонал), что не потребует привлечения квалифицированного медицинского персонала (врача-офтальмолога). При должной организации второго этапа скрининга за один день возможно проведение обследования всех учеников школы, нуждающихся в уточнении целесообразности проведения офтальмологического обследования.

Суммарный объем оптометрической информации, полученной в результате проведения двух этапов скрининга, позволит разделить диагностические потоки школьников, которым требуется проведение полного офтальмологического обследования: муниципальное поликлиническое звено или федеральные офтальмологические центры. Эта информация с учетом соблюдения всех норм сохранения персонализированных данных может оперативно поступать в медицинские информационно-аналитические центры областных министерств здравоохранения, которые были созданы в целях формирования единой информационной системы здравоохранения путем организации на базе современных инфокоммуникационных технологий системы сбора, обработки, хранения и предоставления информации, обеспечивающей

динамическую оценку состояния здоровья населения и информационную поддержку принятия решений, направленных на его улучшение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный ритм возрастающей нагрузки на зрительную систему дошкольников и подростков требует внедрения регулярных скрининговых диагностических программ для раннего выявления субклинических и клинически значимых нарушений зрительной системы. В арсенале офтальмологов должна быть доступная база данных, содержащая информацию о динамике офтальмопатологии. Объективный анализ персонализированного снижения качества зрения позволит своевременно проводить полное офтальмологическое обследование и назначать адекватный объем лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большая медицинская энциклопедия / Гл. ред. Б.В. Петровский. Издание третье. М.: Сов. энциклопедия, 1974–1988.

2. Свид. о гос. регистр. 2009613536. Программа для дистантного скринингового обследования зрения (ДВС) / *В.В. Черных, А.Л. Чернышевский, И.Л. Плисов, Н.С. Усачева*; зарегистр. 01.07.2009.

3. Федеральный закон от 29 июля 2017 г. № 242-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросам применения информационных технологий в сфере охраны здоровья» // Российская газета – Федеральный выпуск. 2017. 7338. (172).

4. *Attebo K., Mitchell P., Cumming R., Smith W., Jolly N., Sparkes R.* Prevalence and causes of amblyopia in an adult population // Ophthalmology. 1998. 105. 154–159.

5. Global burden of disease study 2013 collaborator. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global burden of disease study 2013 // Lancet. 2015. 386. (9995). 743–800.

6. *Govindan M., Mohney B.G., Diehl N.N., Burke J.P.* Incidence and types of childhood exotropia: a population-based study // Ophthalmology. 2005. 112. (1). 104–108.

7. *Greenberg A.E., Mohney B.G., Diehl N.N., Burke J.P.* Incidence and types of childhood esotropia: a population-based study // Ophthalmology. 2007. 114. (1). 170–174.

8. *Kleinstein R.N., Jones L.A., Hullett S., Kwon S., Lee R.J., Friedman N.E., Manny R.E., Mutti D.O., Yu J.A., Zadnik K.* Refractive error and ethnicity in children // Arch. Ophthalmol. 2003. 121. 1141–1147.

9. *Martinez-Thompson J.M., Diehl N.N., Holmes J.M., Mohney B.G.* Incidence, types, and lifetime risk of adult-onset strabismus // Ophthalmology. 2014. 121. (4). 877–882.

10. Multi-ethnic Pediatric Eye Disease Study Group. Prevalence of amblyopia and strabismus in African American and Hispanic children ages 6 to 72 months: the multi-ethnic pediatric eye disease study // Ophthalmology. 2008. 115. 1229–1236.

11. *Nilsson J.* The negative impact of amblyopia from a population perspective: untreated amblyopia almost doubles the lifetime risk of bilateral visual impairment // Br. J. Ophthalmol. 2007. 91. 1417–1418.

12. Oxford handbook of ophthalmology. Third edition / Eds. A. Denniston, P. Murray. Oxford: OUP Oxford, 2014. 1104 p.

13. *Preslan M.W., Novak A.* Baltimore vision screening project // Ophthalmology. 1996. 103. 105–109.

14. *Shaw D.E., Fielder A.R., Minshull C., Rosenthal A.R.* Amblyopia: factors influencing age of presentation // Lancet. 1988. 2. 207–209.

15. *Villarreal M.G., Ohlsson J., Abrahamsson M., Sjostrom A., Sjostrand J.* Myopisation: The refractive tendency in teenagers. Prevalence of myopia among young teenagers in Sweden // Acta Ophthalmol. Scand. 2000. 78. 177–181.

16. Visual Acuity measurement Standard – ICO 1984 // Ital. J. Ophthalmol. 1988. II. (I). 1–15.

17. *Webber A.L., Wood J.* Amblyopia: prevalence, natural history, functional effects and treatment // Clin. Exp. Optom. 2005. 88. (6). 365–375.

DISTANT VISION SCREENING OF SCHOOLCHILDREN AS A PRACTICAL METHOD OF APPLYING TELEMEDICINE TO OPHTHALMOLOGY: RESULTS AND PROSPECTS

Valeriy Vyacheslavovich CHERNYKH, Igor Leonidovich PLISOV, Natalya Gennadievna ANTSIFEROVA, Varvara Borisovna PUSHCHINA

The S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk branch
630096, Novosibirsk, Kolkhidskaya str., 10

Early detection of children sight disturbances allows ophthalmologists to prescribe in time preventive activities and treatment, to stop developing pathology, and to prevent complications initiation. The purpose of our study was to elaborate and introduce into practice a method of distant screening examinations of schoolchildren using telecommunication facilities. **Material and methods.** We developed an interactive computer program for distant examination of visual acuity, long or short sight shift in refraction, diagnostics of astigmatism and pathology of macular area. The results of the examination were automatically recorded in a computer database. The program was hosted on the clinic website. Examination was performed simultaneously for up to 5 schoolchildren sitting in a computer class of their schools. The examination lasted from 4 to 8 minutes for the group depending on the quantity of the invoked tests. **Results and discussion.** 28,983 schoolchildren underwent the distant screening of vision. Visual acuity of 1.0–0.9 was revealed in 14345 people (49.5 %), 0.8–0.2 – in 11187 people (38.6 %) and less than 0.1 – in 3451 people (11.9 %). The test is not specific in terms of the type of pathology, but it allows us to conclude that more than half of schoolchildren have a reduced vision. A method of distant screening vision examinations is reliable and high-performance. Database of the examination results is helpful to diagnose pathology at early stage, to track its dynamics and to inform parents in time on whether an expanded investigation and ophthalmological treatment of their children is necessary.

Key words: telemedicine, vision screening, Landolt optotypes, visual acuity, myopia, strabismus, amblyopia.

Chernykh V.V. *– doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: chernych@mntk.nsk.ru*
Plisov I.L. *– doctor of medical sciences, head of the 3rd ophthalmology department: plisov_rus@mail.ru*
Antsiferova N.G. *– candidate of medical sciences, ophthalmologist, e-mail: dr_anz@mail.ru*
Pushchina V.B. *– ophthalmologist, e-mail: calypso_shadow@rambler.ru*

УДК 616.831-005.1:613.62 DOI: 10.15372/SSMJ201803013

ОЦЕНКА НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА У БОЛЬНЫХ ИНСУЛЬТОМ, РАБОТАВШИХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВРЕДНЫХ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ФАКТОРОВ

Мария Викторовна ЯШНИКОВА

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

Городская клиническая больница № 1
630047, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

Недостаточно изучен вопрос об особенностях течения инсульта у лиц, работающих в условиях воздействия неблагоприятных профессионально-производственных факторов. Цель исследования – оценить степень тяжести течения инсульта и выраженность неврологического дефицита в остром периоде инсульта у мужчин, подвергавшихся воздействию производственных факторов физической и химической природы. Проведен анализ динамики восстановления в остром периоде инсульта у 241 больного (основная группа), подвергавшихся воздействию вредных профессионально-производственных факторов (общая вибрация, производственный шум, электромагнитное излучение (ЭМИ), токсико-пылевой фактор). Группой сравнения явились 76 пациентов с инсультом, не работавших в условиях воздействия вредных профессионально-производственных факторов. Для объективизации тяжести состояния и оценки выраженности неврологического дефицита использовалась шкала Национального института здоровья (NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale) при поступлении и в динамике острого периода инсульта на 21-й день заболевания (NIHSS 1 и NIHSS 2). Установлен исходно выраженный дефицит (шкала NIHSS 1) у больных инсультом в основной группе, в отличие от пациентов группы сравнения, наиболее выраженный у мужчин, контактировавших с ЭМИ. Достоверные различия между показателями исходного неврологического дефицита основной группы и группы сравнения обнаружены только среди молодых мужчин, имевших контакт с ЭМИ, а также с токсико-пылевым фактором. Лучшая динамика восстановления в остром периоде инсульта выявлена в группе сравнения, а в основной группе – у лиц молодого возраста, за исключением производственной группы с влиянием токсико-пылевого фактора. У больных ишемическим инсультом минимальный неврологический дефицит к исходу острого периода был в группе сравнения и среди молодых мужчин основной группы, имевших влияние общей вибрации, а также шума. Тяжелое течение геморрагического инсульта установлено в группе сравнения, а в основной группе – среди больных, имевших контакт с ЭМИ. У мужчин пожилого возраста основной группы наблюдалась максимальная выраженность неврологического дефицита, за исключением больных, имевших влияние токсико-пылевого фактора.

Ключевые слова: инсульт, мужчины, шкала NIHSS, неврологический дефицит, производственные факторы

Результаты проведенных эпидемиологических исследований свидетельствуют, что в структуре общей патологии у работников промышленных предприятий лидирующее место принадлежит заболеваниям сердечно-сосудистой системы [2]. В России заболеваемость инсультом является одной из самых высоких среди сердечно-сосудистых заболеваний [7]; последние по распространенности, тяжести течения служат одной из основных причин ограничения трудоспособности, инвалидизации, преждевременной смертности мужчин трудоспособного возраста [6]. В среднем 60 % лиц, перенесших инсульт, становятся инвалидами, причем большая их часть нуждаются в постороннем уходе [5].

Несмотря на проводимые многочисленные исследования, посвященные изучению эпидемиологии, патогенеза и течения инсульта, остается недостаточно изученным вопрос о его особенностях у лиц, работающих в условиях воздействия неблагоприятных профессионально-производственных факторов.

Цель исследования – оценка степени тяжести инсульта и выраженности неврологических изменений в остром периоде инсульта у мужчин, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности воздействию производственных факторов физической (общая вибрация, шум, электромагнитное излучение) и химической (токсико-пылевой фактор) природы.

Яшникова М.В. *– к.м.н., e-mail: yash-maria@mail.ru*

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследованы больные инсультом мужского пола, госпитализированные в неврологическое отделение Городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска. Возраст пациентов составил от 30 до 65 лет, стаж работы на момент развития инсульта – 5 лет и более. Диагноз инсульта ставился в соответствии с Международной классификацией болезней X пересмотра. Верификация диагноза определенного типа инсульта проводилась на основании данных клинического и нейровизуализационного (мультиспиральная компьютерная томография головного мозга) методов обследования. Исследование одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике при Новосибирском государственном медицинском университете (протокол заседания № 65 от 27.05.2014).

Пациенты были разделены на две группы. Основная группа (241 человек) – мужчины, подвергавшиеся на рабочем месте воздействию вредных профессионально-производственных факторов физической природы (общая вибрация, производственный шум, электромагнитное излучение) и химической природы (токсико-пылевой фактор). Группа сравнения (76 человек) – больные инсультом, не имевшие на своем рабочем месте вредных профессионально-производственных факторов.

Основную группу (241 мужчина) составили больные инсультом, работавшие в условиях воздействия следующих неблагоприятных профессионально-производственных факторов: общая вибрация – 70 человек (из них при ишемическом инсульте (ИИ) – 63 человека, при геморрагическом инсульте (ГИ) – 7 человек); производственный шум – 71 человек (ИИ – 64 человека, ГИ – 7 человек); электромагнитное излучение (ЭМИ) – 56 человек (ИИ – 50 человек, ГИ – 6 человек); токсико-пылевой фактор – 44 человека (ИИ – 39 человек, ГИ – 6 человек). Группу сравнения (76 мужчин с инсультом, не имевших на своем рабочем месте вредных профессионально-производственных факторов) составили 71 больной ИИ и 5 пациентов с ГИ. Средний возраст мужчин основной группы – 55,6 ± 1,1 года, группы сравнения – 55,1 ± 0,9 года, средний стаж работы – 31,2 ± 1,1 и 27,5 ± 1,0 года соответственно, без достоверной разницы показателей.

Для объективизации тяжести состояния и оценки выраженности неврологического дефицита использовалась шкала Национального института здоровья (NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale) при поступлении и в динамике острого периода инсульта на 21-й день (NIHSS 1 и NIHSS 2). Шкала состоит из последовательных 15 тестов, за выполнение каждого из которых ставится от 0 до 4 баллов [8]. Ее основу составляет ряд параметров, отражающих уровни нарушения основных расстройств, возникших вследствие инсульта: уровень сознания (бодрствование, ответы на вопросы, выполнение команд); зрительные функции (движения глазных яблок, поля зрения); двигательные нарушения как при полушарном, так и при стволовом инсульте; координаторные нарушения (пальце-носовая и коленно-пяточная пробы); чувствительность (учитывают нарушения по гемитипу); аутотопоанозогнозия (неглект); речевые нарушения (дизартрия, афазия).

Уровень сознания (бодрствование): 0 баллов – в сознании, 2 балла – реакция в виде двигательных рефлексов; ответы на вопросы: 0 баллов – правильные ответы, 2 балла – неправильные ответы; выполнение команд: 0 баллов – выполнение команд, 2 балла – команды больной не выполняет; движения глазных яблок: 0 баллов – полный объем движения глазных яблок, 2 балла – полный паралич взора; поля зрения: 0 баллов – норма, 3 балла – двусторонняя гемианопсия; паралич лицевой мускулатуры: 0 баллов – нет признаков, 3 балла – полный паралич; движения в левой руке, в правой руке: 0 баллов – больной удерживает вытянутую руку под углом 90° в течение 10 секунд, 4 балла – движений в руке нет; движения в левой ноге, в правой ноге: 0 баллов – больной удерживает поднятую ногу на 30° в течение 5 секунд, 4 балла – движений в ноге нет; дизартрия: 0 баллов – нет, 2 балла – выраженная дизартрия; афазия: 0 баллов – нет, 3 балла – тотальная афазия; атаксия в конечностях: 0 баллов – нет признаков, 2 балла – атаксия в двух конечностях; чувствительные расстройства: 0 баллов – норма, 2 балла – значительно снижена; синдром игнорирования (нарушение восприятия половины тела): 0 баллов – нет признаков, 2 балла – глубокое игнорирование.

Легкая степень инсульта оценивалась от 1 до 4 баллов, средняя степень – от 5 до 15 баллов, тяжелая степень – более 15 баллов.

Для определения достоверности различий независимых выборок при нормальном законе распределения использовали *t*-критерий Стьюдента для независимых наблюдений. Данные представляли в виде среднего арифметического ± ошибка среднего арифметического ($M \pm m$). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ функциональных исходов инсульта в зависимости от его клинических форм (ИИ и ГИ) в исследуемых группах. При сравнении производственных групп между собой у больных

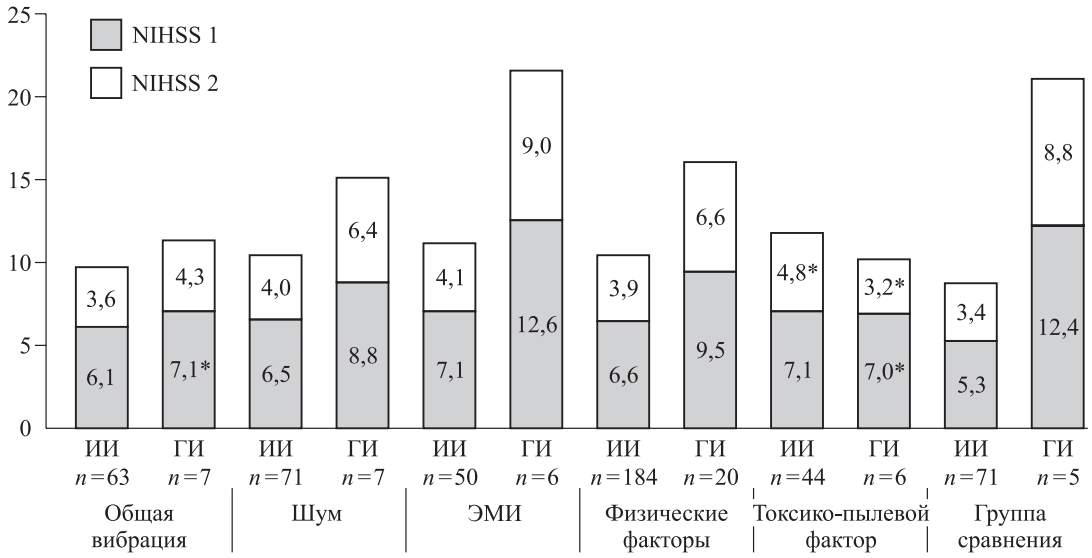

Рис. 1. *Выраженность неврологического дефицита (шкала NIHSS, баллы) в динамике лечения у больных ИИ и ГИ в зависимости от вида производственного фактора. Здесь и на рис. 2 и 3 * – отличие от величины соответствующего показателя группы сравнения статистически значимо при $p < 0,05$*

ИИ наименьший показатель шкалы NIHSS 2 (т.е. лучший функциональный исход) был установлен в подгруппе общей вибрации – 3,6 ± 0,4 балла. Наиболее выраженный неврологический дефицит по истечении острого периода инсульта был у больных ИИ, имеющих контакт с токсико-пылевым фактором (4,8 ± 1,1 балла), что превышало показатель группы сравнения (3,4 ± 0,5 балла, $p < 0,05$) и показатель группы больных ИИ, имеющих контакт с производственными факторами физической природы в целом (3,9 ± 0,2 балла, $p < 0,05$) (рис. 1). Полученные данные объясняются влиянием промышленного аэрозоля на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (активация функции тромбоцитов на контактный индуктор (коллаген) и увеличение спонтанной агрегации), а также нарушением липидного обмена и развитием атеросклероза [1, 3].

Наиболее тяжелое течение ГИ отмечено у больных, подвергавшихся воздействию ЭМИ (шкала NIHSS 1 – 12,6 ± 0,6 балла, NIHSS 2 – 9,0 ± 1,8 балла), а также в группе сравнения (12,4 ± 3,3 и 8,8 ± 2,4 балла соответственно). Достоверно наименьший показатель шкалы NIHSS 2 имели больные ГИ, подвергавшиеся воздействию токсико-пылевого фактора – 3,2 ± ± 0,6 балла ($p < 0,05$) (см. рис. 1). Многочисленные исследования подтверждают развитие раннего атеросклероза, гипертонической болезни при хроническом воздействии ЭМИ [4].

Проведен анализ функциональных исходов инсульта в изучаемых группах в зависимости от возраста и клинических форм инсульта. У больных ИИ молодого возраста (25–44 года) наблюдались следующие тенденции функционального восстановления: при влиянии ЭМИ, а также токсико-пылевого фактора показатели шкалы NIHSS 1 (10,0 ± 2,2 и 11,0 ± 1,6 баллов соответственно) превышали показатели неврологического дефицита у больных в других производственных группах, а также в группе сравнения (5,7 ± 1,8 балла, $p < 0,05$) (рис. 2). Мужчины молодого возраста, имевшие контакт с токсико-пылевым фактором, имели более высокий балл по шкале NIHSS 2 (7,5 ± 2,0 балла), что говорит о невыраженной динамике восстановления при ИИ и обусловлено формированием обширного очага инфаркта вещества головного мозга.

ГИ у молодых мужчин регистрировался только в группе сравнения и в производственных подгруппах с влиянием общей вибрации и токсико-пылевого фактора. Наиболее тяжелое течение ГИ выявлено у больных группы сравнения: шкала NIHSS 1 – 17,0 ± 0,0 балла, шкала NIHSS 2 – 12,0 ± 0,0 балла, тогда как легкое течение ГИ установлено в производственной подгруппе общей вибрации: шкала NIHSS 1 – 4,5 ± 0,5 балла, NIHSS 2 – 2,0 ± 1,0 балла (см. рис. 2).

Динамика восстановления в остром периоде инсульта у больных среднего возраста (45–59 лет) в зависимости от его клинической формы была следующая: средний показатель NIHSS 2 у больных ИИ, работавших в условиях воздействия производственных факторов физической приро-

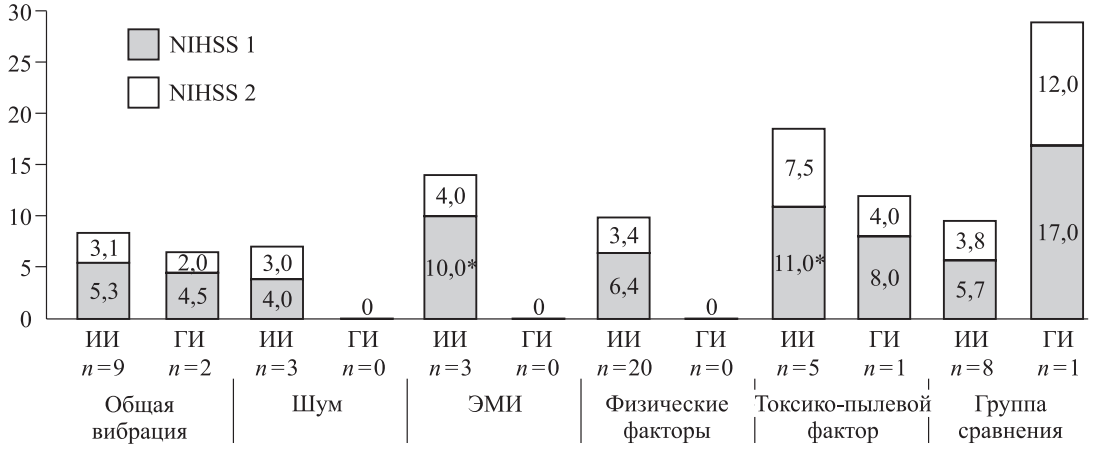

Рис. 2. *Выраженность неврологического дефицита (шкала NIHSS, баллы) в динамике лечения у больных ИИ и ГИ молодого возраста в зависимости от вида производственного фактора*

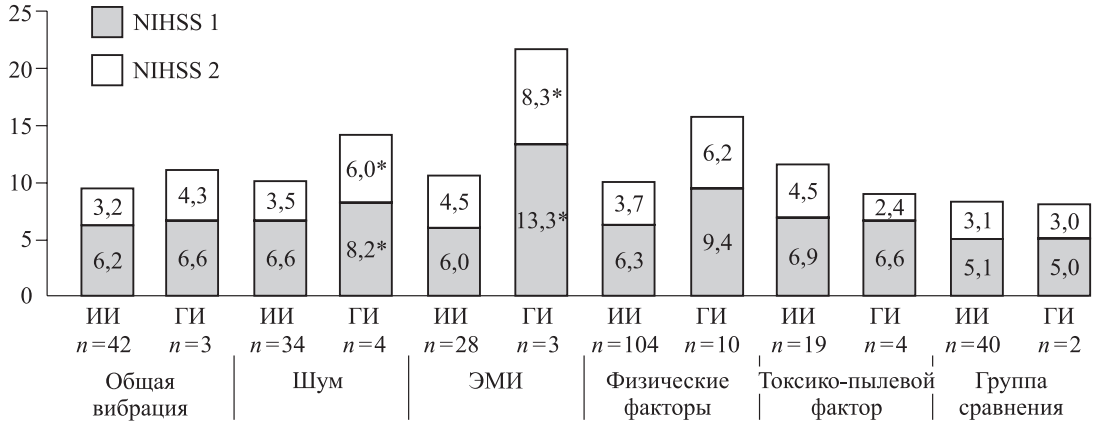

Рис. 3. *Выраженность неврологического дефицита (шкала NIHSS, баллы) в динамике лечения у больных ИИ и ГИ среднего возраста в зависимости от вида производственного фактора*

ды, составил 3,7 ± 0,4 балла, что несколько превышало показатель шкалы NIHSS 2 пациентов, подвергавшихся воздействию группы факторов токсико-химической природы (4,5 ± 0,6 балла, $p > 0,05$). Наименьшие показатели NIHSS 2 были у больных ИИ, контактировавших с общей вибрацией (3,2 ± 0,2 балла) и в группе сравнения (3,1 ± 0,3 балла) (рис. 3).

Средний показатель NIHSS 2 у больных ГИ, работающих в условиях воздействия производственных факторов физической природы, составил 6,2 ± 1,2 балла, что 2 раза больше величины аналогичного показателя лиц, контактировавших с факторами токсико-химической природы, а также группы сравнения (соответственно 3,0 ± 1,1 и 3,0 ± 0,0 балла, $p < 0,05$). Наиболее тяжелое течение ГИ установлено у мужчин, имевших влияние ЭМИ: NIHSS 1 – 13,3 ± 0,6 балла, NIHSS 2 – 8,3 ± 2,9 балла (см. рис. 3). Данные результаты свидетельствуют о выраженном васкулотропном влиянии ЭМИ по сравнению с другими производственными факторами физической природы.

Функциональный исход ИИ у больных пожилого возраста (60–74 года), работавших в условиях воздействия производственных факторов физической природы, по данным шкалы NIHSS 2 составил 4,3 ± 0,3 балла, что несколько превышало величину аналогичного показателя как в производственной подгруппе токсико-пылевого фактора, так и в группе сравнения (3,8 ± 0,4 и 3,3 ± 0,8 балла соответственно, $p > 0,05$). Среди всех производственных подгрупп больных ИИ пожилого возраста наибольший показатель шкалы NIHSS 2 был в группе с влиянием общей вибрации – 4,7 ± 0,9 балла (рис. 4).

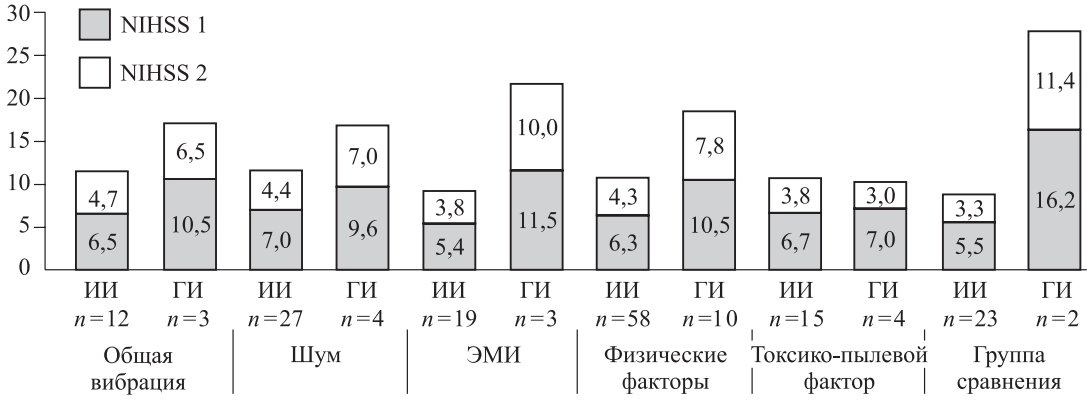

Рис. 4. *Выраженность неврологического дефицита (шкала NIHSS, баллы) в динамике лечения у больных ИИ и ГИ пожилого возраста в зависимости от вида производственного фактора*

Тяжелое течение ГИ у больных пожилого возраста выявлено в группе сравнения: шкала NIHSS 1 – 16,2 ± 4,5 балла, NIHSS 2 – 11,4 ± ± 2,0 балла, а среди производственных подгрупп – ЭМИ (шкала NIHSS 1 – 11,5 ± 0,5 балла, NIHSS 2 – 10,0 ± 2,0 балла) (см. рис. 4).

ВЫВОДЫ

1. У больных инсультом основной группы (больные инсультом, имевшие влияние вредных профессионально-производственных факторов) установлен более выраженный исходный неврологический дефицит (шкала NIHSS 1), нежели в группе сравнения. Среди лиц молодого возраста показатели шкалы NIHSS 1 у больных, имевших контакт с ЭМИ, а также с токсико-пылевым фактором, были выше, чем в группе сравнения. В среднем и пожилом возрасте достоверных различий между показателями исходного неврологического дефицита основной группы и группы сравнения не установлено.

2. Показатели неврологического дефицита в динамике острого периода инсульта свидетельствуют о более выраженном снижении уровня неврологического дефицита в группе сравнения по отношению к основной группе, где в производственной подгруппе с влиянием ЭМИ сохраняется наиболее высокий уровень неврологического дефицита.

3. Выраженность неврологического дефицита у больных ИИ к исходу острого периода была существенно меньше в группе сравнения, чем в основной группе, что свидетельствует о лучшей динамике восстановления у мужчин, не подвергавшихся воздействию на рабочем месте вредных производственных факторов.

4. По истечении острого периода ГИ зарегистрирован более выраженный неврологический дефицит в группе сравнения, а в основной группе – среди больных, имевших контакт с ЭМИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Власенко М.В., Шпагина Л.А*. Гемостазиологический скрининг у больных с пылевой патологией легких и у рабочих высокого профессионального риска // Инновационные технологии в медицине труда: сб. мат. Всерос. конф., Новосибирск, 25–26 сентября 2011 г. Новосибирск, 2011. 52–54.

2. *Максимова М.Ю., Синева Н.А., Водопьянов Н.П., Суанова Е.Т., Суслина З.А., Пирадов М.А., Домашенко М.А*. Инсульт: оценка проблемы (15 лет спустя) // Журн. неврологии и психиатрии. 2014. 114. (11). 5–13.

3. *Панев Н.И., Коротенко О.Ю., Захаренков В.В., Шавцова Г.М., Матвеева О.В., Попова Е.В., Панева Н.Я., Евсеева Н.А., Панев Р.Н.* Частота заболеваний сердечно-сосудистой системы у работников угольной промышленности // Гигиена, организация здравоохранения и профпатология: сб. мат. 51-й Междунар. конф., Новокузнецк, 8–9 июня 2016 г. Новокузнецк: Издательский центр СибГИУ, 2016. 108–112.

4. *Рубцова Н.Б., Пальцев Ю.П., Походзей Л.В*. Риск потери здоровья при воздействии электромагнитных полей // Связь заболевания с профессией с позиции доказательной медицины: сб. мат. Всерос. конф., Казань, 19–20 мая 2011 г. Казань, 2011. 123–125.

5. *Стаховская Л.В., Клочихина О.А., Богатырева М.Д.* Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009–2010) // Журн. неврологии и психиатрии. 2013. 113. (5). 4–10.

6. *Телкова И.Л.* Профессиональные особенности труда и сердечно-сосудистые заболевания: риск развития и проблемы профилактики // Сиб. мед. журн. 2012. 27. (1). 17–26.

7. *Шальнова С.А., Калинина А.М., Деев А.Д., Пустеленин А.В.* Российская экспертная система ОРСКОН – оценка риска основных неинфекционных заболеваний // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. 2013. 12. (4). 51–55.

8. *Brott T., Adams H.P., Olinger C.P., Marler J.R., Barsan W.G., Biller J., Spilker J., Holleran R., Eberle R., Hertzberg V., Rorick M., Moomaw C.J., Walker M.* Measurements of acute cerebral infarction: A clinical examination scale // Stroke. 1989. 20. (7). 864–870.

EVALUATION OF NEUROLOGICAL DEFICIENCY IN PATIENTS WITH INSULT WORKING IN THE CONDITIONS OF EXPOSURE TO HARMFUL PRODUCTION FACTORS

Maria Viktorovna YASHNIKOVA

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

City Clinical Emergency Hospital № 1
630008, Novosibirsk, Zalesskogo str., 6

The question on the peculiarities of stroke course in persons working under the influence of unfavorable occupational factors has not been sufficiently studied. The aim of the study was to assess the severity of stroke and the severity of the neurological deficit in the acute period of stroke in men exposed to occupational factors of physical and chemical nature. The analysis of the recovery dynamics in the acute period of stroke in 241 patients (the main group) exposed to harmful occupational factors (general vibration, production noise, electromagnetic radiation (EMR), toxic-dust factor) was carried out. The comparison group consisted of 76 patients with stroke who did not work under the influence of harmful occupational factors. To objectify the severity of the condition and assess the severity of the neurological deficit, the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) was used in the scores for admission and dynamics of an acute stroke on day 21 of the disease (NIHSS 1 and NIHSS 2). An initially expressed deficit (NIHSS 1 scale) in patients with stroke in the main group was established, compared with the comparison group, and the highest indicator was found in men who contacted EMR. Significant differences between the indices of the initial neurological deficit of the main group and the comparison group were revealed only among young men who had contact with EMR, as well as with the toxic-dust factor. The best dynamics of recovery in the acute period of stroke was found in the comparison group, and in the main group among young people, except for the production group with the influence of the toxic-dust factor. In patients with ischemic stroke, the minimal neurological deficit to the end of the acute period was in the comparison group, and in the main group – in young men who had the influence of general vibration, as well as noise. The severe course of hemorrhagic stroke was established in the comparison group, and in the main group – among patients who had contact with EMR. The elderly of the main group had the maximum severity of the neurological deficit, with the exception of patients who had the effect of a toxic-dust factor.

Key words: stroke, men, NIHSS, neurological deficit, factors of production.

Yashnikova M.V. *– candidate of medical sciences, e-mail: yash-maria@mail.ru*