

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА-2 ВАЗОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (VEGFR2) В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА И АМИДА БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Елена Леонидовна ЛУШНИКОВА, Марина Маратовна МЖЕЛЬСКАЯ,
Елена Владимировна КОЛДЫШЕВА, Марина Геннадьевна КЛИННИКОВА

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

Цель исследования – провести иммуногистохимический анализ экспрессии рецептора-2 вазоэндотелиального фактора роста (VEGFR2) в миокарде крыс Вистар при доксорубин-индуцированной кардиомиопатии и введении амида бетулоновой кислоты как агента с политаргетным действием в сопоставлении с выраженностью деструктивных процессов. **Материал и методы.** В работе использованы крысы-самцы линии Вистар (всего 51 животное) при изолированном и сочетанном введении внутривентриально однократной сублетальной дозы доксорубина (7 мг/кг) и курсового внутривентриального введения амида бетулоновой кислоты в дозах 50 и 100 мг/кг в сутки в течение 3 и 14 дней. Проведена иммуногистохимическая оценка экспрессии VEGFR2 в миокарде с вычислением индекса VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов, с помощью стереологического анализа определена объемная плотность кардиомиоцитов с литическими изменениями. **Результаты и их обсуждение.** Однократное введение доксорубина (в дозе 7 мг/кг) вызывало деструктивные изменения кардиомиоцитов и гемодинамические расстройства, усиливающиеся по мере увеличения срока эксперимента (14 сут). Совокупность выявленных структурно-метаболических повреждений отражала развитие регенераторно-пластической недостаточности кардиомиоцитов, составляющей основу сердечной недостаточности при антрациклиновой кардиомиопатии. Морфологические изменения миокарда при изолированном введении амида бетулоновой кислоты в значительной степени определялись используемой дозой: при его введении в дозе 100 мг/кг изменения миокарда были такими же по выраженности, как и при применении доксорубина; при сочетанном использовании доксорубина и амида бетулоновой кислоты выявлены наиболее значительные структурные повреждения миокарда. Показано, что увеличение объемной плотности литически измененных кардиомиоцитов коррелировало со значительным увеличением экспрессии VEGFR2 (коэффициент корреляции варьировал от 0,620 до 0,980).

Ключевые слова: миокард, кардиомиоциты, доксорубин, амид бетулоновой кислоты, рецептор-2 вазоэндотелиального фактора роста, иммуногистохимия.

Развитие сердечной недостаточности различного генеза всегда сопряжено с дефицитом кардиомиоцитов, поскольку пролиферативный ответ миокарда на повреждающие воздействия очень мал по сравнению со многими другими органами и тканями [2]. Важное значение имеет изучение регенераторных возможностей кардиомиоцитов и способов их стимулирования, что позволит найти подходы к терапевтическим воздействиям на миокард для сохранения его адекватной сократительной способности. В этом же ряду стоит проблема восстановления нормальной работы

сердечной мышцы после цитопатических воздействий, в частности, вызываемых лекарственными препаратами с противоопухолевой активностью [11]. Особую остроту эта проблема приобретает при использовании различных схем химиотерапии для лечения онкологических заболеваний у детей, поскольку у них могут реализовываться отдаленные кардиотоксические эффекты.

Ранее нами были изучены некоторые структурно-клеточные и молекулярно-биологические особенности ремоделирования миокарда при кардиомиопатии, индуцированной доксорубици-

Лушникова Е.Л. – д.б.н., проф., зав. лабораторией цитологии и клеточной биологии, e-mail: pathol@inbox.ru

Мжельская М.М. – аспирант, e-mail: pathol@inbox.ru

Колдышева Е.В. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов, e-mail: pathol@inbox.ru

Клиникова М.Г. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитологии и клеточной биологии, e-mail: pathol@inbox.ru

ном и циклофосфамидом. Установлено, что противоопухолевые препараты могут обуславливать развитие регенераторно-пластической недостаточности миокарда даже после однократного воздействия [3]. Необходимость купирования цитотоксических эффектов определяет поиск новых кардиопротекторных агентов, часто среди природных соединений различных классов. По данным, полученным ранее [4], к перспективным цитопротекторным соединениям относятся пентациклические тритерпеноиды лупанового ряда, которые характеризуются также противоопухолевыми и противовоспалительными эффектами [8, 15]. Предполагается, что молекулярно-биологические свойства данных химических агентов, опосредованные экспрессией биологически активных молекул, позволят стимулировать регенераторный потенциал миокарда для коррекции кардиотоксических повреждений и предотвращения развития кардиомиопатий токсического генеза.

В этой связи большое значение имеет изучение экспрессии полифункциональных цитокинов и их рецепторов, реализующих сигнальные клеточные пути, которые активируют регенераторные процессы в кардиомиоцитах. В последнее время внимание исследователей привлекает биологическая роль вазоэндотелиального фактора роста VEGF, обладающего широкой функциональной активностью [10, 12, 18]. VEGF оказывает свои клеточные эффекты, взаимодействуя с рецепторами с тирозинкиназной активностью, главным образом с VEGFR1 и VEGFR2 (KDR/Flk-1). Установлено, что экспрессия VEGFR2 наблюдается не только в эндотелиальных клетках, но и в кардиомиоцитах [7, 13, 19].

Цель работы – провести иммуногистохимический анализ экспрессии VEGFR2 в миокарде крыс Вистар при доксорубин-индуцированной кардиомиопатии и введении амида бетулоновой кислоты как агента с политаргетным действием в сопоставлении с выраженностью деструктивных процессов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы крысы-самцы линии Вистар (51 животное), которым для воспроизведения антрациклиновой кардиомиопатии однократно внутрибрюшинно вводили доксорубин гидрохлорид (ДОК) (Pharmachemie B.V., Нидерланды) в 0,9%-м растворе NaCl, в дозе 7 мг/кг. В качестве агента, снижающего негативные эффекты ДОК, использовали амид бетулоновой кислоты (АБК) ([3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота), синтезированный в Новосибирском институте органической химии

им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Водно-твиновую взвесь АБК вводили внутривенно крысам ежедневно в течение 14 дней, использовали дозировки 50 и 100 мг/кг, в качестве моноагента или в сочетании с ДОК (в этом случае назначение АБК начиналось через сутки после инъекции ДОК). Контрольным крысам однократно внутрибрюшинно вводили 0,9%-й раствор NaCl, а затем ежедневно внутривенно – воду в эквивалентном объеме. Всех животных содержали в стандартных условиях по 5–6 особей в клетке при свободном доступе к воде и пище. Проведение исследований одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины.

Крыс контрольной и опытных групп выводили из эксперимента декапитацией в первой половине дня через 3 и 14 суток после введения ДОК и/или АБК. Сердца животных фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина, после стандартной гистологической проводки заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону. На парафиновых срезах оценивали экспрессию VEGFR2 (рецептора-2 вазоэндотелиального фактора роста) в кардиомиоцитах иммуногистохимическим методом с использованием кроличьих поликлональных антител в разведении 1:50 (E3712, Spring Bioscience, США) согласно инструкции производителя. В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин, докрасивали гематоксилином. На парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, с помощью стереологического анализа оценивали относительную объемную плотность кардиомиоцитов с внутриклеточными литическими изменениями, используя этот параметр в качестве маркера регенераторно-пластической сердечной недостаточности антрациклинового генеза [1].

Исследования срезов проводили в универсальном микроскопе «Leica DM 4000B» (Leica Microsystems GmbH, Германия). С помощью компьютерной программы «Leica QWin V3» подсчитывали количество VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов и измеряли площадь сечения кардиомиоцитов с внутриклеточными литическими изменениями на тестовой площади 61171,56 мкм² при увеличении в 400 раз. Для каждого животного подсчет кардиомиоцитов проводили в 15 непересекающихся тестовых площадях. Затем вычисляли индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов и относительную объемную плотность кардиомиоцитов с внутриклеточными литическими изменениями. Статистическую обработку выполняли с использованием критерия Стьюдента, вычисляли коэффициент корреляции по Пирсону. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общетоксическое действие ДОК в дозе 7 мг/кг проявлялось в развитии асцита (наиболее выраженного через трое суток после введения ДОК), диспепсических расстройствах, изменении поведенческих реакций; одно животное погибло через 7 сут после введения препарата. По данным световой микроскопии, миокард контрольных животных имел обычное строение, отмечались единичные кардиомиоциты с контрактурными повреждениями I и II степени и кардиомиоциты с разреженной (лизированной) саркоплазмой; объемная плотность последних составляла $3,16 \pm 0,48$ %. По данным иммуногистохимического анализа, экспрессия VEGFR2 выявлялась преимущественно в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, интрамуральных артерий и в некоторых кардиомиоцитах (рисунки, а). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов в миокарде контрольных животных был невысоким и составил $13,58 \pm 1,45$ %.

Через трое суток после введения ДОК в миокарде крыс регистрировались отдельные кардиомиоциты или их небольшие группы с контрактурными повреждениями миофибрилл, преимущественно II и III степени, при этом в 5 раз возрастала объемная плотность кардиомиоцитов с литическими повреждениями саркоплазмы (до $18,85 \pm 2,18$ %; $p < 0,001$). При иммуногистохимическом исследовании установлено, что VEGFR2 экспрессировался не только в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, но и во многих кардиомиоцитах. В этот срок наблюдения индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов был в 7 раз выше, чем в контроле – $94,32 \pm 0,76$ % ($p < 0,001$).

Через 14 суток после введения ДОК деструктивные изменения в миокарде экспериментальных животных усиливались, появлялись признаки развития диффузного кардиосклероза. Манифестировали нарушения гемодинамики, которые проявлялись в венозном и капиллярном полнокровии, лимфостазе, умеренном отеке. В этот срок эксперимента объемная плотность кардиомиоцитов с литическими повреждениями увеличилась более значительно (в 6,8 раза по сравнению с контролем), чем в предыдущий срок (до $21,65 \pm 1,33$ %; $p < 0,001$), что свидетельствовало о времязависимом эффекте доксорубина. Аналогичный характер повреждений миокарда под действием антрациклиновых антибиотиков отмечен и другими исследователями, которые, в частности, показали, что их кардиотоксичность проявляется протеолизисом, апоптозом, в ряде

случаев некрозом кардиомиоцитов и последующим развитием заместительного фиброза [9, 14]. Экспрессия VEGFR2 регистрировалась во всех эндотелиоцитах и во многих кардиомиоцитах, в которых продукты реакции локализовались в основном в миофибриллярной зоне (рисунки, б). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов был увеличен в 6,7 раза (до $91,14 \pm 1,56$ %; $p < 0,001$). Следует отметить, что иммуногистохимическая реакция отсутствовала или была незначительной в так называемых «малых» кардиомиоцитах, которые, как правило, были собраны в небольшие кластеры. Между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов обнаружена сильная положительная корреляционная связь ($r = 0,958$; $p < 0,001$).

У крыс, получавших АБК в качестве моноагента как в дозе 50 мг/кг, так и в дозе 100 мг/кг, морфологическая картина повреждения миокарда была сходной. Через трое суток в миокарде отмечалась мозаичность окрашивания мышечных клеток сердца: встречались кардиомиоциты с диффузными литическими изменениями саркоплазмы, деструкцией и просветлением околоядерных зон и кардиомиоциты с контрактурными повреждениями (резко эозинофильной саркоплазмой). В некоторых кардиомиоцитах наблюдались многочисленные липидные включения; липидные капли встречались также в интерстициальных прослойках. Следует отметить доза- и времязависимые альтеративные эффекты АБК: объемная плотность кардиомиоцитов с литическими изменениями при использовании АБК в дозе 50 мг/кг была в 2,7 раза меньше ($5,32 \pm 1,04$ %), чем при использовании АБК в дозе 100 мг/кг ($14,23 \pm 0,41$ %; $p < 0,01$). Через 14 суток все отмеченные изменения миокарда усиливались: количество мышечных клеток сердца с литическими и вакуолеобразными изменениями саркоплазмы значительно возрастало. В этот срок также сохранялись различия в количественных характеристиках поврежденных кардиомиоцитов, отражающие доза-зависимый эффект: объемная плотность кардиомиоцитов с литическими изменениями при дозе АБК 50 мг/кг ($12,62 \pm 1,08$ %; $p < 0,01$) увеличилась в 3,9 раза по сравнению с контролем и в 2,4 раза по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. При дозе АБК 100 мг/кг этот показатель ($22,09 \pm 1,73$ %) вырос в 7,2 раза по сравнению с контролем и 1,6 раза по сравнению с предыдущим сроком.

Экспрессия VEGFR2 регистрировалась как в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, так и в кардиомиоцитах, в которых продукт реакции был

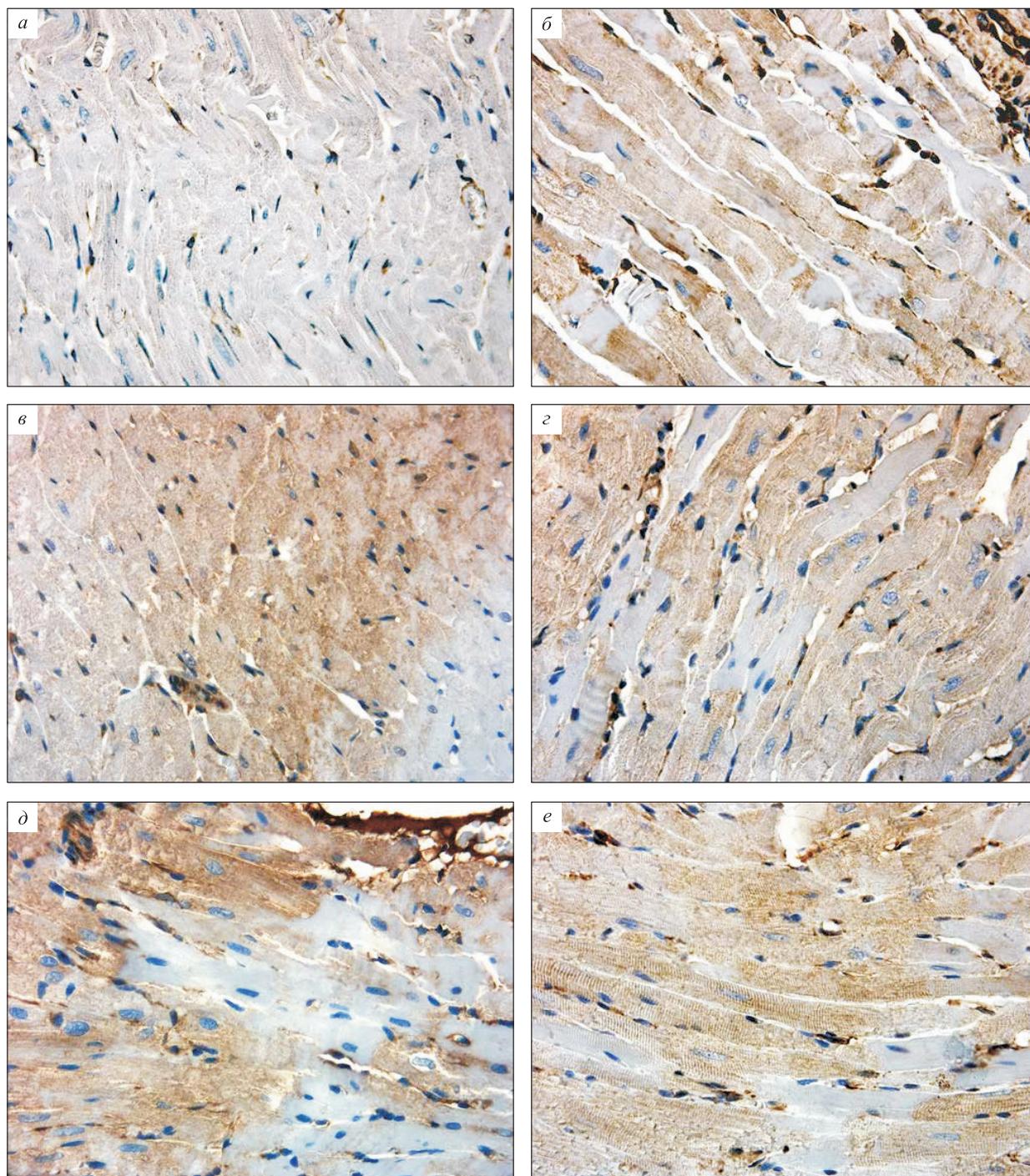


Рис. Иммуногистохимическое выявление VEGFR2 в миокарде крыс при действии доксорубицина и амида бетулоновой кислоты. Ув. 400. а – миокард интактных животных; б – неравномерность иммуногистохимической реакции через 14 суток после применения ДОК; в – экспрессия VEGFR2 в эндотелиоцитах и кардиомиоцитах после применения АБК в дозе 50 мг/кг; г – отсутствие экспрессии в «малых» кардиомиоцитах после применения АБК в дозе 100 мг/кг; д – экспрессия VEGFR2 после сочетанного применения ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг; е – экспрессия VEGFR2 после сочетанного применения ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг

представлен в виде мелкой зернистости в саркоплазме (рисунок, в). В «малых» кардиомиоцитах экспрессия VEGFR2 не выявлялась (рисунок, з). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов при введении АБК в дозе 50 мг/кг через трое суток эксперимента составил $96,36 \pm 0,21 \%$, через 14 суток – $92,86 \pm 0,58\%$, что превышало контрольный уровень соответственно в 7 и 6,8 раза ($p < 0,001$). При использовании АБК в дозе 100 мг/кг индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов через трое суток возрос в 6,9 раза ($93,14 \pm 1,19 \%$; $p < 0,01$), через 14 суток – в 6,6 раза по сравнению с контролем ($90,28 \pm 0,53 \%$; $p < 0,001$). Между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов выявлена положительная корреляционная связь: для АБК в дозе 50 мг/кг $r = 0,620$ ($p < 0,01$), для АБК в дозе 100 мг/кг $r = 0,879$ ($p < 0,01$).

Сочетанное использование ДОК и АБК обуславливало сходные с ДОК-индуцированными структурные изменения миокарда – как по характеру повреждений, так и по их выраженности. Сохранялась мозаичность окрашивания кардиомиоцитов, обусловленная разным характером их повреждений (литическими изменениями и контрактурами миофибрилл); в отдельных клетках наблюдались липидные включения, в строме – диффузная инфильтрация мононуклеарами, интерстициальный отек, геморрагии. Начиная с 14-х суток регистрировалось развитие периваскулярного и межмышечного фиброза. При сочетанном применении ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов через трое суток составляла $12,42 \pm 1,58 \%$, что было больше контроля в 3,9 раза ($p < 0,01$) и в 2,3 раза больше, чем при введении АБК в той же дозе в качестве моноагента. Через 14 суток этот показатель возрос до $21,70 \pm 0,5 \%$, что было в 6,9 раза больше, чем в контроле ($p < 0,01$), и в 1,7 раза больше, чем после введения АБК в той же дозе.

При сочетанном применении ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг характер распределения продукта иммуногистохимической реакции был таким же, как и при действии ДОК, но интенсивность окрашивания кардиомиоцитов была существенно выше (рисунок, д). Сохранялась мозаичность окрашивания кардиомиоцитов, обусловленная отсутствием иммуногистохимической реакции в «малых» кардиомиоцитах (рисунок, д). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов в миокарде крыс через трое суток был увеличен в 6,9 раза по сравнению с контролем (до $93,94 \pm 0,99 \%$; $p < 0,001$), через 14 суток – в

6,5 раза (до $88,69 \pm 2,91 \%$; $p < 0,001$). В данном случае также установлена положительная корреляционная связь между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов ($r = 0,824$; $p < 0,001$).

После сочетанного применения ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов через трое суток составляла $20,62 \pm 0,81 \%$ (больше в 6,5 раза по сравнению с контролем, $p < 0,01$), к 14-м суткам этот показатель возрастал до $24,72 \pm 1,14 \%$ (больше контроля в 7,8 раза, $p < 0,01$). Следует отметить, что использование этой дозы АБК, по сравнению с меньшей дозой, вызвало более значительное увеличение количества литически измененных кардиомиоцитов в первый срок эксперимента (в 1,7 раза), но через 14 суток при обеих дозировках выраженность литических изменений кардиомиоцитов была одинаковой.

При сочетанном применении ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг установлено, что через трое суток индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов увеличился в 6,6 раза по сравнению с контролем (до $89,31 \pm 1,32 \%$; $p < 0,001$), что было несколько меньше, чем при сочетанном введении ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг. Общая картина распределения и локализации в кардиомиоцитах продукта иммуногистохимической реакции была такой же, как и в других группах (рисунок, е). Через 14 суток этот показатель возрос до $94,55 \pm 0,86 \%$ ($p < 0,001$). Коэффициент корреляции между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов в данной группе равнялся $r = 0,980$ ($p < 0,001$). Возможно, разные по выраженности изменения индексов VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов при использовании разных доз АБК отражают особенности экспрессии белка VEGFR2 в зависимости от степени активации цитопротекторных реакций в кардиомиоцитах.

Выявленное нами значительное усиление экспрессии VEGFR2 в кардиомиоцитах при действии ДОК и АБК как при изолированном, так и при сочетанном применении может быть связано со стимуляцией цитопротекторных реакций, поскольку реализация эффектов VEGF, одного из распространенных во внеклеточном матриксе митогенов, в кардиомиоцитах опосредуется через внутриклеточный сигнальный путь PI3K/Akt, играющий центральную роль в регуляции роста, дифференцировки и выживании клеток [5, 16, 17].

Применение производных бетулоновой кислоты как агентов с политаргетным действием для возможной коррекции кардиотоксических

повреждений направлено преимущественно на уменьшение продукции свободных радикалов, усиление экспрессии эндогенных антиоксидантов и нейтрализацию действия провоспалительных цитокинов [6]. Выяснение некоторых молекулярных механизмов защитной реакции позволит добавить в этот список индукцию цитопротекторных реакций кардиомиоцитов, и экспрессия рецепторов VEGFR2 может служить маркером внутриклеточных изменений кардиомиоцитов, позволяющих сохранять клеточный гомеостаз. Показано, в частности, что активация VEGFR2 играет важную роль в морфогенетических процессах в миокарде, при этом стимуляция VEGFR-сигнальных каскадов может достигаться не только за счет VEGF, но и за счет других лигандов [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное введение ДОК (в дозе 7 мг/кг) вызывает повреждения кардиомиоцитов и гемодинамические расстройства, усиливающиеся по мере увеличения срока эксперимента (14 суток). Совокупность выявляемых структурно-метаболических повреждений представляет собой морфологическую картину регенераторно-пластической недостаточности кардиомиоцитов с последующей их диффузной элиминацией и развитием кардиофиброза, составляющими основу антрациклин-индуцированной кардиомиопатии.

АБК, примененный в дозе 50 мг/кг, не оказывал значимого цитотоксического воздействия на кардиомиоциты только в течение первых трех суток, затем отмечался его умеренный цитотоксический эффект. Применение АБК в дозе 100 мг/кг оказывало на кардиомиоциты почти такое же цитотоксическое воздействие, как и назначение ДОК (объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов возрастала примерно в 7 раз). При сочетанном применении обоих химических соединений умеренный цитопротекторный эффект АБК проявлялся только в дозе 50 мг/кг (если судить по объемной плотности литически измененных кардиомиоцитов) и только в течение первых трех суток при сравнении с действием только ДОК. При использовании ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг через 14 суток регистрировались более выраженные структурные изменения миокарда (объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов была максимальной) и наиболее выраженное увеличение экспрессии VEGFR2 в кардиомиоцитах.

Выявленное с помощью иммуногистохимического анализа значительное усиление экспрес-

сии VEGFR2 в кардиомиоцитах (в 6,5–7 раз по сравнению с контролем) при действии ДОК и АБК при различных режимах применения свидетельствует о важной роли VEGF-опосредованных сигнальных каскадов в реализации цитопротекторных реакций и организации регенераторных процессов в миокарде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Молодых Н.А., Клиникова М.Г., Молодых О.П. Ультраструктура и стереология кардиомиоцитов при развитии регенераторно-пластической недостаточности миокарда в онтогенезе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. 151. (1). 100–106.
2. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Гольдштейн Д.В. Способны ли современные клеточные технологии устранить биологические ограничения тканеспецифической регенерации миокарда? // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. (2). 63–74.
3. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г., Молодых О.П. Влияние препаратов с противопухоловой активностью – доксорубицина и циклофосфана – на структурную реорганизацию миокарда крыс и численность кардиомиоцитов // Сиб. онкол. журн. 2011. (4). 30–35.
4. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Фехтер О.Б. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы. I. Нативные производные лупана // Биоорг. химия. 2006. 32. (1). 42–55.
5. Brazil D.P., Park J., Hemmings B.A. PKB binding proteins: getting in on the Akt // Cell. 2002. 111. 293–303.
6. Cardinale D., Bacchiani G., Beggiano M., Colombo A., Cipolla C.M. Strategies to prevent and treat cardiovascular risk in cancer patients // Semin. Oncol. 2013. 40. 186–198.
7. Chiusa M., Hool S.L., Truetsch P., Djafarzadeh S., Jakob S.M., Seifriz F., Scherer S.J., Suter T.M., Zuppinger C., Zbinden S. Cancer therapy modulates VEGF signaling and viability in adult rat cardiac microvascular endothelial cells and cardiomyocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. 52. 1164–1175.
8. Cichewicz R.H., Kouzi S.A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection // Med. Res. Rev. 2004. 24. 90–114.
9. Choi J.Y., Youn H.J., Kang J.H. Transthoracic echocardiographic assessment of adriamycin-induced cardiomyopathy in rats with a 15 MHz transducer // J. Korean Soc. Echocardiogr. 2000. 8. 78–86.
10. Compernelle V., Brusselmans K., Acker T., Hoet P., Tjwa M., Beck H., Plaisance S., Dor Y., Keshet E., Lupu F., Nemery B., Dewerchin M., Van Veldhoven P.

- Plate K., Moons L., Collen D., Carmeliet P. Loss of HIF-2 alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice // *Nat. Med.* 2002. 8. 702–710.
11. Gianni L., Herman E.H., Lipshultz S.E., Minotti G., Sarvazyan N., Sawyer D.B. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside // *J. Clin. Oncol.* 2008. 26. (22). 3777–3784.
12. Feng Y., Rhodes P.G., Bhatt A.J. Dexamethasone pre-treatment protects brain against hypoxic-ischemic injury partially through up-regulation of vascular endothelial growth factor A in neonatal rats // *Neuroscience.* 2011. 179. 223–232.
13. Li F., Zhao H., Liao Y., Takashima S., Asano Y., Shintani Y., Hori M., Kitakaze M. Higher mortality in heterozygous neuropilin-1 mice after cardiac pressure overload // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. 370. 317–321.
14. Lim C.C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G.M., Helmes M., Eppenberger H.M., Suter T.M., Liao R., Sawyer D.B. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* 2004. 279. 9. 8290–8299.
15. Park S.Y., Kim H.J., Kim K.R., Lee S.K., Lee C.K., Park K.K. Betulinic acid, a bioactive pentacyclic triterpenoid, inhibits skeletal-related events induced by breast cancer bone metastases and treatment // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2014. 275. 152–162.
16. Ruixing Y., Dezhai Y., Hai W., Kai H., Xianghong W., Yuming C. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis // *Eur. J. Heart Fail.* 2007. 9. (4). 343–351.
17. Shiojima I., Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis // *Circ. Res.* 2002. 90. 1243–1250.
18. Westenbrink B.D., Ruifrok W.P., Voors A.A., Tilton R.G., van Veldhuisen D.J., Schoemaker R.G., van Gilst W.H., de Boer R.A. Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure // *Cardiovasc. Res.* 2010. 7. (1). 30–39.
19. Zentilin L., Puligadda U., Lionetti V., Zacchigna S., Collesi C., Pattarini L., Ruozi G., Camporesi S., Sinagra G., Pepe M., Recchia F.A., Giacca M. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction // *FASEB J.* 2010. 24. (5). 1467–1478.
20. Zhang X., Wang X., Zhu H., Kranias E.G., Tang Y., Peng T., Chang J., Fan G.C. Hsp20 functions as a novel cardiokine in promoting angiogenesis via activation of VEGFR2 // *PLoS One.* 2012. 7. (3). e32765.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF VASOENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2 (VEGFR2) EXPRESSION IN RAT CARDIOMYOCYTES UNDER DOXORUBICIN AND BETULONIC ACID AMIDE ADMINISTRATION

Elena Leonidovna Lushnikova, Marina Maratovna MZHEL'SKAYA,
Elena Vladimirovna KOLDYSHEVA, Marina Gennadievna KLINNIKOVA

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

The aim of the study is to perform an immunohistochemical analysis of the expression of the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in the myocardium of Wistar rats in doxorubicin-induced cardiomyopathy and the administration of betulonic acid amide as an agent with a polytarget effect in comparison with the severity of destructive processes in heart muscle cells. **Material and methods.** Wistar male rats (total 51 animals) were used in the work with isolated and combined administration of a single sublethal dose of doxorubicin (7 mg/kg) and course administration of betulonic acid amide at doses of 50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day for 3 and 14 days. Immunohistochemical evaluation of VEGFR2 expression in the myocardium was carried out with the calculation of the index of VEGFR2-positive cardiomyocytes; the volume density of cardiomyocytes with lytic changes was estimated using stereological analysis. **Results and discussion.** A single administration of doxorubicin (at a dose of 7 mg/kg) caused destructive changes in cardiomyocytes and hemodynamic disorders in myocardium, which increased with the duration of the experiment (14 days). The complex of the revealed structural and metabolic lesions reflected the development of regenerative-plastic insufficiency of cardiomyocytes, which is the basis of cardiac insufficiency in anthracycline cardiomyopathy. Morphological changes in the myocardium with isolated administration of betulonic acid amide were largely determined by the dose used. At a dose of 100 mg/kg, myocardial changes were similar in severity with doxorubicin-induced changes. Combined use of doxorubicin and betulonic acid amide revealed the most significant structural damage of the myocardium. It was shown that the increase in the volume density of lytic altered cardiomyocytes correlated with a significant increase in VEGFR2 expression (correlation coefficient varied from 0.620 to 0.980).

Key words: myocardium, cardiomyocytes, doxorubicin, betulonic acid amide, vascular endothelial growth factor receptor 2, immunohistochemistry.

*Lushnikova E.L. – doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of cytology and cell biology,
e-mail: pathol@inbox.ru*

*Mzhelskaya M.M. – post-graduate student of the Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology,
e-mail: pathol@inbox.ru*

*Koldysheva E.V. – doctor of biological sciences, leading researcher of the laboratory of molecular mechanisms
of pathological processes, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Klinnikova M.G. – doctor of biological sciences, leading researcher of the laboratory of cytology and cell biology,
e-mail: pathol@inbox.ru*

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПРОТЕАЗЫ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ ИЗ КЛЕТОК *Escherichia coli*

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

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

Каталитический домен белка ядерного включения вируса табачной мозаики TEVp используется для расщепления искусственных слитых полипептидов. Однако получение рекомбинантного фермента имеет определенные трудности из-за низкого выхода продукта и его малой растворимости в физиологических растворах. **Цель исследования** – оптимизация способов получения рекомбинантного фермента TEVp из клеток-продуцентов *Escherichia coli*. **Материал и методы.** Исследования выполняли на клетках *E. coli* штамм BL21(DE3), продуцентах рекомбинантной протеазы. Фермент синтезировался клетками в виде слитого полипептида с мальтозосвязывающим белком (MBP) с последующим саморасщеплением. Нарботку биомассы проводили при различных условиях: изменение температурного режима, времени инкубации клеток с индуктором (изопропил-β-D-1-тиогиалактопиранозид), концентрации индуктора и фазы роста культуры при добавлении индуктора. Фермент выделяли с помощью аффинной хроматографии в нативных условиях и с увеличенной концентрацией хлорида натрия, его активность проверяли на химерном рекомбинантном апополипротеине А-I человека (~33,4 кДа). **Результаты их обсуждение.** Значительное влияние на конечный выход фермента оказывала фаза роста культуры при добавлении индуктора. Оптимальными условиями получения биомассы были найдены следующие: температура инкубации с индуктором 30 °С; время инкубации 4 ч; концентрация индуктора 200 мкМ; оптическая плотность при добавлении индуктора 2,0–2,5 о.е./мл (конец экспоненциальной фазы роста культуры клеток). Концентрация хлорида натрия в буферном растворе при выделении белка составила 150 мМ. Выход фермента в данных условиях достигал 50 мг/л культуры клеток. Во всех случаях полученный фермент сохранял свою активность. **Заключение.** На выход рекомбинантного фермента из клеток-продуцентов *E. coli* шт. BL21(DE3) в экспрессирующем векторе рD441-MBP под регуляцией гена бактериофагового промотора «T5» наибольшее влияние оказывает фаза роста культуры клеток в момент запуска экспрессии гена.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, протеаза вируса табачной мозаики, *Escherichia coli*.

В генной инженерии широко используется прием слияния различных белков в виде химерных полипептидов с последующим их расщеплением. Для расщепления химеров используются специфичные и недорогие ферменты. Одним из таких ферментов является каталитический домен белка ядерного включения вируса табачной мозаики – TEVp (tobacco etch virus protease). Фермент представляет собой белок с молекулярной массой 29 кДа, полученный в рекомбинантной форме с сохранением ферментативной активности в клетках *Escherichia coli* [6]. Следует заметить, что получение рекомбинантного фермента имеет определенные трудности в виде низкого выхода продукта и его малой растворимости в физиологических

растворах. При сверхэкспрессии гена в клетках *E. coli* фермент накапливается в виде телец включения, что затрудняет его последующее извлечение из клеток в нативных условиях с сохранением каталитической активности [4, 5, 8]. В связи с этим исследователи используют различные приемы для увеличения растворимости фермента в цитоплазме клеток-продуцентов. В частности, опубликована работа, в которой авторы внесли мутации в структуру фермента с целью увеличения его накопления в цитоплазме [12]. Другим приемом является получение слитых полипептидов, в частности, известны работы по слиянию фермента с глутатион-S-трансферазой (GST), тиоредоксином [7], мальтозосвязывающим бел-

Рябченко А.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail borrelia@mail.ru

Котова М.В. – младший научный сотрудник, e-mail zerokiri@mail.ru

Князев Р.А. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail Knjazev_roman@mail.ru

Трифорова Н.В. – младший научный сотрудник, e-mail nataliya-iverdohleb@yandex.ru

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

ком (MBP) [3], SUMO (small ubiquitin-related modifier) [13] и пептидом С9R [9]. Выбор приема получения рекомбинантного фермента обуславливает и оптимизацию способов получения биомассы и методов выделения белка. В связи с этим целью нашего исследования являлась оптимизация способов получения рекомбинантной протеазы вируса табачной мозаики из клеток *E. coli*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали полученные ранее клетки-продуценты слитого полипептида MBP-TEVp *E. coli* штамм BL21 (DE3) [1]. Ген химерного полипептида MBP-TEVp находился под контролем бактериофагового промотора «T5» в плазмидном векторе pD441-MBP («ATUM», США). Для получения биомассы использовали стандартную культуральную среду LB (1 % триптона, 1 % хлорида натрия, 0,5 % дрожжевого экстракта, pH 7,0–7,4). Ночную культуру выращивали в 5 мл среды при 37 °С, на следующий день переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина. Клетки выращивали при активном перемешивании и различных температурных режимах до необходимой оптической плотности D_{600} , добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) и инкубировали 4 или 18 ч. По окончании инкубирования отбирали пробу для анализа в полиакриламидном геле (ПААГ). Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, замораживали и хранили при –20 °С для последующего выделения фермента.

Клеточные лизаты и рекомбинантные белки анализировали в 12 %-м ПААГ по Леммли. Белки окрашивали красителем «Кумасси бриллиантовый синий R-250». Расчет доли белка в смеси образцов, в том числе клеточных лизатов, производили по электрофореграммам с помощью программы GelAnalyzer версии 2010a (<http://www.gelanalyzer.com>). Для вычитания фона использовали автоматический режим «Rolling ball», нижняя граница электрофореграммы (линия фронта) при расчетах не учитывалась.

Рекомбинантные белки выделяли в нативных условиях согласно протоколу фирмы-производителя аффинного сорбента Ni-NTA-сефароза CL-6B («Quiagen», Германия). Клетки *E. coli* ресуспендировали в лизис-буфере (50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 20 мМ имидазола) и разрушали обработкой ультразвуком (УЗГ 13-0,1/22, ФГУП «ВНИИТВЧ», Россия). При необходимости в буфер добавляли хлорид натрия до 1 М. Клеточный лизат отделяли от дебриса центрифугированием 20 мин при 20000 г и использовали в

аффинной хроматографии. Дебрис экстрагировали 60 мин 8М мочевиной и осаждали 10 мин при 20000 г. Супернатант анализировали в ПААГ. Фермент из лизата клеток выделяли и очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с объемом смолы 5 мл общепринятыми методами жидкостной хроматографии, профиль элюции регистрировали на проточном УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Целевой белок элюировали лизис-буфером, дополнительно содержащим 250 мМ имидазола. От имидазола и других солей фермент очищали с помощью диализа в буфере следующего состава: 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl. На заключительном этапе к ферменту добавляли равный объем 100%-го глицерина, перемешивали и хранили при –20 °С.

В качестве субстрата для проверки ферментативной активности использовали химерный рекомбинантный полипептид аполипопротеин А-I (апо А-I) человека [2], который получали аналогично ферменту, за исключением того, что разрушение клеток и хроматографию проводили в денатурирующих условиях (с 6М мочевиной). От мочевины фермент очищали с помощью диализа в буфере, аналогичном буферу фермента.

Концентрацию белков измеряли спектрофотометрически в ЦКП «Спектротометрические измерения» на базе НИИ биохимии, г. Новосибирск (спектрофотометр Evolution 300, «Thermo Scientific», США) по методике Варбурга и Кристиана. Активность фермента проверяли в буфере следующего состава: 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитола. Температура реакции 22–24 °С, время инкубации 18 ч. Продукты гидролиза анализировали в 15%-м ПААГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в нашей лаборатории получен продукт химерного полипептида MBP, слитого с TEVp [1]. Ген TEVp был оптимизирован для экспрессии в *E. coli*, в него внесено 37 синонимических замен кодонов и сделаны четыре замены аминокислот: S219V, T17S, N68D и I77V. По литературным данным, замена S219V уменьшает неспецифическую автокаталитическую активность фермента примерно в 100 раз по сравнению с диким типом, что делает его более стабильным [6], а замены T17S, N68D и I77V приводят к большей цитоплазматической растворимости фермента при сохранении его каталитической активности [12]. Экспрессируемый полипептид MBP-TEVp содержал в своей структуре сайт расщепления для TEVp и схематически представлял следующий вид: MBP-ENLYFQ/G-NNNNNN-TEVp,

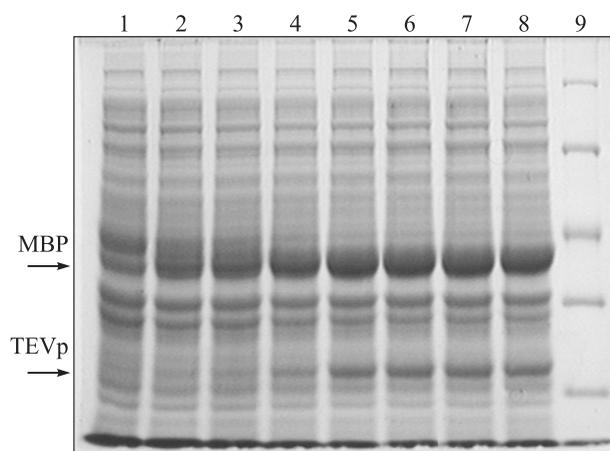


Рис. 1. Электрофорезграмма клеточных лизатов в 12 % ПААГ. Влияние концентрации ИПТГ на уровень синтеза фермента TEVr в клетках продуцента. Дорожки: 1 – лизат клеток, инкубированных без добавления индуктора (контроль); 2–8 – лизаты клеток, инкубированных с индуктором (1,2, 25, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкМ); 9 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овалбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции Bsp98I 25 кДа (ThermoFisher Scientific, США)

где ENLYFQ/G – сайт расщепления полипептида ферментом TEVr, ННННН – 6 аминокислотных остатков гистидина. Благодаря специфическому сайту TEVr полипептид в клетке расщеплялся с образованием свободного фермента, а наличие у фермента на N-конце 6 остатков гистидина позволяло выделять его из клеточного лизата с помощью металлохелатной аффинной хроматографии.

На первом этапе исследовалось влияние концентрации индуктора (ИПТГ) на уровень синтеза белка в клетках с целью выбора оптимальной концентрации и отсутствия свехрэкспрессии гена при избытке ИПТГ. Производитель плазмиды рекомендует использовать 1 мМ ИПТГ при оптической плотности культуры клеток D_{600} 0,6–0,8 оптических единиц (о.е.) в 1 мл и последующей инкубации клеток в течение 4–8 ч. Мы приняли эти условия за исходные, время инкубации культуры с индуктором составило 4 ч, температура инкубации – 37 °С. Результаты анализа клеточных лизатов представлены на рис. 1.

Результаты анализов показали, что визуально банд, соответствующий по подвижности TEVr (29,0 кДа), проявляется при концентрации ИПТГ 50 мкМ (см. рис. 1, дорожка 4, доля белка в клетке оценена как ~8,7 %). При концентрации индуктора 100 мкМ банд становится отчетливо виден (см. рис. 1, дорожка 5, доля белка в клетке оценена как ~14,5 %). При повышении concentra-

ции до уровня, рекомендуемого производителем плазмиды рD441-MBP, существенного увеличения мажорного банд не обнаружено (см. рис. 1, дорожки 6, 7 и 8, доля белка в клетке оценена как ~15,4, 15,8 и 16,3 % соответственно). Поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию индуктора 200 мкМ.

Затем мы исследовали влияние температурного режима и времени инкубации клеток с индуктором. Известно, что снижение температуры культуры клеток до 30 °С способствует увеличению цитоплазматической растворимости гетерологичных белков в *E. coli* [10]. Результаты исследования показали, что температурный режим (30 и 37 °С) и время инкубации (4 и 18 ч) существенно не изменяли конечный выход фермента. Более того, длительная инкубация при 37 °С приводила к снижению его содержания в клетках (по анализу клеточных лизатов), что существенно снижало конечный выход рекомбинантного белка (до 20 мг/л). Поэтому для дальнейших экспериментов мы использовали температуру инкубации клеток с индуктором 30 °С и время инкубации 4 ч, при этом конечная оптическая плотность культур в колбах достигала 4–5 о.е./мл.

Далее мы проанализировали влияние фазы роста клеток, описываемой оптической плотностью культуры, в момент индукции экспрессии гена полипептида MBP-TEVr на растворимость конечного фермента. За растворимость принимали содержание фермента в супернатанте после разрушения клеток ультразвуком и осаждения дебриса. Дебрис ресуспендировали в буфере с 6М мочевиной, суспензию дебриса и супернатант использовали для анализа в ПААГ. Анализ проводили на трех состояниях культуры клеток: при $D_{600} \sim 0,6$ о.е./мл (как рекомендует производитель плазмиды), при $D_{600} \sim 1,2$ о.е./мл и при $D_{600} \sim 2,4$ о.е./мл. Результаты анализа фракций дебриса и супернатанта после разрушения клеток ультразвуком представлены на рис. 2.

Оказалось, что в эксперименте с клетками, индуцированными при $D_{600} \sim 0,6$ о.е./мл, фермент практически отсутствовал во фракции супернатанта (3,3 % от суммарного белка), в то время как во фракции дебриса выявлялся мажорный банд, соответствующий по подвижности ферменту (см. рис. 2, а, дорожки 2 и 3). В клетках, индуцированных при $D_{600} \sim 1,2$ о.е./мл, фермент уже появлялся во фракции супернатанта (8,4 % от суммарного белка (см. рис. 2, б, дорожка 3). В клетках, индуцированных при $D_{600} \sim 2,4$ о.е./мл, фермент визуально отсутствовал во фракции дебриса и практически весь содержался во фракции супернатанта (14,1 % от суммарного белка; см. рис. 2, в, дорожки 2 и 3). Выход рекомби-

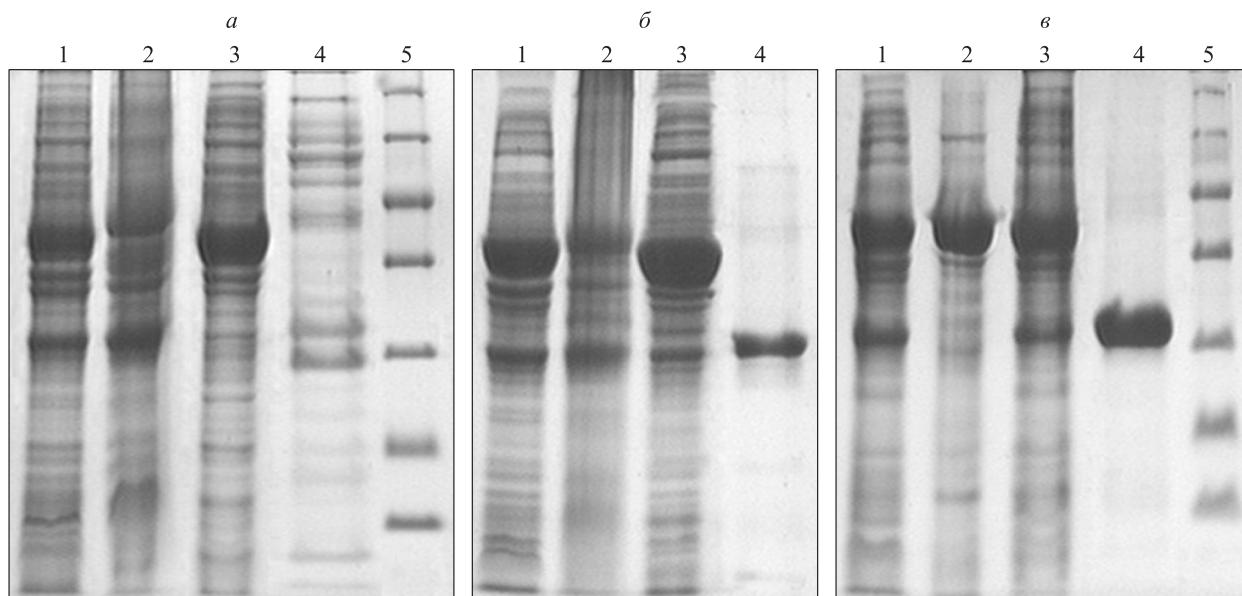


Рис. 2. Фрагменты электрофореграмм белковых фракций выделения TEVr из клеток, индуцированных при различной оптической плотности (а – D_{600} 0,6 о.е./мл; б – D_{600} 1,2 о.е./мл; в – D_{600} 2,4 о.е./мл). Дорожки: 1 – лизат клеток, инкубированных с добавлением индуктора (биомасса для выделения фермента); 2 – клеточный дебрис; 3 – супернатант (клеточный лизат); 4 – фракция, элюированная 250мМ имидазолом (целевой рекомбинантный белок TEVr); 5 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овальбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции Bsp98I 25 кДа, бета-лактоглобулин 18,4 кДа, лизоцим 14,4 кДа (ThermoFisher Scientific, США)

нантного фермента в последнем случае достигал 50 мг/л культуры клеток продуцента.

Известно, что присутствие детергентов или высоких концентраций солей увеличивает растворимость рекомбинантных белков, однако при этом их ферментативная активность может быть снижена или вовсе потеряна. В случае TEVr в литературе опубликована работа, которая показывает, что фермент сохраняет активность в присутствии невысоких концентраций додецилсульфата натрия, мочевины и гуанидина гидрохлорида [11]. Поэтому в своих экспериментах мы попробовали повысить выход фермента при его выделении из клеток путем увеличения концентрации хлорида натрия в лизирующем буфере. Оказалось, что изменение содержания NaCl в буфере от 0,15 до 1,0 М не влияло существенно на конечный выход фермента, однако при этом он сохранял свою ферментативную активность (рис. 3).

Для проверки ферментативной активности в качестве субстрата использовали полученный нами рекомбинантный химерный полипептид – аполипопротеин А-I человека, состоящий собственно из белка и слитой с ним лидерной последовательности [2]. Схематичная структура полипептида имела вид: лидер–сайт TEVr–апо А-I. Размер исходного полипептида составлял ~33,4 кДа, при его расщеплении образовывалось два фрагмента размером 27,8 и 5,6 кДа. Белки разме-

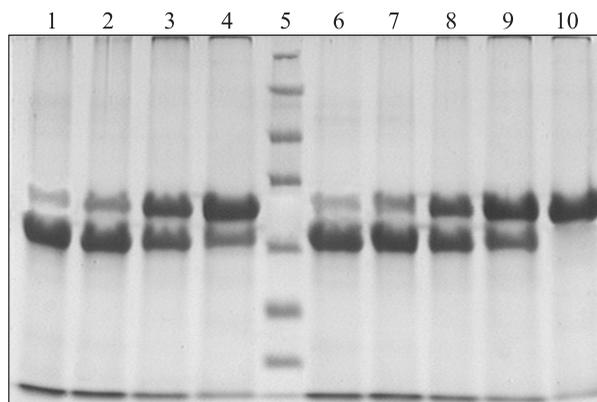


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов гидролиза химерного полипептида апо А-I в 15 %-м ПААГ. Дорожки: 1–4 – продукты гидролиза ферментом, выделенным в буфере с 1,0 М хлоридом натрия, соотношение фермента к субстрату по массе 1 : 12, 1 : 24, 1 : 48 и 1 : 96 соответственно; 5 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овальбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции Bsp98I 25 кДа, бета-лактоглобулин 18,4 кДа, лизоцим 14,4 кДа (ThermoFisher Scientific, США); 6–9 – продукты гидролиза ферментом, выделенным в буфере с 0,15М хлоридом натрия, соотношение фермента к субстрату по массе 1 : 12, 1 : 24, 1 : 48 и 1 : 96 соответственно; 10 – реакционная смесь без фермента

ром 33,4 и 27,8 кДа разделялись в 15%-м ПААГ и могли быть легко идентифицированы. Активность фермента, выделенного в присутствии 1М и 0,15М хлорида натрия, была одинаковой (см. рис. 3, дорожки 1–4 и 6–9 соответственно).

Таким образом, из всех проанализированных условий получения биомассы клеток продуцента и условий выделения фермента наибольшее влияние на выход белка оказывала фаза роста культуры клеток в момент запуска экспрессии гена, оптимальной был конец экспоненциальной фазы роста (оптическая плотность D_{600} 2,0–2,5 о.е./мл). Выход рекомбинантного фермента в нашем случае достигал 50 мг/л культуры клеток. Полученный результат согласуется с данными работы [12], в которой авторы использовали мутантный ген протеазы A26 (выход 54 мг/л), содержащий четыре аминокислотные замены (T17S, N68D, I77V и S219N). Сравнение различий результатов выхода фермента может быть не совсем корректным, поскольку в работе [12] использовали вектор с промотором T7 (в нашей работе – T5), а в качестве хозяйского штамма авторы использовали клетки Rosseta(DE3)pLysS, которые синтезируют сравнительно редкие для *E. coli* транспортные РНК.

В продолжение развития работы можно предложить стратегию увеличения уровня синтеза фермента клетками-продуцентами путем отказа от слияния гена протеазы с геном мальтозосвязывающего белка. Полученные нами результаты указывают на высокий уровень содержания МВР в клетках-продуцентах в противоположность целевой TEVp (см. рис. 1, дорожки 4–8, до 26 % от общего уровня белка). Для отказа от мальтозосвязывающего белка, на наш взгляд, привлекательнее выглядит стратегия слияния протеазы с короткими пептидами, описанная в работе [9], где добавление к С-концу 9 аминокислотных остатков аргинина не уменьшало ферментативную активность протеазы, но увеличивало ее растворимость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что на выход рекомбинантного фермента из клеток-продуцентов *E. coli* штамм BL21(DE3) в экспрессирующем векторе pD441-МВР под регуляцией гена бактериофагового промотора «Т5» наибольшее влияние оказывает состояние культуры в момент запуска экспрессии гена. Оптимальным состоянием культуры является конец экспоненциальной фазы роста (оптическая плотность D_{600} 2,0–2,5 о.е./мл), выход рекомбинантного фермента в этих условиях достигает 50 мг/л культуры клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябченко А.В., Котова М.В., Поляков Л.М. Получение продуцента протеазы вируса табачной мозаики // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. 2015. (12-5). 859–862.
2. Рябченко А.В., Котова М.В., Твердохлеб Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Получение рекомбинантного аполилопротеина А-1 человека и исследование его биологических свойств // Клеточ. технологии в биологии и медицине. 2015. (3). 155–159
3. Blommel P.G., Fox B.G. A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease // Protein Expr. Purif. 2007. 55. (1). 53–68.
4. Cabrita L.D., Gilis D., Robertson A.L., Dehouck Y., Rooman M., Bottomley S.P. Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design // Protein Sci. 2007. 16. (11). 2360–2367.
5. Fang L., Jia K.Z., Tang Y.L., Ma D.Y., Yu M., Hua Z.C. An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization // Protein Expr. Purif. 2007. 51. (1). 102–109.
6. Kapust R.B., Tozser J., Fox J.D., Anderson D.E., Cherry S., Copeland T.D., Waugh D.S. Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency // Protein Eng. 2001. 14. (12). 993–1000.
7. Kapust R.B., Waugh D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused // Protein Sci. 1999. 8. (8). 1668–1674.
8. Lucast L.J., Batey R.T., Doudna J.A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease // Biotechniques. 2001. 30. (3). 544–546.
9. Nautiyal K., Kuroda Y. A SEP tag enhances the expression, solubility and yield of recombinant TEV protease without altering its activity // N. Biotechnol. 2018. 42. 77–84.
10. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif. 2005. 41. (1). 207–234.
11. Sun C., Liang J., Shi R., Gao X., Zhang R., Hong F., Yuan Q., Wang S. Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives // Protein Expr. Purif. 2012. 82. (1). 226–231.
12. Van den Berg S., Lofdahl P., Hard T., Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution // J. Biotechnol. 2006. 121. (3). 291–298.
13. Zou Z., Cao L., Zhou P., Su Y., Sun Y., Li W. Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* // J. Biotechnol. 2008. 135. (4). 333–339.

OPTIMIZATION OF METHODS FOR PREPARATION OF RECOMBINANT TOBACCO ETCH VIRUS PROTEASE FROM *Escherichia coli* CELLS

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

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

The catalytic domain of the nuclear inclusion protein of the tobacco etch virus protease, TEVp, is used for the cleavage of artificial fusion polypeptides. However, the production of a recombinant enzyme has certain difficulties, such as a low yield of the product and its low solubility in physiological solutions. The aim of the study was to optimize the methods of producing a recombinant enzyme TEVp from *E. coli* producing cells. **Material and methods.** The studies were carried out on *E. coli* cells st. BL21 (DE3). The enzyme was synthesized by cells in the form of a fusion polypeptide with maltose-binding protein (MBP), followed by self-cleavage. Biomass production was carried out under various conditions: a change in the temperature regime, the time of incubation of cells with an inducer, the concentration of the inducer and the growth phase of the culture with the addition of an inducer. The enzyme was isolated under native conditions and with an increased concentration of sodium chloride by affinity chromatography. The enzyme activity was tested on chimeric recombinant human apolipoprotein A-I (~33.4 kDa). **Results and discussion.** The results of the study showed that a significant influence on the final yield of the enzyme was provided by the growth phase of the culture when the inducer was added. Optimal conditions for obtaining biomass were found as follows: incubation temperature with an inducer 30 °C; incubation time 4 hours; inducer concentration 200 μM; optical density with inducer addition 2.0–2.5 optical units per ml. Sodium chloride concentration in the buffer solution during isolation of the protein was 150 mM. The yield of the enzyme under these conditions reached 50 mg from a liter of cell culture. A similar yield of the enzyme was obtained using the method of auto-induction of cell culture. In all cases, enzymes retained their activity. **Conclusion.** It was shown that the greatest influence on the yield of the recombinant enzyme from *E. coli* producing cells strain BL21 (DE3) in the expression vector pD441-MBP under the regulation of the bacteriophage promoter gene «T5» was exerted by the growth phase of the cell culture at the time of gene expression launch.

Key words: recombinant protein, tobacco etch virus protease, *Escherichia coli*.

Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail borrelia@mail.ru

Kotova M.V. – junior researcher, e-mail zerokiri@mail.ru

Knyazev R.A. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail Knjazev_roman@mail.ru

Trifonova N.V. – junior researcher, e-mail nataliya-tverdohleb@yandex.ru

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

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ТЕЧЕНИЯ ЖИДКОСТИ В СИСТЕМЕ «КРОВЕНОСНЫЙ КАПИЛЛЯР – ТКАНЬ – ЛИМФАТИЧЕСКИЙ КАПИЛЛЯР»

Ирина Васильевна ШВАБ^{1,3}, Вадим Валерьевич НИМАЕВ^{2,3}

¹ Институт вычислительных технологий СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 6

² НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –
филиал ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³ Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

В статье рассматриваются вопросы взаимодействия течения жидкости в системе «кровеносный капилляр – ткань – лимфатический капилляр». Взаимовлияние компонентов, участвующих в системе, является важной основой для поддержания гомеостаза с точки зрения физиологически протекающих процессов, а изменения их структурно-функциональных свойств могут служить пусковым фактором нарушения баланса жидкости, появления и развития ряда патологических процессов, синдромов и заболеваний. В работе представлена математическая модель обменных процессов, происходящих на микроциркуляторном уровне и включающих в себя следующие взаимосвязанные процессы: течение крови в капиллярах, движение жидкости в интерстиции, обмен веществ между интерстициальной жидкостью и клетками ткани, дренаж в лимфатические капилляры. Применяется подход, позволяющий учесть взаимное влияние течения крови в кровеносном капилляре и интерстициальной жидкости в ткани. Осуществляется анализ результатов решения, исследуется влияние различных параметров микроциркуляции на интенсивность обменных процессов, выявляются наиболее значимые параметры.

Ключевые слова: микроциркуляция, математическое моделирование, лимфатический дренаж, интерстиций.

Известно, что значительное влияние на микроциркуляторный транспорт оказывает структура стенки артериальных, венозных и лимфатических капилляров, а также состояние интерстициально-межклеточного матрикса [3]. К настоящему времени многочисленные теоретические и экспериментальные исследования привели к значительному прогрессу в понимании механизмов регулирования течения крови и молекулярного обмена в микроциркуляторном русле многих органов и тканей при физиологических условиях и различных патологических отеках (например, при диабете, гипоксии, гипертонии, серповидно-клеточной анемии, воспалении, сепсисе или раке) [6, 8]. Тем не менее среди сложных микроциркуляторных процессов осталось немало неописанных или недостаточно изученных явлений. И, кроме того, исследования с использованием методов математического моделирования и численных расчетов не только помогают более качественно интерпретировать экспериментальные

данные, но и служат основой для количественного тестирования рабочих гипотез и поводом для проведения дальнейших экспериментов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В данной работе рассматривается предложенная А.Е. Krogh [7] математическая модель микроциркуляторных процессов с учетом лимфатического дренажа [4]. В модели предполагается, что все капилляры в органе одинаковы по размеру, характеристикам течения жидкости и т.д. Будем рассматривать двумерную задачу в области, состоящей из кровеносного капилляра радиуса R_k длиной D_k , окружающего капилляр интерстициального пространства $R_{\text{инт}}$ в радиальном направлении и лимфатической системы, расположенной в этом пространстве (рис. 1).

Для численной модели в расчетной области введем цилиндрические координаты (r, θ, z) : r – радиальная координата, z – координата вдоль

Шваб И.В. – к.т.н., научный сотрудник, доцент кафедры математики, e-mail: Schwab_irina@mail.ru
Нимаев В.В. – д.м.н., зав. лабораторией оперативной лимфологии и лимфодетоксикации, профессор кафедры хирургических болезней Института психологии и медицины, e-mail: nimaev@gmail.com

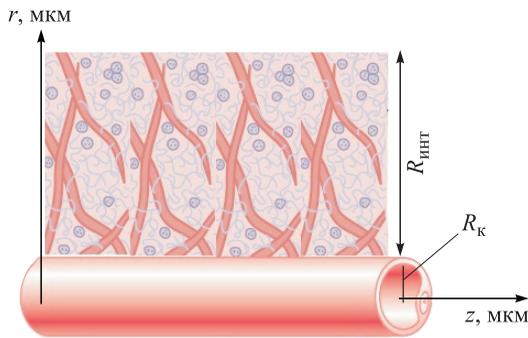


Рис. 1. Модель представительного капилляра: R_k – радиус капилляра, D_k – длина капилляра, $R_{\text{инт}}$ – размер интерстиции

капилляра. В силу осевой симметрии задачи величины не зависят от угла поворота θ . При этом считается, что с левой стороны от капилляра располагается артериола, питающая капилляр, и с правой – венула. Начало координат располагается в центре капилляра на его артериальном конце. Давление и скорость течения жидкости в капилляре и ткани, а также зависящие от них величины рассматриваются как функции переменных (r, z) :

$$\begin{cases} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \cdot k \frac{\partial v_x}{\partial r} \left| \frac{\partial v_x}{\partial r} \right|^{n-1} \right) = \frac{\partial P}{\partial z} + J_L; \\ \frac{\partial P}{\partial r} = 0 \Rightarrow P = P(z), 0 < z < D_k, 0 < r < R_k; \\ \frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial v_r}{\partial r} + \frac{v_r}{r} = 0. \end{cases} \quad (1)$$

Здесь $k = C_1 e^{C_2 H + C_4 \frac{\chi}{H^2}}$; $n = 1 - C_3 H$ – параметры модели [1, 2, 6, 12]: H – показатель гематокрита, характеризующий содержание в крови форменных элементов (в норме 35–50 %), χ – общее количество протеинов за исключением альбумина (в норме 1,5–4,0 г на 100 мл). Коэффициенты C_i , $i = 1, 2, 3, 4$ взяты из литературы [2, 12]: $C_1 = 0,00797$, $C_2 = 0,06080$, $C_3 = 0,00499$, $C_4 = 0,06080$ 100 мл/г.

Граничные условия для системы (1) имеют вид

$$P(r, 0) = P_{\text{арт}}; \quad (2)$$

$$P(r, D_k) = P_{\text{вен}}; \quad (3)$$

на стенке кровеносного капилляра $r = R_k$:

$$v_z(R_k, z) = 0; \quad (4)$$

$$v_r = L_p ((P - \vec{P}) - P_0). \quad (5)$$

Здесь v_z – аксиальная, v_r – радиальная компоненты вектора скорости жидкости, $\vec{v} = \vec{v}(r, z)$; $\vec{P} = \vec{P}(x, r)$ – давление жидкости в порах матри-

са интерстициального пространства; L_p – гидравлическая проницаемость капиллярной стенки; P_0 – результирующее онкотическое давление.

На основе данных о функционировании начальной лимфатической системы в настоящей работе объемный поток жидкости, абсорбируемый в лимфатическую систему, пропорционален изменению давления в ткани J_L [9]:

$$J_L(r, z) = C_1 (r - R_k)^{C_2} e^{C_3 (r - R_k)} P(r, z). \quad (6)$$

В математической модели учитывается, что на микроциркуляторные процессы влияют следующие параметры: размеры капилляра (радиус и длина), гидростатическое давление в кровеносном капилляре на артериальном и венозном концах, результирующее онкотическое давление, вязкость крови, гидравлическая проницаемость стенки кровеносного капилляра.

В данной системе происходят следующие процессы: течение крови в кровеносном капилляре; фильтрация и реабсорбция жидкости через стенку кровеносного капилляра в окружающую ткань и обратно; движение жидкости в ткани; дренаж жидкости из ткани в лимфатическую систему. В норме онкотическое давление в капилляре и ткани считается постоянным. Течение жидкости через стенку кровеносного капилляра описывается законом транскапиллярного обмена Старлинга. Между объемами жидкости, фильтрующейся в артериальном конце и реабсорбирующейся в венозном конце, в норме существует динамическое равновесие (фильтрационно-реабсорбционное). Жидкость попадает в межклеточное пространство посредством фильтрации и диффузии из кровеносных капилляров. Она содержит почти все те же вещества, что и плазма крови. Исключением являются белки, молекулы которых слишком велики для того, чтобы проходить через поры эндотелия капилляров, поэтому концентрация белков в интерстициальной жидкости ничтожно мала. Примерно 10 % объема жидкости, поступающего в интерстициальное пространство, остается там и затем возвращается назад в сосуды с помощью лимфатической системы. При увеличении проницаемости сосудистой (капиллярной) стенки отмечается изменение концентрации белка в интерстициальном пространстве, а следовательно, и онкотического давления в ткани. В случае накопления воды в интерстиции возникает отек, и жидкость начинает интенсивнее дренироваться в инициальные лимфатические капилляры [10].

При выводе модели предполагалось, что давление в капилляре линейно изменяется по его длине и не зависит от изменения давления интерстициальной жидкости в ткани, окружающей

Используемые параметры микроциркуляторного русла [3]

Параметр	Значение
Эффективная влажпроводимость ткани, мкм ² /(с × мм рт. ст.)	1,5 × 10 ²
Модуль упругости тканевого матрикса, мм рт. ст.	110
Проницаемость стенки кровеносного капилляра, мкм/(с × мм рт. ст.)	3,6 × 10 ⁻³
Пористость ткани	0,2
Радиус капилляра, мкм	10
Длина капилляра, мкм	600
Радиус интерстиционного пространства, мкм	200
Максимальное давление в кровеносном капилляре на артериальном конце, мм рт. ст.	32,5
Давление в кровеносном капилляре на венозном конце, мм рт. ст.	14
Онкотическое давление, мм рт. ст.	23

капилляр [4]. Но, как показывают экспериментальные исследования, в общем случае обменные процессы зависят друг от друга, являются нелинейными и оказывают влияние на изменение давления как в ткани, так и в самом капилляре [5, 11]. Следовательно, для адекватного моделирования микроциркуляторных процессов необходимо учитывать это взаимное влияние. Для этого в численных расчетах целесообразно построить итерационный процесс по следующему алгоритму [3]:

1. Вначале предполагаем, что давление в ткани постоянно. Далее находим распределение давления в кровеносном капилляре по длине капилляра вблизи его стенки, решая систему (1)–(5).

2. Найденное значение подставляем в граничное условие (5) в качестве функции $P(r, z)$. Далее решаем заново задачу течения жидкости в ткани с новыми краевыми условиями и находим новое распределение давления в ткани $\vec{P}(r, x)$, в том числе в зависимости от повышения сосудистой проницаемости.

3. Определяем разность между распределением давления в капилляре на шагах 1 и 2. Если максимальное значение этой разности больше некоторой заданной погрешности, полученное распределение давления в ткани выступает в качестве следующего приближения при решении задачи течения жидкости в кровеносном капилляре. Шаги 2–3 повторяются, пока не будет достигнута заданная точность решения.

Для приведенного выше алгоритма учета взаимосвязанных распределений давления в кровеносном капилляре и окружающей ткани была исследована сходимость и зависимость от выбора начального приближения для давления в ткани. Проведенные численные исследования показывают, что сходимость и окончательное распределение давления не зависят от выбора начального значения давления в ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При значениях параметров, приведенных в таблице [3], распределение давления в кровеносном капилляре отличается от линейного закона крайне незначительно (рис. 2, а). При увеличении проницаемости стенки кровеносного капилляра зоны фильтрации и реабсорбции смещаются к концам капилляра, вследствие чего распределение давления вблизи стенки капилляра начинает носить нелинейный характер, как и давление в самом капилляре (рис. 2, б). При увеличении проницаемости стенки капилляра расчеты по алгоритму 1–3 показывают существенное увеличение нелинейности изменения давления как в ткани,

так и в самом капилляре. На рис. 3 приведено распределение давления $P(r, z)$ в радиальном направлении на артериальном и венозном концах капилляра. При продвижении жидкости в радиальном направлении по мере удаления от стенки кровеносного капилляра давление на его артериальном конце постепенно уменьшается (рис. 3, а), а на венозном – увеличивается (рис. 3, б). В продольном направлении значение давления снижается от значения на артериальном конце до значения на венозном конце, что соответствует изменению давления в капилляре. Но в отличие от капилляра перепад давления в ткани не такой значительный, так как через поры в стенке капилляра проникает только часть жидкости. Объемная

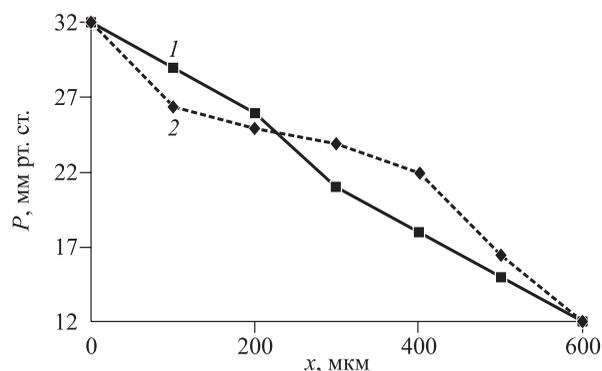


Рис. 2. Распределение давления в кровеносном капилляре при значениях параметров из таблицы (кривая 1) и при увеличенной проницаемости стенки капилляра $L_p = 3,6 \times 10^{-2}$ (кривая 2)

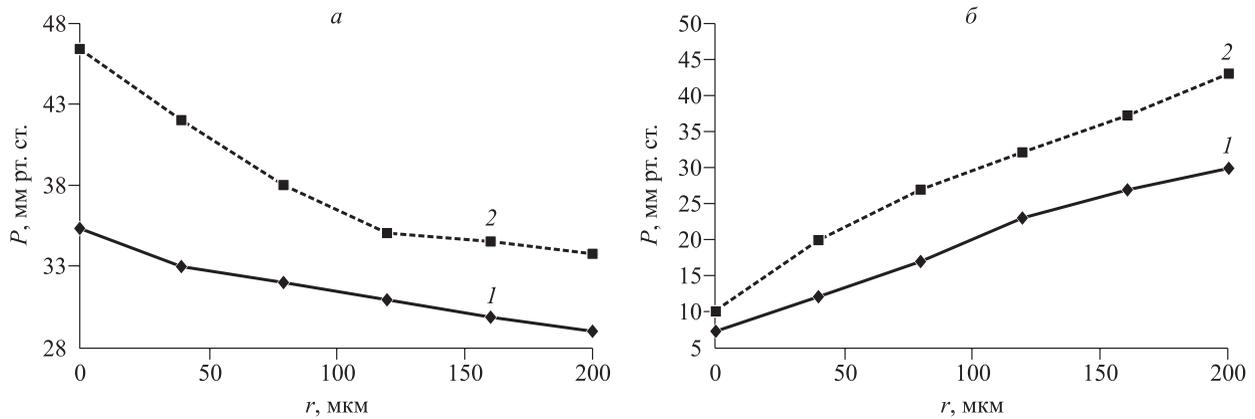


Рис. 3. Распределение давления интерстициальной жидкости в ткани при значениях параметров из таблицы (кривая 1) и при увеличенной проницаемости стенки капилляра $L_p = 3,6 \times 10^{-2}$ (кривая 2) на артериальном (а) и венозном (б) концах капилляра

скорость течения, характеризующая количество жидкости, фильтрующей из капилляра в ткань за единицу времени, рассчитывается по формуле [10]:

$$Q = 2\pi R_k \int_0^{D_k/2} v(y, R_k) dy.$$

На рис. 4 можно увидеть, что объемная скорость фильтрации жидкости через стенку кровеносного капилляра сначала быстро растет с увеличением радиуса интерстициального пространства, а затем практически выходит на стационарное значение. Расчеты показывают, что на повышение объемной скорости фильтрации жидкости из капилляра влияет увеличение артериального или уменьшение венозного давления, увеличение радиуса капилляра и проницаемости стенки капилляра. При этом изменение на поряд-

док проницаемости стенки сопровождается изменением на порядок объемной скорости фильтрации жидкости. К увеличению объемной скорости фильтрации жидкости приводит также расширение зоны активного лимфатического дренажа и увеличение максимального значения функции J_L .

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что диффузионные процессы являются важнейшей частью транскапиллярного обмена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, важным усовершенствованием представленной модели является учет диффузионного механизма обмена веществ, что особенно важно при расчетах зависимости объемной скорости фильтрации от различных параметров микроциркуляции. Показано, что значительное влияние на величину объемной скорости фильтрации оказывает гидравлическая проницаемость стенки кровеносного капилляра, давление в капилляре на венозном конце и увеличение интенсивности лимфатического дренажа. Установлено, что при значительном увеличении проницаемости стенки кровеносного капилляра наблюдается значительная нелинейность давления. В этом случае наиболее целесообразным является совместное решение задач течения жидкости в кровеносном капилляре и в окружающей ткани с учетом лимфатического дренажа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панченков И.Я., Ярема Н.Н., Сильманович Р.Т. Лимфостимуляция. М.: Медицина, 1986.
2. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. М.: Медицина, 1975. 455 с.

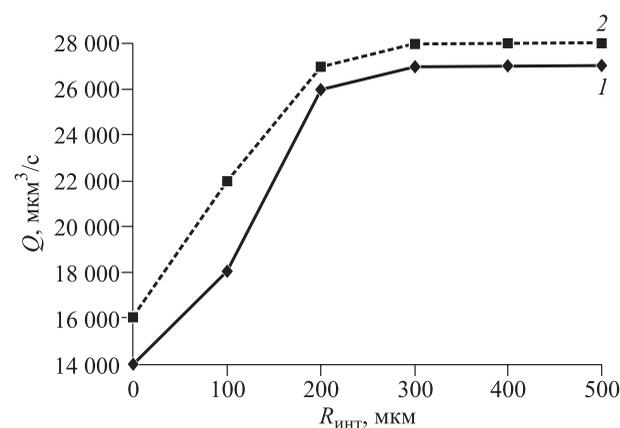


Рис. 4. Зависимость объемной скорости фильтрации от изменения радиального размера интерстиция при значениях параметров из таблицы (кривая 1) и при увеличенной проницаемости стенки капилляра $L_p = 6,8 \times 10^{-3}$ (кривая 2)

3. Шабрыкина Н.С. Математическое моделирование микроциркуляторных процессов: нестационарная модель // Рос. журн. биомеханики. 2006. 10. (4). 70–83.
4. Шваб И.В., Нимаев В.В. Математическая модель микроциркуляторных процессов с учетом лимфатического дренажа // Марчуковские научные чтения-2017: тр. междунар. конф., Новосибирск, 25 июня – 14 июля 2017 г. Новосибирск: Омега-принт, 2017. 990–996
5. Gashev A.A., Zawieja D.C. Hydrodynamic regulation of lymphatic transport and the impact of aging // Pathophysiology. 2010. 17. 277–287.
6. Hantos Z., Lazar Z. The flow of fluid through the wall of capillary systems studied by a mathematical model // Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 1970. 38. (4). 265–280.
7. Krogh A.E., Landis E.M., Turner A.H. The movement of fluid through the human capillary wall in relation to venous pressure and to the colloid osmotic pressure of the blood // J. Clin. Invest. 1932. 11. 63–95.
8. Rani H.P., Sheu T.W.H., Chang T.M., Liang P.C. Numerical investigation of non-Newtonian microcirculatory blood flow in hepatic lobule // J. Biomechanics. 2006. 39. 551–563.
9. Shvab I.V., Nimaev V.V. Mathematical modeling of microcirculatory processes // SIBIRCON: proc. Int. conf., Novosibirsk, September 18–22. Novosibirsk, 2017. 531–533.
10. Textbook of lymphology / Eds. M. Foeldi, E. Foeldi, S. Kubik. Munchen: Urban & Fischer, 2003. 689 p.
11. Yao W., Li Y. Analytic solutions of the interstitial fluid flow models // J. Hydrodynamics. 2013. 25. (5). 683–694
12. Zweifach, B. Quantitative studies of microcirculatory structure and function (in two parts) // Circ. Res. 1974. 34. 843–866.

ON THE INTERACTION OF LIQUID FLOW IN THE SYSTEM «BLOOD CAPILLARY – TISSUE – LYMPHATIC CAPILLARY»

Irina Vasil'yevna SHVAB^{1,3}, Vadim Valer'yevich NIMAEV^{2,3}

¹ Institute of Computational Technologies of SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentiev av., 6

² Research Institute for Clinical and Experimental Lymphology –
Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

³ Novosibirsk State University
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 6

The article deals with the interaction of fluid flow in the «blood capillary – tissue – lymphatic capillary» system. On the one hand, the mutual influence of the components involved in the system is an important basis for maintaining homeostasis from the point of view of physiologically occurring processes, and changes in their structural and functional properties can be a triggering factor for impaired fluid balance, the appearance and development of a number of pathological processes, syndromes and diseases. The paper presents a mathematical model of metabolic processes that occur at the microcirculatory level and include the following interrelated processes: blood flow in the capillaries, fluid movement in the interstitium, metabolism between interstitial fluid and tissue cells, drainage into lymphatic capillaries. An approach is used to take into account the mutual influence of blood flow in the blood capillary and interstitial fluid in the tissue. The analysis of the solution results is carried out, the effect of various microcirculation parameters on the intensity of metabolic processes is investigated, and the most significant parameters are identified.

Key words: microcirculation, mathematical modeling, lymphatic drainage, interstitium.

Shvab I.V. – candidate of technical sciences, researcher, docent of the chair for mathematics,
e-mail: Schwab_irina@mail.ru

Nimaev V.V. – doctor of medical sciences, head of laboratory for surgical lymphology and lymphodetoxication,
professor of the chair for surgery pathology, e-mail: nimaev@gmail.com

ОСОБЕННОСТИ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ПЕЧЕНИ И СТРУКТУРЫ МЕЗЕНТЕРИАЛЬНОГО ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА У КРЫС ПОДРОСТКОВОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ СВИНЦОМ

Павел Александрович ЕЛЯСИН¹, Светлана Васильевна ЗАЛАВИНА¹,
Александр Николаевич МАШАК¹, Анатолий Викторович СКАЛЬНЫЙ²

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

² Центр биотической медицины
105082 г. Москва, Переведеновский пер., 13 стр. 8

Цель исследования – выявить структурные перестройки мезентериального лимфатического узла подростков самцов крыс с учетом изменений в минеральном обмене на фоне хронической интоксикации ацетатом свинца. **Материал и методы.** Эксперимент проведен на 4-недельных самцах крыс Wistar подросткового возраста (10 крыс), получавших *per os* раствор ацетата свинца в суточной дозе 10 мг/кг массы тела в течение 21 суток, животные контрольной группы (10 крыс) получали корм без тяжелого металла. Исследовали мезентериальный лимфатический узел, печень (окраска гематоксилином и эозином, азуром II и эозином) с помощью световой микроскопии и морфометрии; содержание биоэлементов в печени определяли с помощью атомной эмиссионной спектрометрии с индукционно-связанной аргоновой плазмой. При статистической обработке результатов исследования применяли непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни, критерий Пирсона χ^2 . **Результаты и их обсуждение.** Лимфатический узел перестраивается из промежуточного (в контроле) во фрагментированный функциональный тип, способствующий активному току лимфы через синусную систему лимфоидного органа. Снижается доля Т-зависимых функциональных зон лимфоузла. В 100 % наблюдений выявлено повышение концентрации свинца в тканях печени. В 60 % образцов печени обнаружено снижение содержания калия и цинка. В 40 % случаев произошло нарушение обмена марганца, в 20 % регистрируются отклонения в количестве кальция, йода, фосфора и кремния. Таким образом, хроническое воздействие подострых доз ацетата свинца на организм подростков самцов крыс приводит к выраженным сдвигам в обмене биоэлементов. На фоне измененных биохимических процессов формируются структурно-функциональные перестройки в мезентериальном лимфатическом узле: депрессия иммунной обработки лимфы, активизация транспортной функции органа.

Ключевые слова: мезентериальный лимфатический узел, ацетат свинца, печень, микроэлементы, интоксикация.

Актуальность проблемы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами объясняется, прежде всего, широким спектром действия этих поллютантов на организм человека, где они оказывают токсическое, аллергическое, канцерогенное, гонадотропное и эмбриотоксическое действие [13]. На сегодняшний день возродился интерес к роли микроэлементов в патогенезе многих соматических и эндемических заболеваний [1]. Загрязнение окружающей среды токсичными металлами в первую очередь сказывается на детях, так как интенсивное накопление токсичных элементов происходит еще через плаценту [10]. Это приводит к формированию патологии детей, развитию множества болезней, зачастую с хронизацией патологического процесса, задержке умственного и физического развития.

Соединения тяжелых металлов поступают в организм преимущественно через желудочно-кишечный тракт с пищевыми продуктами и водой, при этом раньше других систем на их вторжение реагируют иммунная, эндокринная и нервная системы [6]. Лимфатические узлы занимают особое место среди лимфоидных органов, одно-

соединения тяжелых металлов поступают в организм преимущественно через желудочно-кишечный тракт с пищевыми продуктами и водой, при этом раньше других систем на их вторжение реагируют иммунная, эндокринная и нервная системы [6]. Лимфатические узлы занимают особое место среди лимфоидных органов, одно-

Елясин П.А. – к.м.н., доцент кафедры анатомии человека, elyasin@ngs.ru

Залавина С.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, e-mail: zalavinasv@mail.ru

Машак А.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой анатомии человека, e-mail: man4949@mail.ru

Скальный А.В. – д.м.н., проф., директор, skalny2@microelements.ru

временно осуществляя дренаж, детоксикацию в интерстиции и выполняя иммунную функцию [4]. В соответствии с классической концепцией Ю.И. Бородина о том, что морфофункциональный статус региона неразрывно связан с клеточным составом и структурной организацией регионарных лимфоузлов, определяющих местную иммунную функцию, необходимо понимать, что выраженность всех функциональных процессов в лимфатическом узле подчиняется возрастным перестройкам [9]. При этом возрастные особенности структуры лимфатического узла отражают как в зеркале возрастные особенности региона в целом.

Необходимо отметить, что до настоящего времени отсутствуют данные комплексного изучения микроэлементного баланса в сопоставлении с функциональной морфологией лимфоузлов на этапах онтогенеза [14]. Без представления о регулирующей роли микро- и макроэлементов во взаимосвязи с лимфатической системой органа нельзя понять механизмы и обосновать возможности коррекции нарушенных функций и структурных изменений.

Цель исследования – выявить структурные перестройки мезентериального лимфатического узла самцов-подростков крыс с учетом изменений в минеральном обмене на фоне хронической интоксикации ацетатом свинца.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы проводилась с соблюдением рекомендаций о работе с лабораторными животными, принципами биоэтики и правилами лабораторной практики (GLP, European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/ЕЕС), изложенных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003.

Эксперимент проведен на 4-недельных самцах крыс Wistar (20 крыс). Данный возраст экспериментальных животных, исходя из существующего соотношения продолжительности жизни крыс и человека [2], соответствует подростковому возрасту онтогенеза человека. Животные основной группы (10 крыс) содержались в стандартных условиях вивария, *per os* получали раствор ацетата свинца ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) в суточной дозе 10 мг/кг массы тела в течение 21 суток. Контрольная группа (10 крыс) получала аналогичный корм без тяжелого металла. Объектом исследования явился мезентериальный лимфатический узел, поскольку он является регионарным для тонкой

кишки, где происходит основной объем всасывания ацетата свинца.

Структуру лимфатического узла исследовали методом точечной морфометрии на светооптическом уровне, который является классическим и не утратил своего значения из-за доступности, простоты и высокой информативности. Изучение структуры мезентериального лимфатического узла выполнялось в соответствии с требованиями к их гистологическому исследованию на фоне изменений, возникших под влиянием каких-либо факторов [12]. Лимфоузлы фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Проводку и заливку материала в парафин с последующим приготовлением гистологических срезов осуществляли по классической схеме. Гистологические срезы изготавливали по длинной оси органа и окрашивали гематоксилином и эозином, азуром II и эозином. Морфометрический анализ функциональных зон лимфоузла с определением их относительной площади осуществляли с помощью морфометрической сетки Стефанова [5], которую накладывали на срез лимфоузла на срезах максимальной площади. Цитоархитектонику структурно-функциональных зон проводили при увеличении микроскопа в 32 раза. Для определения содержания биоэлементов в печени крыс проводили аналитические исследования методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе NexION 300D (Perkin Elmer Inc., США) после калибровки с использованием стандартных наборов Universal Data Acquisition Standards (Perkin Elmer Inc.). На протяжении всех анализов проведена внутренняя онлайн-стандартизация с использованием стандартных растворов иттрия и родия (Perkin Elmer Inc.). Содержание микроэлементов в пробах выражали в микрограммах на грамм сухой массы. Выбор печени обусловлен тем, что она является одним из основных органов-депо для многих биоэлементов, обеспечивает процессы детоксикации и поддержания гомеостаза. Определяли содержание I, Cr, Ca, K, Mn, P, Pb, Zn в 7–8 образцах печени в каждой группе.

При статистической обработке результатов исследования для сравнения количественных признаков между двумя независимыми группами применяли непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни для малых групп, для сравнения соотношения частот встречаемости признаков в независимых группах – критерий Пирсона χ^2 . Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего. Критическое значение уровня статистической значимости (p) при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Регионарные лимфатические узлы располагаются на пути оттока лимфы и обладают в каждом регионе специфическими особенностями структурной организации. Регулируя клеточный и химический состав, иммунные процессы и интенсивность лимфодинамики, лимфоузлы обеспечивают гомеостаз своего региона.

В настоящей работе исследуются регионарные по отношению к тонкой кишке мезентериальные лимфатические узлы, корково-мозговой индекс которых в контрольной группе составил $1,063 \pm 0,015$ (отношение коркового вещества к мозговому), что позволило отнести их к промежуточному функциональному типу в соответствии с классификацией Ю.И. Бородина. При этом площадь коркового вещества составила от общей площади лимфоузла $48,5 \pm 0,32 \%$, на мозговое вещество приходится $45,65 \pm 0,33 \%$. В корковом веществе преобладает площадь паракортикальной зоны – $37,24 \pm 0,32 \%$. В мозговом веществе доля мозговых синусов больше площади мозговых тяжей более чем в 3 раза. Полученные сведения о морфофункциональной организации мезентериального лимфатического узла позволяют предположить уравнивание в нем лимфопоэтической и дренажной функций. При этом площадь Т-зависимой зоны составляет $40,97 \pm 0,92 \%$, а В-зависимых структур – $18,28 \pm 1,97 \%$, что свидетельствует о некотором преобладании Т-клеточных механизмов иммунного гомеостаза над В-зависимыми гуморальными.

После хронического воздействия ацетатом свинца в лимфатическом узле крыс подросткового возраста происходят значительные морфофункциональные изменения. Происходит двукратное увеличение относительной площади соединительнотканной капсулы. Суммарная площадь В-зависимых структур остается на уровне контроля. При анализе зональных перестроек составляющих В-зависимой зоны выявляется трехкратное увеличение доли первичных лимфоидных узелков ($p = 0,0001$), что сочетается с уменьшением площади мозговых тяжей на 40 %, площадь вторичных лимфоидных узелков сохраняется на уровне контрольной группы, однако в их структуре увеличивается площадь герминативных центров ($p = 0,002$). Снижение доли мозговых тяжей мозгового вещества ($p = 0,0001$) является морфологическим подтверждением уменьшения поступления клеток лимфоидного ряда в центральную лимфу через воротный синус лимфоузла.

При исследовании Т-зависимых структур выявляется уменьшение на 42 % суммарной площади Т-зависимых зон, что вызвано депрессией площади паракортикальной зоны более чем в 3 раза. Полученные данные отражают депрессию Т-зависимых механизмов иммунных процессов и большую устойчивость В-зависимых структур к хроническому поступлению ацетата свинца.

Увеличивается площадь мозгового вещества на 42,02 % ($p = 0,0001$) за счет мозговых синусов, доля которых больше контрольных показателей на 65 %. Между этими показателями выявлена сильная положительная связь ($r = 0,983$). Снижается площадь коркового вещества ($p = 0,0001$) за счет площади паракортикальной зоны, что подтверждает выявленная сильная положительная связь ($r = 0,823$) между этими показателями.

В целом лимфатический узел перестраивается из промежуточного (в контроле) во фрагментированный функциональный тип, способствующий активному току лимфы через синусную систему лимфоидного органа. Выявленная нами трансформация функционального типа организации мезентериального лимфатического узла из промежуточного во фрагментированный на фоне хронической интоксикации свинцом согласуется с данными, описанными в литературе [3].

Анализ особенностей минерального обмена выявил в 100 % наблюдений повышение концентрации свинца в тканях печени. Этот факт позволяет судить о корректности постановки и проведения экспериментального воздействия. Необходимо отметить, что свинец обладает прямым иммунотоксическим действием [17], вызывая подавление функциональной активности естественных киллеров (NK-клеток), выполняющих цитотоксические и цитокин-продуцирующие функции [11].

В 60 % наблюдений выявлены отклонения в обмене калия. Общеизвестен факт, что ионы калия, являясь основным внутриклеточным элементом, обеспечивают поддержание осмотического давления, объема клетки, активности ферментативных систем и работу ионных клеточных каналов [7]. Кроме того, этот элемент обеспечивая работу K^+ -каналов, которые выступают в качестве эффекторов путей передачи сигнала и играют определенную роль в лизисе клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами [8].

Уменьшение содержания цинка в 60 % наблюдений подтверждает тот факт, что соединения свинца являются его биохимическими антагонистами. Дефицит цинка вызывает потерю аппетита, нарушает деятельность пищеварительных ферментов, что негативно влияет на процессы

переваривания и всасывания в тонкой кишке, а это в свою очередь приводит к нарушению роста и формирования организма и его систем [15]. Гипоэлементоз цинка может вызывать нежелательные иммунные реакции, вызывая значительные сдвиги в обмене интерлейкинов (интерлейкин-10, интерлейкин-27), других цитокинов и продукции Т-клеток. Таким образом, нормализация обмена цинка является перспективным средством для терапии аллергии без ущерба для иммунной системы [16].

Выявленные гипомикроэлементозы калия и цинка в печени отражают, по нашему мнению, возникший дефицит этих биоэлементов в организме в целом у крыс подросткового возраста в условиях накопления свинца. Эти химические изменения приводят к нарушению в работе тонких биохимических процессов, сопровождающихся нарушением иммунных процессов преимущественно в Т-зависимых структурах лимфатических узлов.

В 40 % случаев произошло нарушение обмена марганца, в 20 % регистрируются отклонения в количестве кальция, йода, фосфора и кремния. Указанные биоэлементы, являясь жизненно важными, играют известную и значимую биологическую роль в развитии и становлении всех функциональных систем растущего организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хроническое воздействие подострых доз ацетата свинца на организм самцов крыс подросткового возраста приводит к выраженным сдвигам в обмене биоэлементов, что является отражением измененного химического гомеостаза печени и организма в целом. На фоне измененных биохимических процессов неизбежно формируются структурно-функциональные перестройки и отклонения в различных системах организма. В мезентериальном лимфатическом узле происходит депрессия иммунной обработки лимфы, что проявляется в преимущественном уменьшении Т-зависимых структур, это сочетается с активизацией транспортной функции органа. Лимфоузел дренирует интерстиций своего региона, удаляя токсичный тяжелый металл из интерстиция тонкой кишки, что в целом способствует выведению свинца из организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина, 1991. 496 с.
2. Гелашивили О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы // Саратов. науч.-мед. журн. 2008. 22. (4). 125–126.
3. Залавина С.В., Астахов В.В., Елясин П.А., Греф В.В. Цитоархитектоника лимфатических узлов беременных самок-крыс Wistar в условиях хронического поступления свинца // Вестн. КРСУ. 2017. 17. (3). 169–172.
4. Коненков В.И., Бородин Ю.И., Любарский М.С. Лимфология. Новосибирск: Манускрипт, 2012. 1104 с.
5. Стефанов С.Б. Морфометрическая сетка случайного шага как средство ускоренного измерения элементов морфогенеза // Цитология. 1974. 16. (6). 785–787.
6. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды // Астрах. вестн. экол. образования. 2013. 23. (1). 182–192.
7. Aperia A.J. To serve and protect: classic and novel roles for Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase // Am. Soc. Nephrol. 2012. 23. (8). 1283–1290.
8. Attali B., Romey G., Honoré E., Schmid-Alliana A., Mattéi M.G., Lesage F., Ricard P., Barhanin J., Lazdunski M.J. Cloning, functional expression, and regulation of two K^+ channels in human T lymphocytes // Biol. Chem. 1992. 267. (12). 8650–8657.
9. Betterman K.L., Harvey N.L. The lymphatic vasculature: development and role in shaping immunity // Immunol. Rev. 2016. 271. 276–292.
10. Chelchowska M., Jablonka-Salach K., Ambroszkiewicz J., Maciejewski T., Gajewska J., Bulska E., Laskowska-Klita T., Leibschang J., Barciszewski J. Effect of cigarette smoking on blood lead levels in pregnant women // Med. Wieku Rozwoj. 2012. 16. (3). 196–204.
11. Corsetti G., Romano C., Stacchiotti A., Pardini E., Dioguardi F. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis triggered by sub-chronic lead exposure in mice spleen: a histopathological study // Biol. Trace Elem. Res. 2017. 178. (1). 86–97.
12. Cottier H., Turk J., Sobin L. A proposal for a standardized system of reporting human lymph node morphology in relation to immunological function // J. Clin. Pathol. 1973. 26. (5). 317–331.
13. Fenga C., Gangemi S., di Salvatore V., Falzone L., Libra M. Immunological effects of occupational exposure to lead // Mol. Med. Rep. 2017. 15 (5). 3355–3360.
14. Gorchakova O.V., Borodin Y.I., Gorchakov V.N. Lymph nodes of different localization: aging and correction. Saarbrücken: Lap Lambert, 2017. 350 p.
15. Jing M.Y., Sun J.Y., Weng X.Y., Wang J.F. Effect of zinc deficiency on intestinal mucosal morphology and digestive enzyme activity in growing rat // Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2011. 49. (4). 249–254.

16. Rosenkranz E., Hilgers R.D., Uciechowski P., Petersen A., Plimäkers B., Rink L. Zinc enhances the number of regulatory T cells in allergen-stimulated cells from atopic subjects // Eur. J. Nutr. 2017. 56. (2). 557–567.

17. Zhang Y., Huo X., Cao J., Yang T., Xu L., Xu X. Elevated lead levels and adverse effects on natural killer cells in children from an electronic waste recycling area // Environ. Pollut. 2016. 213. 143–150.

PECULIARITIES OF MINERAL EXCHANGE OF LIVER AND STRUCTURE OF THE MESENTERIAL LYMPH NODE OF ADOLESCENT RATS IN CONDITIONS OF LEAD CHRONIC INTOXICATION

Pavel Aleksandrovich ELYASIN¹, Svetlana Vasilyevna ZALAVINA¹, Aleksandr Nikolaevich MASHAK¹, Anatoly Viktorovich SKALNY²

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

² Center for Biotic Medicine
105082, Moscow, Perevedenovskiy lane, 13/8

The purpose of the research was to detect structural alterations of the mesenteric lymph node of male rats-adolescents taking into account changes in the mineral metabolism against a background of chronic intoxication with lead acetate. **Material and methods.** The experiment was carried out on 4-week male adolescents Wistar rats (10 rats) receiving *per os* lead acetate solution at a daily dose of 10 mg / kg body weight for 21 days, animals of the control group (10 rats) received food without heavy metal. The mesenteric lymph node and liver were examined (staining with hematoxylin and eosin, azur II and eosin) by light microscopy and morphometry; bioelement content in the liver was determined using atomic emission spectrometry with inductively coupled argon plasma. The non-parametric Mann – Whitney U criterion and the Pearson criterion χ^2 were used as statistical methods **Results and discussion.** The lymph node changed from an intermediate (in control) into a fragmented functional type that promotes active lymph flow through the sine system of the lymphoid organ. The ratio of T-dependent functional zones of the lymph node decreases. The increase in lead concentration in liver tissues was detected in 100 % of the observations. In 60 % of liver samples, a decrease in the content of potassium and zinc was detected. In 40% cases there was manganese exchange disorder, in 20 % there were deviations in calcium, iodine, phosphorus and silicon amounts. Thus, the chronic effect of lead acetate subacute doses on the body of rat male adolescents results in pronounced shifts in the exchange of bioelements. Against the background of altered biochemical processes, structural and functional rearrangements are formed in the mesenteric lymph node: depression of the immune processing of lymph, activation of the transport function of the organ.

Key words: mesenteric lymph node, lead acetate, liver, microelements, intoxication.

Elyasin P.A. – candidate of medical sciences, associate professor of the department of human anatomy,
e-mail: elyasin@ngs.ru

Zalavina S.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of histology,
e-mail: zalavinasv@mail.ru

Mashak A.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of human anatomy,
e-mail: man4949@mail.ru

Skalny A.V. – doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: skalny2@microelements.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В КАЧЕСТВЕ ТРАНСПОРТЕРОВ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

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

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

В связи с широким развитием явления РНК-интерференции перед исследователями стоит задача получения эффективных переносчиков малых интерферирующих РНК (миРНК). Ранее нами получен модифицированный рекомбинантный полипептид на основе аполипопротеина А-I человека (апо А-I), способный связываться с плазмидными ДНК. **Цель исследования** – изучение способности модифицированных рекомбинантных белков апо А-I переносить миРНК в опухолевые клетки. **Материал и методы.** Исследования проводились на модели трансформированных макрофагов мышей линии RAW 264.7, стабильно экспрессирующих ген зеленого флуоресцирующего белка GFP (клеточная линия клона 8A3). В качестве переносчиков миРНК использовали рекомбинантный про-апо А-I и модифицированный аналог про-апо А-I, несущий на С-конце 10 аминокислотных остатков лизина (апоАК10). Для трансфекции использовали липофектамин 2000 (lipofectamine 2000). Белки получали из соответствующих штаммов-продуцентов *E. coli*. Объектом переноса служил дуплекс миРНК, в котором один нуклеотид был комплементарен матричной РНК гена *gfp*. Измерение флуоресценции клеток проводили с помощью флуоресцентного планшетного анализатора. **Результаты и их обсуждение.** Обнаружено, что белки про-апо А и апо АК10, меченные флуоресцеином изотиоцианатом, проникают в клетки линии RAW 264.7. Результаты исследования РНК-интерференции показали, что инкубация клеток с миРНК и липофектамином 2000 вызывает снижение флуоресценции клеток линии 8A3, что свидетельствует о корректном подборе миРНК к матричной РНК гена *gfp*. В то же время флуоресценция клеток клона 8A3 при культивировании с миРНК и рекомбинантными формами про-апо А-I и апо АК10 не отличалась от флуоресценции контрольных клеток, инкубированных только с миРНК. **Заключение.** Рекомбинантные модифицированные формы про-апо А-I и апо АК10 проникают в трансформированные мышинные макрофаги линии RAW264.7, однако не способствуют явлению РНК-интерференции в этих клетках.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, рекомбинантные формы про-апо А-I и апо АК10, РНК-интерференция, миРНК, макрофаги линии RAW264.7.

В настоящее время явление РНК-интерференции представляется очень перспективным инструментом для генотерапии, поэтому поиск эффективных переносчиков малых интерферирующих РНК (миРНК) становится актуальной задачей. В литературе показано, что аполипопротеины могут являться переносчиками генетического материала, в частности, белковый компонент липопротеинов высокой плотности – аполипопротеин А-I (апо А-I) [8, 13]. Единичные работы, касающиеся данной проблемы, демонстрируют участие апо А-I в составе полисом в

переносе олигонуклеотидов через гематоэнцефалический барьер [10]. Показана способность рекомбинантных липопротеинов высокой плотности транспортировать малые интерферирующие РНК против вируса гепатита С в гепатоциты через SR-B1-рецепторный путь [9]. Рецепторы к апо А-I находятся во многих тканях [8], что очень важно для рецепторно-опосредованного захвата клетками комплексов «апо А-I-миРНК». Липидный компонент аполипопротеинов может обеспечивать формирование контейнерной структуры, аналогичной липосомам, которая должна защи-

Рябченко А.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail borrelia@mail.ru

Котова М.В. – младший научный сотрудник, e-mail zerokiri@mail.ru

Князев Р.А. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail Knjazev_roman@mail.ru

Трифорова Н.В. – младший научный сотрудник, e-mail nataliya-iverdohleb@yandex.ru

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

шать экзогенную миРНК от разрушения в моделях *in vivo*. Нам кажется, что наиболее вероятным способом доставки таких комплексов («апо А-I-миРНК») к опухолевым клеткам является их прямое введение в кровоток живого организма.

Другим перспективным направлением получения переносчиков миРНК является конструирование полипептидов, несущих различные функциональные модули [5, 6]. Ранее мы пытались увеличить аффинность рекомбинантного апо А-I к ДНК путем добавления в структуру гена с 3'-конца фрагмента ДНК, кодирующего 10 аминокислотных остатков (а.о.) лизина [3]. Модифицированный апо А-I получил название апо АК10 и был способен, в отличие от нативного белка, задерживать ДНК размером 1000–5000 пар нуклеотидов (п.н.) в агарозном геле. Кроме того, на примере эндонуклеазы рестрикции *Hinf I* было показано, что белок в определенной степени способен защищать плазмидную ДНК от гидролиза. Ранее мы изучили возможность использования нативного и рекомбинантного апо А-I нативной формы для доставки миРНК в опухолевые клетки макрофагов линии RAW 264.7, стабильно экспрессирующие ген зеленого флуоресцирующего белка GFP (клеточная линия клона 8A3). Однако снижения флуоресценции в этих клетках обнаружено не было, что, возможно, обусловлено отсутствием специфического взаимодействия белка с миРНК. Получение модифицированного апо АК10, связывающего ДНК и обладающего большим аффинитетом, чем апо А-I нативной формы, позволяет по-новому изучить вопрос использования апо АК10 для доставки миРНК в опухолевые клетки. В связи с этим целью нашего исследования являлось изучение способности модифицированных рекомбинантных белков апо А-I (про-апо А-I и апо АК10) переносить миРНК в опухолевые клетки на модели мышиных макрофагов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Рекомбинантный апо А-I нативной формы и модифицированный апо АК10 получали из соответствующих штаммов-продуцентов *Escherichia coli*, сконструированных ранее в нашей лаборатории [3]. Для наработки биомассы использовали клетки *E. coli* штамм BL21(DE3). Из музейного клона продуцента выращивали ночную культуру в среде LB объемом 5 мл при 37 °С и на следующий день переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей канамицин 30 мкг/мл. Клетки выращивали при активном перемешивании и 37 °С до оптической плотности $D_{600} = 0,8–1,2$ о.е., добавляли индук-

тор изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозид до 0,05 мМ, инкубировали 18 ч при 30 °С, после чего осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, осадок замораживали и хранили до выделения белка. Клетки разрушали ультразвуком в буфере с мочевиной (100 мМ дигидрофосфата натрия, 10 мМ трис(гидроксиэтил)аминометана, 6 М мочевины, 20 мМ имидазола, рН 8,0). Клеточный дебрис осаждали 20 мин при 15000 об/мин (~27000 g), а супернатант (лизат) использовали для выделения белков аффинной хроматографией на сорбенте «Ni-NTA Superflow» («Qiagen», США). Хроматографию проводили в аналогичном буфере, целевую фракцию белка элюировали буфером с добавлением имидазола до 250 мМ. Белки обессоливали методом диализа против стандартного фосфатно-солевого буфера рН 7,4–7,5 (ФСБ) и стерилизовали фильтрованием через поливинилиденфторидный фильтр с размером пор 0,22 мкм «Syringe-DivenFilters» («JetBiofilm», Корея). Качественный анализ белков проводили в 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли.

Конъюгаты белков с флуоресцеинизотионатом (ФИТЦ) получали путем инкубации белков с ФИТЦ в течение ночи в карбонатном буфере рН 9,5 в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ на 1 мг белка. Конъюгат от избытка метки отделяли с помощью гель-фильтрации. Образование конъюгата подтверждали спектрофлуориметрически на наличие характерных для ФИТЦ пиков возбуждения (490 нм) и эмиссии (520 нм), а также в ПААГ. Концентрацию белков при $\lambda = 280$ нм измеряли на спектрофотометре «Evolution 300» («ThermoFisher Scientific», США), флуориметрические измерения конъюгата «апо А – ФИТЦ» выполняли на спектрофлуорофотометре «RF-5301PC» («Shimadzu», Япония).

В качестве клеточной модели использовали трансформированные мышиные макрофаги линии RAW 264.7 и ее производный моноклон 8A3, стабильно экспрессирующий ген *gfp* (Евроген, Россия). Клетки выращивали в среде RPMI-1640 с глутамином (Биолот, Россия), рН 7,4, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров, 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, в CO₂-инкубаторе («Cole-Parmer», США) в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и 95 % воздуха, при температуре 37 °С, используя 24-луночные планшеты («Orange Scientific», США). Клетки для пересева снимали с планшетов 0,25%-м раствором трипсина, жизнеспособность оценивали методом исключения трипанового синего, концентрацию рассчитывали в камере Горяева. Музейные образцы клеток хранили в жидком азоте

в среде RPMI-1640 с добавлением 40 % эмбриональной сыворотки коров и 10 % диметилсульфоксида.

Клетки инкубировали с комплексом «белок-ФИТЦ» в течение 18 ч, его концентрация составляла 5, 10 и 20 мкг/мл. Для визуального анализа флуоресценции использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп «Axiovert 40 CFL» («Zeiss», Германия). Со смесью белков и миРНК клетки инкубировали в течение ~6 ч, меняли среду на свежую, инкубировали еще двое суток, дважды отмывали от среды ФСБ и исследовали на многофункциональном планшетном анализаторе «Varioskan Flash» («ThermoFisher Scientific» США), длина волны возбуждения составляла 480 нм, испускания – 510 нм. Затем клетки снимали с планшета и рассчитывали их концентрацию. Исследование каждого образца повторяли не менее трех раз.

В работе использовали комплементарную пару олигорибонуклеотидов (по 22 нуклеотида каждый), содержащие на 3'-концах по два дезокситимидиновых остатка: 5'-CAAGCUGGAGAUCAAGUUCTT-3' и 3'-TTGAG UCGACCUCUAGUUCAAG-5'. Данные нуклеотиды были синтезированы *de novo* на заказ (ЗАО «Биосан», г. Новосибирск), из них образовывали дуплекс путем эквивалентного смещения каждого олигорибонуклеотида с концентрацией 40 пмоль/мкл. В раствор дополнительно добавляли диэтилпирикарбонат до конечной концентрации 1 мкМ. Смесь инкубировали при 45–50 °С в течение 20 мин, охлаждали в ледяной бане, разливали в пробирки на мелкие порции и хранили при –70 °С. При работе с олигорибонуклеотидами использовали автоклавированную воду, предварительно очищенную с помощью системы «Merck Millipore» («Merck KGaA», Германия), а также наконечники для дозаторов и пробирки с маркировкой об отсутствии РНКаз («Axugen», США).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные белки про-апо А-I (далее по тексту апо А) и апо АК10 получали из соответствующих клеток-продуцентов *E. coli*, сконструированных нами ранее [3]. Белок про-апо А-I на N-конце содержал 6 а.о., характерных для про-

формы белка апо А – RHFQQ, а на С-конце – 8 а.о. гистидина. Белок апо АК10, в дополнение к указанным остаткам, между собственно белком апо А-I и 8 а.о. гистидина содержал фрагмент, несущий 10 а.о. лизина – LDGPAKKKKLKKKKK. Схематичная структура белка апо АК10 имела следующий вид: N'-RHFQQ-структура апоА-I зрелой формы-LDGPAKKKKLKKKKK-NNNN NNNN-C'. Выход рекомбинантных белков апо А и апо АК10 составил около 25–30 мг/л культуры клеток продуцентов.

За основу модели клеток млекопитающих была выбрана мышьяная клеточная макрофагальная линии RAW 264.7. Из литературы известно, что на макрофагах имеются рецепторы к апо А-I. Исходя из этого, мы предположили, что клетки линии RAW 264.7 также будут способны к рецепторно-опосредованному поглощению комплексов «апо АК10-миРНК». Для проверки этого предположения были получены конъюгаты рекомбинантного апо А и апо АК10 с флуоресцирующим красителем ФИТЦ и изучено их проникновение в клетки линии RAW 264.7. Клетки инкубировали с конъюгатами в течение ~18 ч, после чего дважды отмывали ФСБ и анализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе. Светящиеся клетки интерпретировали как поглотившие конъюгат. Типичный пример результатов инкубирования клеток линии RAW 264.7 и конъюгата «апо АК10-ФИТЦ» представлен на рис. 1.

Наибольшее количество светящихся клеток обнаруживалось при максимальной исследуемой концентрации конъюгата 20 мкг/мл и составляло около одной четверти от их общего числа. При этом количество светящихся клеток при исполь-

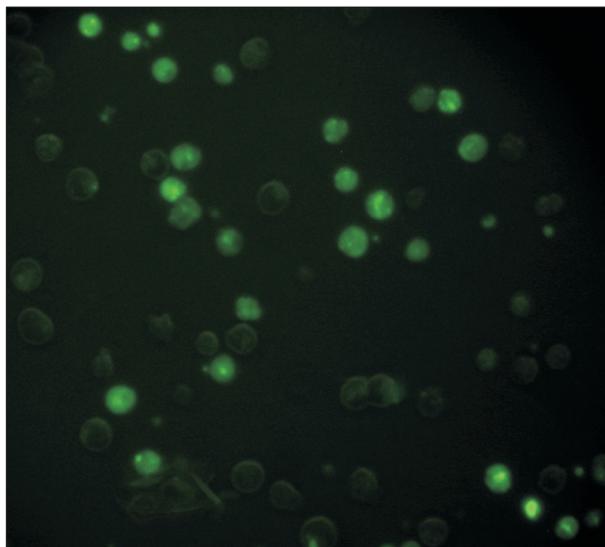


Рис. 1. Микроскопия клеток RAW 264.7, инкубированных с конъюгатом «апо АК10-ФИТЦ», в флуоресцентном режиме ($\times 40$)

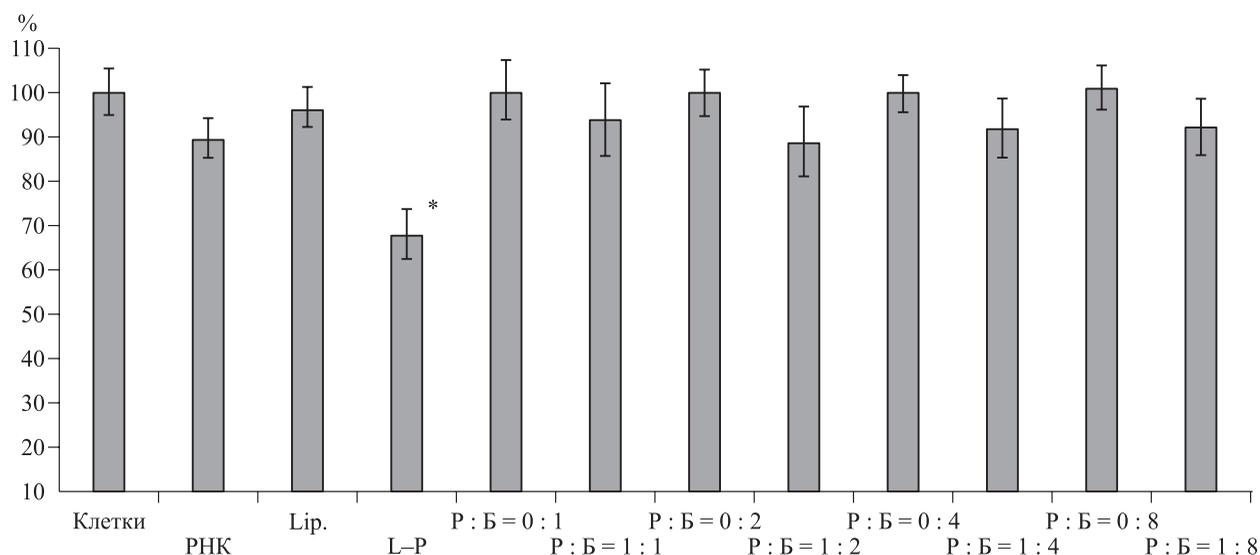


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции клеток 8А3. Клетки – контрольные клетки, интенсивность их флуоресценции принята за 100 %; РНК – клетки, инкубированные с миРНК; Lip. – клетки, инкубированные с липофектаминам 2000; L–P – клетки, инкубированные со смесью липофектамина 2000 и миРНК; P : B – клетки, инкубированные со смесью миРНК и апо АК10 при различных молярных соотношениях, от 1 : 1 до 1 : 8 (столбцы 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8) либо в отсутствие миРНК (столбцы 0 : 1, 0 : 2, 0 : 4, 0 : 8); * – отличие от интенсивности флуоресценции контрольных клеток и клеток, инкубированных с миРНК, статистически значимо при $p < 0,05$

зовании конъюгатов из рекомбинантного апо А и модифицированного белка апо АК10 было примерно одинаковым. Полученные результаты с конъюгатами позволили предполагать, что клетки будут способны также поглощать и немеченый белок апо АК10 и будут пригодны в качестве модели для изучения апо АК10 в качестве переносчика миРНК.

На основе клеток RAW 264.7 фирмой «Евроген» с помощью лентивирусного вектора рCD-TagGFP2-Rigo получена моноклональная клеточная линия 8А3, стабильно экспрессирующая ген *gfp* [4] и использованная нами для изучения РНК-интерференции. В качестве олигонуклеотидов миРНК применялась пара олигонуклеотидов, описанная в работе [4]. Олигонуклеотиды были синтезированы *de novo*, из них образовывался дуплекс путем эквивалентного смешения, как описано в разделе «Материал и методы», который использовался в экспериментах по подавлению флуоресценции клеток с помощью рекомбинантного апо А, апо АК10 и липофектамина 2000. Дуплекс инкубировали с белками при комнатной температуре в течение 20 минут и затем добавляли к клеткам моноклона 8А3. миРНК вносили в количестве 20 пмоль на лунку, поскольку в серии предварительных экспериментов установили, что оно является оптимальным при трансфекции липофектаминам 2000. Молярные соотношения миРНК/белок были следующими: 1 : 1 (20 пмоль/0,665 мкг), 1 : 2 (20 пмоль/1,33 мкг),

1 : 4 (20 пмоль/2,66 мкг) и 1 : 8 (20 пмоль/5,32 мкг). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные с миРНК (20 пмоль), и клетки, инкубированные только с белком в аналогичных количествах, в качестве положительного контроля – клетки, инкубированные со смесью миРНК и липофектамина 2000 (20 пмоль/2 мкл). Инкубирование длилось ~6 ч, после чего среду меняли на свежую, не содержащую трансфицирующих реагентов, и через ~40 ч после клетки промывали дважды буфером ФСБ, определяли их флуоресценцию, после чего снимали клетки с планшетов и измеряли их концентрацию. Флуоресценцию контрольных клеток принимали за 100 %, данные образцов были пересчитаны на флуоресценцию 200 000 клеток.

На диаграмме с результатами анализа (рис. 2) представлены только те клетки, на которых исследовалось их инкубирование с апо АК10. Статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции клеток, которое наблюдалось только в образцах, инкубированных со смесью миРНК и липофектамина 2000, составило $62,3 \pm 5,4$ % от уровня флуоресценции контрольных клеток. Выраженность уменьшения интенсивности флуоресценции GFP соответствовала литературным данным, согласно которым при использовании данной пары олигонуклеотидов на клетках различного типа уровень флуоресценции снижался до 50–90 % [13]. Это подтверждает корректность подобранной нами пары олигорибо-

нуклеотидов для изучения РНК-интерференции на клетках RAW 264.7 линии 8A3. В клетках, инкубированных со смесью миРНК и рекомбинантных апо А и апо АК10, даже в соотношениях с максимальным количеством белка (миРНК/белок = 20 пмоль/5,32 мкг) интенсивность флуоресценции была такой же, как в контрольных клетках и инкубированных только с миРНК. Эти результаты говорят о том, что на данной модели апо АК10 не способствовал РНК-интерференции.

Полученные результаты можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, несмотря на то, что апо АК10 способен взаимодействовать с фрагментами ДНК размером 5000–1000 п.н., нет полной уверенности, что белок специфически связывался с дуплексом малой РНК размером 22 п.н. и, соответственно, образовывал стабильные комплексы. Во-вторых, при проникновении комплекса «белок – нуклеиновая кислота» в клетку он в первую очередь оказывается в эндосомах, внутренняя среда которых постепенно закисляется [2, 6], что приводит к деградации нуклеиновой кислоты. Поэтому, если белок не обладает каким-либо защитным средством, как правило, это может быть фьюзогенный мотив, способствующий высвобождению комплексов из эндосом, нуклеиновая кислота в составе комплекса неспецифически гидролизуется и далее не способна выполнять свои функции. В используемых нами переносчиках – рекомбинантном апо А и апо АК10 – такие фьюзогенные мотивы отсутствуют, что могло быть одной из причин отрицательных результатов РНК-интерференции. В-третьих, хотя нами и продемонстрировано, что апо АК10 способен защищать плазмидную ДНК от гидролиза эндонуклеазами рестрикции на примере *Hinf I* [1], белок мог недостаточно защищать дуплекс РНК от нуклеаз, присутствующих в культуральной среде за счет добавления эмбриональной сыворотки коров. Это также могло приводить к гидролизу дуплекса РНК, а соответственно, и к отсутствию эффекта снижения флуоресценции в опытных клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как рекомбинантный белок про-апо А-I человека, так и его модифицированная форма апо АК10 проникают в трансформированные мышечные макрофаги линии RAW 264.7, однако в комплексе с миРНК они не способствуют снижению флуоресценции клеток. Вероятной причиной этого является отсутствие специфического взаимодействия апо А с миРНК, а также недостаточная защищенность миРНК в комплексе с белком от нуклеаз и эндосом клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Спектрометрические измерения» (НИИ биохимии ФИЦ ФТМ) и ЦКП «Современные оптические системы» (НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ ФТМ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котова М.В., Рябченко А.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Получение модифицированного рекомбинантного апополипротеина А-I для переноса нуклеиновых кислот // *Международ. журн. прикл. и фундам. исслед.* 2017. (12-2). 317–321.
2. Розенкранц А.А., Уласов А.В., Слестникова Т.А., Храмов Ю.В., Соболев А.С. Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки // *Биохимия.* 2014. 79. (9). 1148–1168.
3. Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Изучение рекомбинантного апополипротеина А-I как переносчика плазмидных ДНК на модели гепатоцитов крыс // *Сиб. науч. мед. журн.* 2017. 37. (6). 10–15.
4. Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Изучение апополипротеина А-I как переносчика малых интерферирующих РНК // *Международ. журн. прикл. и фундам. исслед.* 2017. (12-1). 123–127.
5. Canine B.F., Hatefi A. Development of recombinant cationic polymers for gene therapy research // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. 62. (15). 1524–1529.
6. Canine B.F., Wang Y., Ouyang W., Hatefi A. Development of targeted recombinant polymers that can deliver siRNA to the cytoplasm and plasmid DNA to the cell nucleus // *J. Control. Release.* 2011. 151. (1). 95–101.
7. Danielle L.M., Kasey C.V. Lipoprotein carriers of microRNAs // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. 1861. (12). 2069–2074.
8. Farve G., Tazi K., Le G., Bennis F., Hachem H., Soula G. High density lipoprotein3 bindings sites are related to DNA biosynthesis in the adenocarcinoma cell line A549 // *J. Lipid. Res.* 1993. 34. (7). 1093–1106.
9. Kim S.I., Shin D., Lee H., Ahn B.Y., Yoon Y., Kim M. Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I bound cationic liposomes // *J. Hepatol.* 2009. 50. (3). 479–488.
10. Kratzer I., Werning K., Panzenboeck U., Bernhart E., Reicher H., Wronski R., Windisch M., Hammer A., Malle E., Zimmer A., Sattler W. Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier // *J. Control. Release.* 2007. 117. (3). 301–311.

11. Lee H., Kim S.I., Shin D., Yoon Y., Choi T.H., Cheon G.J., Kim M. Hepatic siRNA delivery using recombinant human apolipoprotein A-I in mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. 378. (2). 192–196.
12. Tabet F., Vickers K.C., Cuesta Torres L.F., Wiese C.B., Shoucri B.M., Lambert G., Catherinet C., Prado-Lourenco L., Levin M.G., Thacker S., Sethupathy P., Barter P.J., Remaley A.T., Rye K.A. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells // *Nat. Commun.* 2014. 5. 3292.
13. Tschuch C., Schulz A., Pscherer A., Werft W., Benner A., Hotz-Wagenblatt A., Barrionuevo L.S., Lichter P., Mertens D. Off-target effects of siRNA specific for GFP // *BMC Mol. Biol.* 2008. 9. 60.

STUDY OF MODIFIED RECOMBINANT APOLIPOPROTEIN A-I AS A CARRIER OF SMALL INTERFERING RNA

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

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

With the widespread development of the phenomenon of RNA interference, currently, researchers are puzzled to obtain effective carriers of small interfering RNA (siRNA). Previously, we obtained a modified recombinant polypeptide based on human apolipoprotein A-1 (apoA-I), capable of binding to plasmid DNA. The aim of the investigation was to study the possibilities of modified recombinant proteins of apolipoprotein A-I to transfer siRNA into tumor cells. **Material and methods.** The studies were performed on a model of transformed macrophages of mice RAW 264.7 that stably expressed the green fluorescent protein (GFP) gene (line of clone 8A3). Recombinant pro-apo A-I, its modified analog, carrying at the C-terminus of 10 amino acid residues of lysine (apo AK10), and Lipofectamine 2000 transfection reagent were studied as siRNA carriers. Proteins were obtained from the corresponding *E. coli* producer strains. The transfer object was a siRNA duplex, in which one nucleotide was complementary to the matrix RNA of GFP gene. Cell fluorescence was measured on the second day using a fluorescent plate analyzer. **Results and discussion.** The results of the study showed that proteins pro-apoA and apoAK10 labeled with fluorescein isothiocyanate penetrate the RAW 264.7 cells. The results of the study RNA interference showed that the incubation of cells with a mixture of miRNA and Lipofectamine 2000 caused a decrease in the fluorescence of the 8A3 cell lines, which indicates a correct selection of siRNA to the matrix RNA of the *gfp* gene. However, when 8A3 cells were incubated with a mixture of miRNA and recombinant pro-apo A-I and apo AK10, a decrease in fluorescence relative to the control cells incubated only with miRNA was not observed. **Conclusion.** It was shown that both the recombinant protein pro-apo A-I and the modified apoAK10 penetrate the transformed mouse macrophages of the line RAW264.7, but do not promote RNA interference in these cells.

Key words: apolipoprotein A-I, recombinant protein, pro-apo A-I, pro AK10, RNA interference, siRNA, RAW264.7 macrophages.

Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail borrelia@mail.ru

Kotova M.V. – junior researcher, e-mail zerokiri@mail.ru

Knyazev R.A. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail Knjazev_roman@mail.ru

Trifonova N.V. – junior researcher, e-mail nataliya-tverdohleb@yandex.ru

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

КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛЕНИЯ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПЫЛИ

Любомир Иванович АФТАНАС¹, Любовь Анатольевна ШПАГИНА²,
Ольга Сергеевна КОТОВА², Илья Семенович ШПАГИН²,
Галина Владимировна КУЗНЕЦОВА², Людмила Алексеевна ПАНАЧЕВА²,
Наталья Вадимовна КАМНЕВА², Светлана Михайловна ЕРИХОВА²

¹ *НИИ физиологии и фундаментальной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4*

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

Цель исследования – определить особенности воспаления и прогноза при профессиональной хронической обструктивной болезни легких (ПХОБЛ) в условиях воздействия неорганической пыли. **Материал и методы.** Дизайн – проспективное когортное наблюдательное исследование больных ПХОБЛ ($n = 101$) и рабочих с нормальной функцией легких ($n = 51$), экспонированных к неорганической пыли, группа сравнения – ХОБЛ табакокурения ($n = 103$), контрольная – условно здоровые лица без профессиональных вредностей ($n = 99$). Диагноз ХОБЛ устанавливался согласно критериям GOLD 2011–2018. Группы были сопоставимы по стажу, статусу курения, длительности ХОБЛ, демографическим данным. Методом твердофазного ИФА исследовано содержание цитокинов, маркеров окислительного стресса, металлопротеиназ сыворотки. Взаимосвязи определены ковариационным анализом и многофакторной линейной регрессией. Анализ выживаемости выполнен методом Каплана – Майера, взаимосвязи установлены методом пропорциональных рисков Кокса. **Результаты.** Профессиональная ХОБЛ отличалась от ХОБЛ табакокурения высокой сывороточной концентрацией моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP1), экстрацеллюлярной супероксиддисмутазы (SOD3), фактора роста фибробластов 2 (FGF2) и 8-изопростагландина F2 α (8-изо-PGF2 α). У экспонированных рабочих выявлено повышение в системной циркуляции содержания FGF2, MCP1 и SOD3. В регрессионном анализе определены взаимосвязи стажа, концентрации кремневой пыли в воздухе рабочей зоны с патогенетическими факторами. Молекулярный паттерн воспаления был связан с особенностями ремоделирования и функции легких при ПХОБЛ. С объемом форсированного выдоха за первую секунду был ассоциирован сывороточный уровень IL1 β ($B = -3,4$; $p = 0,028$), с отношением остаточного объема к общей емкости легких – содержание MMP 9 ($B = 1,3$; $p = 0,01$), с диффузионной способностью легких к CO – концентрация FGF2 ($B = -2,4$; $p = 0,001$). Выявлено увеличение кумулятивной доли летальных исходов по причине пневмонии в течение пяти лет у больных ПХОБЛ по сравнению с ХОБЛ табакокурения (соответственно 5 и 2 %; $p = 0,048$) при одинаковой общей выживаемости. Факторы

Афтанас Л.И. – д.м.н., проф., академик РАН, директор

*Шпагина Л.А. – д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной терапии и медицинской реабилитации,
e.mail: lashpagina@gmail.com*

*Котова О.С. – к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации,
e.mail: ok526@yandex.ru*

*Шпагин И.С. – к.м.н., ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ,
e.mail: mkb-2@yandex.ru*

*Кузнецова Г.В. – к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации,
e.mail: mkb-2@yandex.ru*

*Паначева Л.А. – д.м.н., проф. кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации,
e.mail: mkb-2@yandex.ru*

*Камнева Н.В. – ассистент кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации,
e.mail: mkb-2@yandex.ru*

*Ерихова С.М. – аспирант кафедры госпитальной терапии и медицинской реабилитации,
e.mail: mkb-2@yandex.ru*

риска неблагоприятного исхода ПХОБЛ – стаж работы, уровень воздействия пыли, сывороточная концентрация MCP1, MMP 9, FGF2 и 8-изо-PGF2 α . **Заключение.** В результате воздействия неорганической пыли формируется клинико-патогенетический вариант ХОБЛ, характеризующийся высоким риском смерти по причине пневмонии. Перспективный маркер риска развития ПХОБЛ у лиц, работающих в условиях воздействия пыли в концентрации 2ПДК и более в течение 10 лет и более, – FGF2.

Ключевые слова: профессиональная хроническая обструктивная болезнь легких, фенотип, эндотип, выживаемость, неорганическая кремнийсодержащая пыль.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – это тяжелое, неуклонно прогрессирующее заболевание, представляющее значительную проблему современной медицины. ХОБЛ уменьшает продолжительность и качество жизни больных, негативно влияет на общественное здоровье и трудовые ресурсы. Смертность от нее остается практически неизменной с 1996 г., а среди причин смертности от хронических неинфекционных заболеваний ХОБЛ занимает третье место [24]. Российское эпидемиологическое исследование показало значительную распространенность ХОБЛ (15,3 %) и факторов риска ее развития [10]. Таким образом, актуально изучение биомеханизмов заболевания для оптимизации диагностики и прогноза.

ХОБЛ – полиэтиологичное и гетерогенное состояние. Значимость промышленных аэрозолей как этиологического фактора ХОБЛ доказана в эпидемиологических и экспериментальных исследованиях [1, 4, 6]. Доля профессиональной ХОБЛ (ПХОБЛ) составляет 10–15 % случаев [13]. Аномальное персистирующее воспаление дыхательных путей и легочной паренхимы в основе ХОБЛ – результат воздействия повреждающих частиц на предрасположенный организм [1, 4, 6], при этом к необратимому ремоделированию бронхолегочной системы с развитием ограничения воздушного потока приводят различные клеточно-молекулярные механизмы. В общей клинике известно несколько вариантов воспаления дыхательных путей при ХОБЛ, ассоциированных с особенностями клинического течения и ответа на терапию: эозинофильное, нейтрофильное, пауцигранулоцитарное [22, 23].

Ряд исследований показал отличия клинических проявлений и биомеханизмов профессиональной ХОБЛ от общей [1, 21]. Но особенности патогенеза ХОБЛ в условиях воздействия промышленной пыли, выживаемость больных ПХОБЛ, взаимосвязь выживаемости и биомеханизмов все еще недостаточно изучены. Так как ПХОБЛ – это результат взаимодействия легких как барьерного органа и повреждающих частиц или газов производственной среды [1], то вероятно влияние профессионального фактора на паттерн воспаления и фенотип.

Цель исследования – определить особенности воспаления и прогноза при профессиональной хронической обструктивной болезни легких в условиях воздействия неорганической пыли.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн – проспективное когортное наблюдательное исследование. Основные группы обследуемых: больные ПХОБЛ, сформировавшейся в условиях воздействия неорганической пыли ($n = 101$), пациенты с нормальной функцией легких, работавшие в условиях контакта с неорганической пылью ($n = 51$). Группа сравнения – ХОБЛ у курильщиков табака ($n = 103$). Контрольная группа – условно здоровые лица без профессиональных вредностей ($n = 99$). Диагноз ХОБЛ устанавливали на основании критериев GOLD 2011–2018 [14]. Экспертиза связи ХОБЛ с профессией проведена на базе отделения профессиональной патологии Городской клинической больницы № 2 г. Новосибирска. Гигиенический анализ условий труда выполнен согласно руководству Р.2.2.2006-05 по санитарно-гигиеническим характеристикам условий труда работника, составленным экспертами отдела надзора по гигиене труда, коммунальной гигиене Управления Роспотребнадзора по Новосибирской области, и материалам аттестации рабочих мест, предоставленным работодателями. В группы экспонированных к неорганической пыли включены шихтовщики ($n = 23$), формовщики ручной формовки литейного цеха машиностроительного предприятия (28 человек с ХОБЛ, 51 – без ХОБЛ), составщики шихты ($n = 21$), транспортировщики ($n = 4$), стекловары ($n = 25$) предприятия стекольного производства. Концентрация неорганической пыли в воздухе рабочей зоны составила 2–9,6 ПДК.

Клинические и демографические характеристики обследованных представлены в табл. 1. В исследование не включали больных с другими, кроме ХОБЛ, заболеваниями бронхолегочной системы (допускалось наличие хронического бронхита), воспалительными и онкологическими заболеваниями. Исследование одобрено комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета.

Таблица 1

Характеристика больных ХОБЛ, здоровых рабочих, групп сравнения и контроля

Параметр	Воздействие на рабочем месте неорганической пыли		ХОБЛ табакокурения, <i>n</i> = 103	Контрольная группа, <i>n</i> = 99	<i>p</i>
	ПХОБЛ, <i>n</i> = 101	Здоровые рабочие, <i>n</i> = 51			
Возраст, лет	63,3 ± 4,83	61,4 ± 5,17	62,3 ± 6,82	62,3 ± 4,84	0,14
Количество мужчин, <i>n</i> (%)	87 (86)	45 (85)	82 (80)	78 (79)	0,10
Количество женщин, <i>n</i> (%)	14 (14)	8 (15)	21 (20)	21 (21)	0,10
Раса	Европеоиды				
Стаж работы в условиях воздействия неорганической пыли, лет	26,1 ± 0,82	26,1 ± 1,15	Не применимо		0,61
Стаж работы в условиях воздействия неорганической пыли в дебюте ХОБЛ, лет	17 (10–20)	Не применимо			0,14
Стаж курения, лет	23,4 ± 1,33	25,3 ± 2,56	26,7 ± 0,81	25,5 ± 1,48	0,56
Доля курящих, <i>n</i> (%)	31 (30,7)	17 (33,3)	103 (100,0)	31 (30,1)	0,34
Индекс «пачка/лет»	13,7 ± 1,15	13,1 ± 1,98	17,1 ± 0,63	13,9 ± 1,15	0,001 ¹
ОФВ1/ФЖЕЛ	63,2 ± 2,34	95,2 ± 0,17	59,0 ± 3,20	96,0 ± 1,15	<0,31 ²
ОФВ1, %	58,0 ± 1,72	97,1 ± 2,18	51,1 ± 1,37	102,5 ± 6,18	<0,25 ²
Длительность болезни, лет	11,3 ± 0,37	Не применимо	10,3 ± 0,36	Не применимо	0,64

Примечание. ФЖЕЛ – разница между объемами воздуха в легких в точках начала и конца маневра форсированного выдоха; 1 – достоверное отличие группы ХОБЛ табакокурения, 2 – оценивали достоверность различий между группами больных ХОБЛ.

Всем больным выполнены оценка жалоб, анамнеза, физикальное исследование, оценка статуса курения, частоты обострений ХОБЛ, тяжести одышки (mMRC), спирография с пробой с бронхолитиком (спирограф MicroLab CareFusion, США) [7], бодиплетизмография, исследование диффузионной способности легких для монооксида углерода методом однократного вдоха с задержкой дыхания (DL_{CO}) (бодиплетизмограф Power Cube Body, Schiller AG, Германия). В сыворотке или плазме крови исследованы концентрации провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли альфа (TNFα), интерлейкина 1 бета (IL1β), моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP1), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), компонентов системы репарации тканей: фактора роста фибробластов 2 (FGF2), трансформирующего фактора роста β1 (TGFβ1), фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF А), матриксных металлопротеиназ 1 и 9 изоформ (ММР 1, ММР 9), фермента антиоксидантной защиты экстрацеллюлярной супероксиддисмутазы (SOD3), маркера окислительного стресса 8-изопростагландина F2α (8-изо-PGF2α) методом твер-

дофазного ИФА «сэндвич»-типа (ELISA) (8-канальный планшетный фотометр «Expert Plus», «ASYS HIТЕСН», Австрия) наборами фирм-производителей, стандартная длина волны измерения 450 нм.

Продолжительность наблюдения составила 4,9 ± 0,08 года.

Полученные результаты представлены для непрерывных переменных средним арифметическим и его стандартной ошибкой (*M* ± *m*) при нормальном распределении (метод Колмогорова – Смирнова) либо медианой, максимальным и минимальным значениями при распределении, отличном от нормального, для качественных переменных – долями. Эффекты экзогенного этиологического фактора ХОБЛ определяли методом ковариационного анализа (ANCOVA), межгрупповой план с последующим попарным сравнением групп критерием Данна. Анализ выживаемости выполнен методом Каплана – Майера, сравнение групп – с помощью критерия Гехана. Взаимосвязи определяли методом линейной регрессии с поправкой на авторешаемость. Факторы, ассоциированные с выживаемостью, установ-

лены методом пропорциональных рисков Кокса. В качестве ковариант включали пол, возраст, длительность ХОБЛ и воздействия экзогенного этиологического фактора, индекс «пачка/лет», наличие сердечно-сосудистых заболеваний, число обострений ХОБЛ, объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1). Для оценки потенциальных биомаркеров проводили ROC-анализ. Различия по номинальным переменным определяли с помощью критерия χ^2 . Критический уровень значимости p принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Профессиональная ХОБЛ отличалась от ХОБЛ табакокурения высокими сывороточными концентрациями MCP1, SOD3, FGF2 и 8-изо-PGF2 α , умеренным, но статистически достоверным увеличением содержания IL1 β , MIF, TGF β 1, MMP 1 и MMP 9, снижением уровня VEGF A (табл. 2). У рабочих с нормальной функцией легких концентрация MCP1 и FGF2 в сыворотке крови была достоверно больше, чем в группе контроля, но меньше, чем у больных ПХОБЛ, повышение уровня SOD3 было сопоставимо с результатами группы ПХОБЛ. Таким образом, у лиц, экспонированных к кремнийсодержащей пыли, в сравнении с группой контроля выявлено увеличение сывороточной концентрации: MCP1 (у больных ПХОБЛ – в 3 раза, у рабочих с нормальной функцией легких – в 1,5 раза), SOD3 (у больных ПХОБЛ – в 1,9 раза, у здоровых рабочих – в 1,6

раза), FGF2 (у больных ПХОБЛ – в 6,1 раза, у здоровых рабочих – в 3,9 раза), 8-изо-PGF2 α (у больных ПХОБЛ – в 3,6 раза). Концентрация TNF α в сыворотке крови у больных ХОБЛ независимо от экзогенного этиологического фактора и у рабочих с нормальной функцией легких была больше, чем у здоровых лиц.

В моделях многофакторной линейной регрессии стаж работы в условиях воздействия пыли был независимым предиктором для сывороточной концентрации MCP1 ($R^2 = 0,9$), MIF ($R^2 = 0,9$), FGF2 ($R^2 = 0,7$), MMP9 ($R^2 = 0,8$), SOD3 ($R^2 = 0,7$) у больных ПХОБЛ, для концентрации MCP1 ($R^2 = 0,7$) и FGF2 ($R^2 = 0,8$) у рабочих с сохраненной функцией легких. С максимальной разовой концентрацией пыли был ассоциирован FGF2 ($R^2 = 0,8$ у пациентов с ПХОБЛ и у здоровых рабочих).

При оценке исследуемых факторов в качестве биомаркеров риска ПХОБЛ лучшим предиктором нарушений вентиляционной функции легких был сывороточный уровень FGF2 ($R^2 = 0,8$). У работающих в контакте с кремниевой пылью с максимальной разовой или среднесменной концентрацией в воздухе рабочей зоны от 2 ПДК, при стаже от 10 лет увеличение сывороточной концентрации FGF2 в 6 раз по сравнению с верхней границей значений контрольной группы прогнозировало ПХОБЛ с чувствительностью 82 % и специфичностью 88 %, площадь под ROC-кривой составила 0,87. Из 83 больных ПХОБЛ с повышением уровня FGF2 сыворотки при повторном

Таблица 2

Влияние производственного этиологического фактора на сывороточный уровень молекулярных патогенетических факторов ХОБЛ

Содержание фактора	Воздействие на рабочем месте неорганической пыли		ХОБЛ табакокурения, $n = 103$	Контрольная группа, $n = 99$	F	p
	ПХОБЛ, $n = 101$	Здоровые рабочие, $n = 51$				
TNF α , пг/мл	23,6 \pm 0,54	23,6 \pm 0,54	24,0 \pm 0,50	14,6 \pm 0,20	28,7	< 0,001 ^{3,4,6}
IL1 β , пг/мл	4,7 \pm 0,11	1,5 \pm 0,12	2,7 \pm 0,39	1,1 \pm 0,18	28,9	< 0,001 ^{2,3,4,5}
MCP1, пг/мл	554,8 \pm 2,28	261 \pm 5,29	210,7 \pm 2,18	183,7 \pm 0,72	66,8	< 0,001 ¹
MIF, нг/мл	45,5 \pm 0,23	31,8 \pm 1,47	40,3 \pm 0,73	32,0 \pm 0,26	65,5	< 0,001 ^{2,3,4,5}
FGF2, пг/мл	19,6 \pm 0,35	12,5 \pm 1,13	9,5 \pm 0,23	3,2 \pm 0,01	79,2	< 0,001 ¹
TGF β 1, пг/мл	935,4 \pm 10,56	412,7 \pm 8,05	728,7 \pm 11,62	434,8 \pm 5,29	57,0	< 0,001 ^{2,3,4,5}
VEGF A пг/мл	507,3 \pm 10,85	1115,3 \pm 15,65	857,4 \pm 16,63	1188,2 \pm 19,3	63,7	< 0,001 ^{2,3,4,5}
SOD3, нг/мл	10,8 \pm 0,09	9,1 \pm 0,76	1,6 \pm 0,06	5,6 \pm 0,03	35,0	< 0,001 ^{2,3,4,6}
8-изо-PGF2 α , пг/мл	32,5 \pm 0,42	8,9 \pm 1,09	15,4 \pm 0,48	9,1 \pm 0,47	78,6	< 0,001 ^{2,3,4,5}
MMP 9, нг/мл	0,23 \pm 0,001	0,14 \pm 0,002	0,17 \pm 0,001	0,15 \pm 0,002	59,3	< 0,001 ^{2,3,4,5}
MMP 1, пг/мл	289,4 \pm 1,91	188,5 \pm 2,61	265,1 \pm 1,45	192,0 \pm 1,69	47,1	< 0,001 ^{2,3,4,5}

Примечание. Обозначено отличие при проведении сравнения: 1 – между всеми группами; 2 – между больными ПХОБЛ и ХОБЛ табакокурения; 3 – между больными ПХОБЛ и группой контроля; 4 – между больными ХОБЛ табакокурения и группой контроля, 5 – между больными ПХОБЛ и здоровыми рабочими, 6 – между здоровыми рабочими и группой контроля.

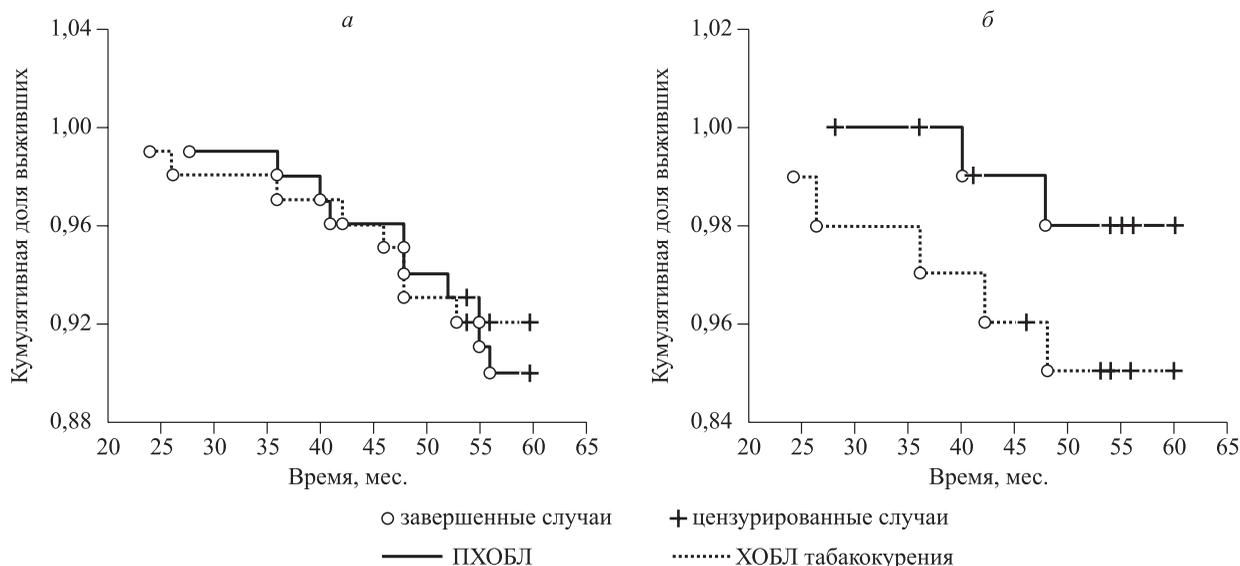


Рис. Анализ выживаемости больных ХОБЛ

обследовании через год у 73 (91,2 %) содержания FGF2 сохранялось в пределах 6-кратного повышения.

Клинико-функциональные отличия ХОБЛ, вызванной воздействием пыли, от ХОБЛ табакокурения включали: низкие значения mMRC ($1,58 \pm 0,101$ и $1,92 \pm 0,087$ балла соответственно, $p < 0,01$), меньшее увеличение легочных объемов (отношение остаточного объема к общей емкости легких (ООЛ/ОЕЛ) $54,8 \pm 4,27$ и $58,6 \pm 5,22$ % соответственно; $p < 0,01$), меньшую тяжесть бронхообструкции (ОФВ1 $58,0 \pm 1,72$ и $51,1 \pm 1,37$ % соответственно; $p < 0,01$), снижение диффузионной способности легких (DL_{CO} $58,8 \pm 5,34$ и $77,9 \pm 5,39$ % соответственно; $p < 0,01$). При рентгенологическом исследовании у больных ПХОБЛ выявляли сочетание эмфиземы и легочного фиброза. Частота обострений при ПХОБЛ была меньше, чем при ХОБЛ табакокурения, – 1,54 и 1,74 на больного в год соответственно, в то время как легочных обострений было больше – 26,7 и 18,4 % соответственно; $p < 0,05$.

Выявлены взаимосвязи молекулярного паттерна воспаления с ремоделированием и функцией бронхолегочной системы больных ПХОБЛ. С ОФВ1 был ассоциирован сывороточный уровень IL1 β ($B = -3,4$; $p = 0,028$). Легочная гиперинфляция, оцененная по отношению ООЛ/ОЕЛ, ожидаемо зависела от содержания MMP 9 ($B = 1,3$; $p = 0,01$). Диффузионная способность легких в наибольшей степени была взаимосвязана с концентрацией FGF2 ($B = -2,4$; $p = 0,001$).

Общая пятилетняя выживаемость не различалась между группами ХОБЛ от действия пыли и ХОБЛ табакокурения – 92,0 и 90,0 % соответственно, $p = 0,102$, но при дифференцированной

оценке выживаемости по основным причинам смерти кумулятивная доля случаев неблагоприятного исхода от пневмонии в группе с профессиональной ХОБЛ была достоверно выше (5 %), чем при ХОБЛ табакокурения (2 %) (рисунок).

По результатам регрессионного анализа риск смерти от внебольничной пневмонии в течение пяти лет у больных профессиональной ХОБЛ повышен в 2,6 раза (отношение рисков 2,6, 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1,24–8,28; $p = 0,038$). С вероятностью неблагоприятного исхода больных профессиональной ХОБЛ ассоциированы стаж работы, максимальная разовая и среднесменная концентрации пыли в воздухе рабочей зоны, сывороточные концентрации MCP1, MMP 9, FGF2 и 8-изо-PGF2 α (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известна роль воспаления, окислительного стресса, дисбаланса системы «протеиназы – антипротеиназы» в развитии профессиональной бронхолегочной патологии [1]. На моделях пневмокониоза показано, что воздействие неорганической пыли приводит к гиперактивации макрофагов, секретирующих провоспалительные цитокины и металлопротеиназы. Особенности взаимодействия частиц пыли и мембран фагоцитов определяют выработку большого количества активных форм кислорода [2]. Проведенное исследование подтвердило ведущую роль макрофагов и окислительного стресса и в патогенезе ПХОБЛ в условиях воздействия неорганической пыли.

Полученные данные выявили отличия биомеханизмов профессиональной ХОБЛ в условиях воздействия неорганической пыли от ХОБЛ таба-

Таблица 3

Факторы, ассоциированные с пятилетней выживаемостью больных ПХОБЛ от действия неорганической пыли

Параметр	Статистика Вальда	Отношение рисков	95%-й ДИ	<i>p</i>
Стаж работы, лет	14,32	1,20	1,13–1,60	< 0,01
Максимальная разовая концентрация пыли в воздухе рабочей зоны, 1 мг/м ³	11,58	1,15	1,04–1,25	< 0,01
Среднесменная концентрация пыли в воздухе рабочей зоны, 1 мг/м ³	4,51	1,25	1,01–1,26	0,034
Сывороточное содержание MCP1, пг/мл	15,24	1,87	1,05–2,15	0,01
Сывороточное содержание MMP 9, нг/мл	12,9	3,32	2,38–14,65	< 0,01
Сывороточное содержание FGF2, пг/мл	11,60	2,60	1,59–5,70	< 0,01
Сывороточное содержание 8-изо-PGF2 α , пг/мл	6,90	1,54	1,11–8,72	< 0,01

кокурения. Для ПХОБЛ было характерно повышение уровня MCP1 – хемокина, секретируемого активированными макрофагами в ответ на неинфекционный агент [25], и других преимущественно макрофагальных цитокинов – IL1 β , MIF [11, 16], SOD3 – фермента антиоксидантной защиты [20], 8-изо-PGF2 α – продукта перекисного окисления липидов мембран [17], FGF2 – профиброзного ростового фактора [9, 18]. Увеличение содержания MCP1 и FGF2 у здоровых рабочих, подвергавшихся воздействию пыли, и дальнейшее нарастание концентрации этих факторов у больных указывают на модифицирующее влияние экзогенных этиологических факторов на биомеханизм ПХОБЛ. Данное предположение подтверждают и выявленные ассоциации уровней молекулярных факторов с длительностью и интенсивностью воздействия пыли.

Молекулярный паттерн воспаления был взаимосвязан с фенотипом ПХОБЛ. Особую роль в условиях воспаления, вызванного воздействием кремневой пыли, по-видимому, играет одновременное повышение выработки металлопротеиназ и профиброзного фактора FGF2, что обуславливает формирование сочетания эмфиземы с выраженным легочным фиброзом и, как следствие, значительное снижение DL_{CO}.

Согласно литературным данным, выживаемость при различных фенотипах ХОБЛ существенно различается – медиана составляет от 3,6 до 9 лет [15, 23]. Наиболее неблагоприятными клинико-патогенетическими вариантами ХОБЛ в общей клинике являются ХОБЛ с частыми обострениями [23] и ХОБЛ с легочной гипертензией [3]. Известные молекулярные предикторы риска смерти больных общей ХОБЛ – это фибриноген [19], С-реактивный белок [12], одновременное повышение содержания в крови нейтрофилов и фибриногена, хемокин-лиганда 18, сурфактант-

ного белка D, С-реактивного белка, белка клеток Клара, IL6, IL8, TNF α [8]. Исследуемая группа больных ПХОБЛ отличалась высокой кумулятивной частотой летальных исходов в связи с пневмонией. Риск смерти был ассоциирован с высокой концентрацией молекулярных факторов, являющихся отличительными особенностями ХОБЛ от действия пыли, – MCP1, MMP 9, FGF2, 8-изо-PGF2 α . Исходя из выявленных взаимосвязей, известных данных о функции цитокинов, риск может быть объяснен особенностями фенотипа. Пневмосклероз сопровождается снижением легочной вентиляции, что способствует уменьшению клиренса микробного аэрозоля и колонизации бактериями. Ухудшение диффузионной способности легких может обуславливать развитие тяжелой дыхательной недостаточности при относительно небольшом объеме инфильтрации. По данным ранее проведенных исследований при ХОБЛ от действия пыли формируется атрофический бронхит, что также снижает локальные защитные механизмы [5].

Таким образом, в исследовании удалось показать взаимосвязь: этиологический производственный фактор – эндотип – фенотип – прогноз.

Перспектива использования исследованных молекулярных факторов в качестве диагностических и прогностических маркеров ранее была установлена для ХОБЛ без учета фенотипа. Так, в мокроте больных ХОБЛ повышено содержание MCP1 и FGF2 [18, 25]. Проведенное исследование дополнительно показало значимость FGF2 у рабочих, экспонированных к кремнийсодержащей пыли в концентрации от 2 ПДК в течение 10 лет и более как маркера риска профессиональной ХОБЛ.

Диагностическая значимость FGF2 может быть объяснена его участием в формировании основного фенотипического признака ПХОБЛ от

действия пыли – пневмофиброза, а также взаимосвязями с другими молекулами воспалительного паттерна. Ростовой фактор FGF2 в легких вырабатывается фибробластами эпителиальной базальной мембраны, эпителиальными, эндотелиальными, гладкомышечными клетками. FGF2 – одна из ключевых молекул системы репарации, его экспрессия усиливается в ответ на повреждение легочной ткани. Взаимодействие FGF2 с рецептором FGF2R на мембране фибробластов и миофибробластов приводит к их пролиферации, дифференцировке и избыточному синтезу коллагена. По данным ряда исследований FGF2 при взаимодействии с провоспалительными цитокинами стимулирует выработку металлопротеиназ, в легких это свойство фактора может способствовать ремоделированию по типу «эмфизема – легочный фиброз» [9]. Не исключено, что повышение уровня FGF2 у больных ПХОБЛ – одна из первых реакций ответа на повреждающее действие пыли. При физиологическом ответе происходит регенерация повреждения, при избыточной выработке FGF2 участвует в ремоделировании легких.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях воздействия неорганической пыли формируется отдельный клинико-патогенетический вариант ХОБЛ. Перспективным маркером высокого риска ПХОБЛ при концентрации пыли в воздухе рабочей зоны 2 ПДК и более и стаже работы 10 лет и более является сывороточная концентрация FGF2. Вероятность неблагоприятного исхода ПХОБЛ от воздействия неорганической пыли прогнозируют стаж работы, интенсивность воздействия промышленного аэрозоля, сывороточная концентрация MCP1, MMP 9, FGF2 и 8-изо-PGF2 α .

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования, науки и инновационной политики Новосибирской области в рамках научного проекта № 77-44-540009 p_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева О.С., Кравченко Н.Ю. Хроническая обструктивная болезнь легких как профессиональное заболевание: факторы риска и проблема медико-социальной реабилитации больных // Рос. мед. журн. 2015. 21. (5). 22–26.
2. Величковский Б.Т. Экологическая пульмонология (роль свободнорадикальных процессов). Екатеринбург: ЕМНЦ, 2003. 141 с.

3. Гайнитдинова В.В., Авдеев С.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких с легочной гипертензией: особенности течения, выживаемость, предикторы летальности // Пульмонология. 2017. 27. (3). 357–365.
4. Измеров Н.Ф., Бухтияров И.В., Прокопенко Л.В., Шуган Е.Е. Реализация глобального плана действий ВОЗ по охране здоровья работающих в Российской Федерации // Мед. труда и пром. экология. 2015. (9). 4–10.
5. Косарев В.В., Жестков А.В., Бабанов С.А., Аверина О.М., Васюков П.А. Иммунопатогенетические особенности профессионального бронхита // Мед. труда и пром. экология. 2012. (9). 22–27.
6. Профессиональные заболевания органов дыхания: национальное руководство / ред. Н.Ф. Измеров, А.Г. Чучалин. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 792 с.
7. Чучалин А.Г., Айсанов З.Р., Чикина С.Ю., Черняк А.В., Калманова Е.Н. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по использованию метода спирометрии // Пульмонология. 2014. (6). 11–24.
8. Celli B.R., Locantore N., Yates J., Tal-Singer R., Miller B.E., Bakke P., Calverley P., Coxson H., Crim C., Edwards L.D., Lomas D.A., Duvoix A., MacNee W., Rennard S., Silverman E., Vestbo J., Wouters E., Agustí A. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2012. 185. (10). 1065–1072.
9. Chanda D., Otoupalova E., Smith S.R., Volckart T., de Langhe S.P., Thannickal V.J. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis // Mol. Aspects Med. 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299718300712?via%3Dihub> (дата обращения: 28.08.2018).
10. Chuchalin A.G., Khaltaev N., Antonov N.S., Galkin D.V., Manakov L.G., Antonini P., Murphy M., Solodovnikov A.G., Bousquet J., Pereira M.H., Demko I.V. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 2014. 9. 963–974.
11. Churg A., Zhou S., Wang X., Wang R., Wright J.L. The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2009. 40. (4). 482–490.
12. Duman D., Aksoy E., Agca M.C., Kocak N.D., Ozmen I., Akturk U.A., Gungor S., Tepetam F.M., Eroglu S.A., Oztas S., Karakurt Z. The utility of inflammatory markers to predict readmissions and mortality in COPD cases with or without eosinophilia // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 2015. 10. 2469–2478.
13. Fishwick D., Sen D., Barber C., Bradshaw L., Robinson E., Sumner J. Occupational chronic obstructive pulmonary disease: a standard of care // Occup. Med. (Lond.). 2015. 65. (4). 270–282.

14. Global Initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2018 report). http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov_WMS.pdf (дата обращения: 27.07.2018).
15. Hjalmsen A., Brenn T., Jongsma Risberg M., Meisler Antonsen K., Kristiansen Benum E., Aaseboe U. Retrospective survival in elderly COPD patients receiving pulmonary rehabilitation; a study including maintenance rehabilitation // BMC Res. Notes. 2014. 7. 210.
16. Husebo G.R., Bakke P.S., Grønseth R., Hardie J.A., Ueland T., Aukrust P., Eagan T.M. Macrophage migration inhibitory factor, a role in COPD // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2016. 311. (1). L1–L7.
17. Kaźmierczak M., Ciebiada M., Pękala-Wojciechowska A., Pawłowski M., Nielepkowicz-Goździńska A., Antczak A. Evaluation of markers of inflammation and oxidative stress in COPD patients with or without cardiovascular comorbidities // Heart Lung Circ. 2015. 24. (8). 817–823.
18. Kranenburg A.R., Willems-Widyastuti A., Mooi W.J., Saxena P.R., Sterk P.J., de Boer W.I., Sharma H.S. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with enhanced bronchial expression of FGF-1, FGF-2, and FGFR-1 // J. Pathol. 2005. 206. 28–38.
19. Mannino D.M., Tal-Singer R., Lomas D.A., Vestbo J., Graham Barr R., Tetzlaff K., Lowings M., Rennard S.I., Snyder J., Goldman M., Martin U.J., Merrill D., Martin A.L., Simeone J.C., Fahrback K., Murphy B., Leidy N., Miller B. Plasma fibrinogen as a biomarker for mortality and hospitalized exacerbations in people with COPD // Chronic Obstr. Pulm. Dis. (Miami). 2015. 2. (1). 23–34.
20. Montaña M., Cisneros J., Ramírez-Venegas A., Pedraza-Chaverri J., Mercado D., Ramos C., Sansores R.H. Malondialdehyde and superoxide dismutase correlate with FEV₁ in patients with COPD associated with wood smoke exposure and tobacco smoking // Inhal. Toxicol. 2010. 22. (10). 868–874.
21. Paulin L.M., Diette G.B., Blanc P.D., Putcha N., Eisner M.D., Kanner R.E., Belli A.J., Christenson S., Tashkin D.P., Han M., Barr R.G., Hansel N.N. Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2015. 191. (5). 557–565.
22. Pavord I.D., Lettis S., Locantore N., Pascoe S., Jones P.W., Wedzicha J.A., Barnes N.C. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/long-acting β -2 agonist efficacy in COPD // Thorax. 2016. 71. (2). 118–125.
- Suissa S., Dell'Aniello S., Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality // Thorax. 2012. 67. (11). 957–963.
- The Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare data viz. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/> (дата обращения: 27.07.2018).
- Victoni T., Gleonnec F., Lanzetti M., Tenor H., Valença S., Porto L.C., Lagente V., Boichot E. Roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition in airway epithelial cells // PLoS One. 2014. 9. (1). e85243.

INFLAMMATION CELL-MOLECULAR FEATURES AND SURVIVAL IN PATIENTS WITH OCCUPATIONAL CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE FROM SILICA DUST EXPOSURE

**Lyubomir Ivanovich AFTANAS¹, Lyubov Anatolievna SHPAGINA²,
Olga Sergeevna KOTOVA², Ilya Semenovich SHPAGIN²,
Galina Vladimirovna KUZNETSOVA², Lyudmila Alekseevna PANACHEVA²,
Natal'ya Vadimovna KAMNEVA², Svetlana Mikhaylovna ERIKHOVA²**

¹ *Research Institute of Physiology and Basic Medicine
630017, Novosibirsk, Timakov str., 2*

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

Objective – to establish the inflammation features and 5-years survival in occupational chronic obstructive pulmonary disease (COPD) from silica dust exposure. **Material and methods.** It was an observational prospective cohort study. Occupational COPD patients ($n = 101$) and healthy workers ($n = 51$) exposed to silica dust enrolled. Comparison group – tobacco smokers with COPD ($n = 103$). Control group – healthy people without occupational health risks ($n = 99$). COPD was diagnosed according to GOLD 2011–2018 criteria. Groups were matched by length of service, smoking status, demographic characteristics. Levels of inflammatory cytokines, oxidative stress markers and metalloproteinases were measured in serum by enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical analysis - ANCOVA and multiple linear regression. Survival was analyzed using Kaplan – Meier method and Cox proportional hazard regression. **Results.** Occupational COPD was characterized by high serum levels of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), extracellular superoxide dismutase (SOD3), fibroblast growth factor 2 (FGF2) and 8-iso-prostaglandin F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}). In healthy workers exposed to silica dust an increase in FGF2, MCP1 and SOD3 was revealed. In multiple regression models length of service and dust concentrations in the workplace air were associated with molecular factors. Inflammation features were associated with lung remodeling and function. Serum level of IL1β was associated with forced expiratory volume in 1 second ($B = -3.4$; $p = 0.028$), MMP 9 content – with residual volume ratio to total lung capacity ($B = 1.3$; $p = 0.01$) and FGF2 content – with diffusing lung capacity to CO ($B = -2.4$; $p = 0.001$). The 5-year cumulative death rate from pneumonia was higher in COPD due to dust when compared with tobacco smokers COPD (5 and 2 % respectively), while there was not differences in all cause survival. Multivariate analysis revealed that length of service, dust concentrations in the workplace air, serum concentration of MCP1, MMP 9, FGF2 and 8-изо-PGF_{2α} are significantly associated with mortality. **Conclusion.** Occupational COPD from silica dust exposure is a specific endotype characterized by high risk of mortality from pneumonia. In workers exposed to dust for more than 10 years FGF2 is a perspective biomarker of high occupational COPD risk.

Key words: occupational chronic obstructive pulmonary disease, phenotype, endotype, survival, inorganic silica dust.

Aftanas L.I. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, director, e-mail: iph@physiol.ru

Shpagina L.A. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of internal medicine and medical rehabilitation, e-mail: lashpagina@gmail.com

Kotova O.S. – candidate of medical sciences, assistant professor of department of internal medicine and medical rehabilitation, e-mail: ok526@yandex.ru

Shpagin I.S. – candidate of medical sciences, assistant of department of internal medicine and hematology, e-mail: mkb-2@yandex.ru

Kuznetsova G.V. – candidate of medical sciences, assistant of department of internal medicine and medical rehabilitation, e-mail: mkb-2@yandex.ru

Panacheva L.A. – doctor of medical sciences, professor of the department of internal medicine and medical rehabilitation, e-mail: mkb-2@yandex.ru

Kamneva N.V. – assistant of department of internal medicine and medical rehabilitation, e-mail: mkb-2@yandex.ru

Erikhova S.M. – postgraduate student of department of internal medicine and medical rehabilitation, e-mail: mkb-2@yandex.ru

БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ КАРДИОНЕКРОЗА В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА

Михаил Иванович ВОЕВОДА^{1,2,3}, Наталья Николаевна ЯРОХНО¹,
Маргарита Витальевна КРУЧИННИНА^{1,4}, Юлия Игоревна РАГИНО¹,
Владимир Николаевич КРУЧИННИН⁵, Константин Юрьевич НИКОЛАЕВ^{1,3}

¹ *НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

² *ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10*

³ *Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2*

⁴ *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52*

⁵ *Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13*

Целью настоящего исследования явилось сопоставление и анализ эффективности белковых маркеров некроза миокарда – сердечного белка, связывающего жирные кислоты (сБСЖК) и МВ-фракции креатинфосфокиназы (МВ-КФК) в динамике острого коронарного синдрома. **Материал и методы.** Проведено обследование 49 пациентов ($57,1 \pm 11,0$ года), в том числе 36 мужчин (73,5 %), поступивших в Городскую клиническую больницу № 34 г. Новосибирска с подозрением на острый коронарный синдром. Содержание сБСЖК в цельной венозной крови оценивали у всех пациентов при поступлении в стационар с помощью иммунохроматографического экспресс-теста «КардиоБСЖК» (НПО «Биотест», г. Новосибирск) с чувствительностью 15 нг/мл. Концентрацию МВ-КФК в крови определяли многократно в первые 48 ч от начала клинических проявлений заболевания с использованием иммунохемилюминесцентного анализа. **Результаты и их обсуждение.** У пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) уровень МВ-КФК через 6–24 ч, а также через 24–48 ч от начала боли был существенно выше, чем у больных без ИМ. Содержание сБСЖК ≥ 15 нг/мл, определенное у большинства пациентов в первые 6 ч от начала болевого синдрома, зафиксировано значительно чаще при ИМ, чем в его отсутствие. С помощью парциального корреляционного анализа определено, что возраст влиял на связь ИМ с МВ-КФК через 6–24 ч от начала боли (что, вероятно, связано с увеличением влияния ряда факторов, модулирующих уровень белковых кардиомаркеров, с возрастом), а корреляция ИМ с МВ-КФК через 24–48 ч от начала боли от этого фактора не зависела ($r = 0,322$, $p = 0,046$). В регрессионной модели ($\chi^2 = 13,6$; $p = 0,001$) выявлено, что уровень сБСЖК 15 нг/мл и более независимо от возраста ($p = 0,006$) ассоциирован с наличием у пациентов ИМ, что подтверждает сведения о высокой значимости выявления данного уровня сБСЖК в ранней диагностике ИМ.

Ключевые слова: белковые маркеры, кардионекроз, острый коронарный синдром, динамика, возраст.

Воевода М.И. – д.м.н., проф., академик РАН, руководитель НИИТПМ, зам. директора по научной работе ИЦиГ СО РАН, проф. кафедры фундаментальной медицины НГУ

Ярохно Н.Н. – д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории неотложной терапии

Кручинина М.В. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней

Рагино Ю.И. – д.м.н., проф., член-кор. РАН, зам. руководителя по научной работе, главный научный сотрудник лаборатории клинических, биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний

Кручинин В.Н. – к.х.н., научный сотрудник лаборатории эллисометрии

Николаев К.Ю. – д.м.н., главный научный сотрудник, зав. лабораторией неотложной терапии, проф. кафедры внутренних болезней

Известно, что около 50 % пациентов с подозрением на острый коронарный синдром (ОКС) в момент госпитализации не имеют диагностических изменений ЭКГ [5]. Кроме того, достаточно часто встречаются атипичные и малосимптомные (безболевые) варианты дебюта инфаркта миокарда (ИМ), которые приводят к диагностическим ошибкам и являются частой причиной задержки начала адекватного лечения. Поэтому особенно важно своевременно и тщательно обследовать для выявления ИМ тот контингент пациентов, у которого вероятность атипичного начала заболевания особенно велика [1].

Различные рекомендации и стандарты медицинской помощи больным с ИМ включают обязательное исследование белковых маркеров некроза миокарда. Однако практическое применение рекомендованных кардиомаркеров в ранней диагностике острого ИМ имеет ряд существенных недостатков вследствие низкой специфичности (миоглобин) и относительно позднего повышения (тропонины) [3]. В настоящее время определено, что сердечный белок, связывающий жирные кислоты (сБСЖК), является цитоплазматическим белком, который при нарушении целостности кардиомиоцитов быстро поступает в кровь, и его содержание может служить диагностическим признаком ишемии миокарда. В проведенных ранее исследованиях установлено, что динамика нарастания содержания сБСЖК наиболее выражена в первые часы после развития ОКС, так что он может быть использован для ранней диагностики ИМ [3, 6, 7]. Однако в большинстве ранее проведенных исследований по диагностике ОКС сБСЖК сопоставлялся с тропонинами. Так, в многоцентровом российском исследовании «ИС-ПОЛИН» у 1049 пациентов, госпитализированных с подозрением на ОКС со сроком клинических проявлений от 1 до 12 ч, чувствительность теста на сБСЖК при диагностике ИМ была выше таковой теста на тропонин I на 19–73 % [2]. При этом недостаточно изучена диагностическая значимость сБСЖК в сравнении с другим «золотым стандартом» кардионекроза, МВ-фракцией креатинфосфокиназы (МВ-КФК). В связи с этим целью настоящего исследования явилось сопоставление содержания в крови белковых маркеров некроза миокарда сБСЖК и МВ-КФК в динамике острого коронарного синдрома.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включено 49 пациентов, поступивших в Городскую клиническую больницу № 34 г. Новосибирска с подозрением на ОКС. Средний возраст пациентов составил 57,1 ±

± 11,0 года ($M \pm SD$), среди них было 36 мужчин (73,5 %). Критериями включения в исследование являлись: возраст старше 18 лет; наличие типичного приступа ангинозных болей длительностью более 20 мин или его эквивалентов, сопровождающегося или не сопровождающегося изменениями на ЭКГ; временной промежуток от 1 до 12 ч от начала ангинозного приступа; подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения служили: перенесенный в предшествующие 30 сут ИМ; перенесенное острое нарушение мозгового кровообращения за 30 дней до включения в исследование; тяжелое нарушение функции почек (скорость клубочковой фильтрации менее 30 мл/мин); хирургические вмешательства за 30 дней до включения в исследование; обширные ожоги 2–3-й степени, массивные ранения и травмы в предыдущие 30 дней; чрескожные коронарные вмешательства или электроимпульсная терапия, выполненные в предшествующие 30 дней до включения в исследование; беременность или период лактации; злокачественные новообразования 4-й стадии. У 38 пациентов (77,5 %) верифицирован ИМ, у 11 (22,5 %) его не выявлено. Среди больных без ИМ у девяти (18,4 %) диагностирована нестабильная стенокардия, у одного (2,0 %) – тромбоэмболия легочной артерии и у одного (2,0 %) – ухудшение артериальной гипертензии.

Исследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики НИИ терапии и профилактической медицины (протокол № 15 от 10.04.2018). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Содержание сБСЖК в цельной венозной крови оценивалось у всех пациентов при поступлении в стационар с помощью иммунохроматографического экспресс-теста «КардиоБСЖК» (НПО «Биотест», г. Новосибирск), чувствительность которого составляет 15 нг/мл [6]. Определение МВ-КФК проводилось многократно в промежутках времени 1–3, 3–6, 6–24 и 24–48 ч от начала клинических проявлений заболевания с использованием иммунохемилюминесцентного анализа.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью пакета программ SPSS 10.05. Характер распределения количественных признаков определяли методом Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), при сравнении использовали t -тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычисляли медиану (Me), нижний (Q_1) и верхний (Q_3) квартили, при сравнении использовали тест Манна – Уитни.

Связи между признаками оценивали с помощью парциального корреляционного анализа и бинарной логистической регрессии. При оценке качественных признаков использовали критерий χ^2 . Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице представлены результаты сопоставления пациентов с наличием и отсутствием ИМ. Они не различались по возрасту и доле больных мужского пола. Выявлено, что у пациентов с ИМ уровень МВ-КФК через 6–24 ч, а также через 24–48 ч от начала боли был существенно выше, чем у больных без ИМ. Содержание сБСЖК 15 нг/мл и более, определенное у большинства пациентов в первые 6 ч от начала болевого синдрома, зафиксировано значительно чаще при ИМ, чем в его отсутствие. Для оценки влияния возраста на ассоциации ИМ с МВ-КФК через 6–24 и 24–48 ч от начала боли проведен парциальный корреляционный анализ. Определено, что возраст влиял на связь ИМ с МВ-КФК через 6–24 ч от начала боли (ассоциация теряла достоверность при включении переменной возраста в модель анализа – $r = 0,200$; $p = 0,229$), а корреляция ИМ с МВ-КФК через 24–48 ч от начала боли от этого фактора не зависела ($r = 0,322$; $p = 0,046$). С помощью бинарной логистической регрессии оценено влияние возраста пациентов на связь ИМ с уровнем сБСЖК 15 нг/мл и более, и в регрессионной

модели ($\chi^2 = 13,6$; $p = 0,001$) выявлено, что последний независимо от возраста ($p = 0,006$) ассоциирован с наличием у пациентов ИМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время для диагностики ИМ рекомендуется максимально быстрое определение белковых маркеров кардионекроза с высокой чувствительностью и специфичностью, таких как сердечные тропонины и МВ-КФК [8, 10]. Однако их диагностические значения достигаются, как правило, не ранее чем через 6–8 ч от начала заболевания, что подтверждается результатами настоящего исследования. Нами продемонстрировано повышенное содержание МВ-КФК у пациентов с ИМ через 6–48 ч после начала болевого синдрома по сравнению с больными без ИМ. Однако на прямую связь ИМ с концентрацией МВ-КФК через 6–24 часа от начала клинических проявлений заболевания существенно влиял возраст пациента. Вероятно, это связано с тем, что с возрастом увеличивается влияние ряда факторов, модулирующих уровень белковых кардиомаркеров. К этим факторам относятся сердечная недостаточность, тахикардии, гипотиреоз, скорость клубочковой фильтрации и др. [4, 9, 11]. Полученные нами данные подтверждают сведения о высокой значимости выявления уровня сБСЖК 15 нг/мл и более в ранней диагностике ИМ [3, 6, 9]. Следует отметить, что сведений об отсутствии влияния на этот белковый кардиомаркер возрастного фактора в литературе мы не обнаружили.

Таблица

Результаты сопоставления уровня МВ-КФК, сБСЖК в динамике у пациентов с наличием или отсутствием ИМ

Показатель	Пациенты с ИМ ($n = 38$)	Пациенты без ИМ ($n = 11$)	p
Возраст, лет ($M \pm SD$)	56,3 \pm 10,0	59,6 \pm 14,2	0,383
Мужской пол, n (%)	30 (78,9)	6 (54,5)	0,112
Содержание МВ-КФК через 1–3 ч от начала боли, Ед/л	31,5 [22,7; 43,7]	23,7 [13,6; 67,6]	0,536
Содержание МВ-КФК через 3–6 ч от начала боли, Ед/л	27,6 [20,5; 42,0]	14,7 [13,5; 51,3]	0,210
Содержание МВ-КФК через 6–24 ч от начала боли, Ед/л	109,9 [43,9; 191,0]	18,0 [14,6; 48,7]	0,018
Содержание МВ-КФК через 24–48 ч от начала боли, Ед/л	90,3 [37,3; 192,6]	17,5 [14,2; 21,3]	< 0,001
Время от начала боли до определения сБСЖК, мин	262,5 [154,2; 315,0]	257,0 [166,0; 350,0]	0,783
Содержание сБСЖК 15 нг/мл и более, n (%)	25 (65,8)	1 (9,1)	< 0,001

Примечание. Содержание МВ-КФК и время от начала боли до определения сБСЖК представлено медианой и верхним и нижним квартилями (Me [Q1; Q3]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, раннее повышение уровня сБСЖК до 15 нг/мл и более, определяемое у большинства пациентов с ИМ в первые 6 ч от начала болевого синдрома, отмечается значительно чаще, чем у больных без ИМ. При этом в отличие от другого белкового кардиомаркера МВ-КФК, содержание которого увеличивается при кардионекрозе позднее, на ассоциацию сБСЖК с ИМ возрастной фактор не оказывает существенного влияния. В связи с полученными результатами представляется перспективным исследование других тканеспецифических макромолекул, в частности мРНК, при остром инфаркте миокарда во временном диапазоне.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи декларируют, что не имеют конфликта интересов, связанных с материалами данной статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания по интеграционному проекту (0324-2018-0040) «Разработка новых способов экспресс-диагностики заболеваний человека на основе детекции органоспецифических маркеров с помощью современных физических и физико-химических подходов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зырянова А.В., Ярошно Н.Н., Николаев К.Ю. Эффективность иммунохроматографического теста определения белка, связывающего жирные кислоты, при ранней дифференциальной диагностике острого коронарного синдрома // Патол. кровообращения и кардиохирургия. 2010. (4). 46–50.

2. Мартынов А.И., Воевода М.И., Арутюнов Г.П., Кокорин В.А., Спасский А.А. Клиническая эффективность ранней диагностики острого инфаркта миокарда с помощью белка, связывающего жирные кислоты // Рос. кардиол. журн. 2012. 17. (3). 7–11.

3. Мартынов А.И., Спасский А.А., Арутюнов Г.П., Велиев С.Н., Воевода М.И., Гафаров В.В., Герасимов С.П., Кокорин В.А., Карпов Р.С., Марков В.А., Михайлов А.А., Николаев К.Ю., Петро-

ва М.М., Рагино Ю.И., Штегман О.А., Шульман В.А., Ярошно Н.Н. Ранняя экспресс-диагностика острого инфаркта миокарда // Терапия. 2015. (3). 13–26.

4. Николаева А.А., Лифшиц Г.И., Штеренталь И.Ш., Пиковская Н.Б., Николаев К.Ю. Особенности нейроэндокринных нарушений регуляции при остром инфаркте миокарда в зависимости от тяжести течения заболевания // Кардиология. 1993. 33. (11). 60–63.

5. Рагозина А.С., Петренко И.В., Урванцева И.А., Горьков А.И., Николаев К.Ю. Оценка уровня кардиомаркеров и функционального состояния миокарда у пациентов с реканализацией хронических окклюзий коронарных артерий при применении нагрузочных доз аторвастатина // Комплекс. пробл. серд.-сосуд. заболеваний. 2018. 7. (1). 29–35.

6. Ярошно Н.Н., Зырянова А.В., Николаев К.Ю. Определение сердечного белка, связывающего жирные кислоты, при остром инфаркте миокарда с помощью качественного иммунохроматографического теста // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2009. (4). 24–27.

7. Bivona G., Agnello L., Bellia C., Lo Sasso B., Ciaccio M. Diagnostic and prognostic value of H-FABP in acute coronary syndrome: Still evidence to bring // Clin. Biochem. 2018. 58. 1–4.

8. Ibáñez B., James S., Agewall S., Antunes M.J., Bucciarelli-Ducci C., Bueno H., Caforio A.L.P., Crea F., Goudevenos J.A., Halvorsen S., Hindricks G., Kastrati A., Lenzen M.J., Prescott E., Roffi M., Valgimigli M., Varenhorst C., Vranckx P., Widimský P. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation // Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed). 2017. 70. (12). 1082–1093.

9. Kokorin V.A., Arefiev M.N., Levchouk N.N., Gordeev I.G. Diagnostic characteristics of the qualitative bedside heart-type fatty acids binding protein tests compared to cardiac troponin assays in patients with suspected acute coronary syndrome // Pol. Arch. Intern. Med. 2018. 128. (10). 623–625.

10. Kozinski M., Krintus M., Kubica J., Sypniewska G. High-sensitivity cardiac troponin assays: From improved analytical performance to enhanced risk stratification // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2017. 54. (3). 143–172.

11. Xu L.Q., Yang Y.M., Tong H., Xu C.F. Early diagnostic performance of heart-type fatty acid binding protein in suspected acute myocardial infarction: Evidence from a meta-analysis of contemporary studies // Heart Lung. Circ. 2018. 27. (4). 503–512.

PROTEIN MARKERS OF CARDIONECROSIS IN THE DYNAMICS OF ACUTE CORONARY SYNDROME

Mikhail Ivanovich VOEVODA^{1,2,3}, Natalya Nikolaevna YAROKHNO¹,
Margarita Vitalyevna KRUCHININA^{1,4}, Yuliya Igorevna RAGINO¹,
Vladimir Nikolaevich KRUCHININ⁵, Konstantin Yuryevich NIKOLAEV^{1,3}

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS

630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

² Institute of Cytology and Genetics of SB RAS

630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 10

³ Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

⁴ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia

630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

⁵ Rzhanov Institute of Semiconductor Physics of SB RAS

630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 13

The aim of this study was to compare and analyze the effectiveness of protein markers of myocardial necrosis – heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) and the MB fraction of creatine phosphokinase (CPK-MB) in the dynamics of acute coronary syndrome. **Material and methods.** A total of 49 patients ($57.1 \pm 11,0$ years) were examined, including 36 male patients (73.5 %) who were admitted to the City Clinical Hospital No. 34 of Novosibirsk with suspected acute coronary syndrome. The content of H-FABP in whole venous blood was evaluated for all patients upon admission to the hospital with the means of the immunochromatographic rapid test «CardioPBFA» (NPO «Biotest», Novosibirsk) with a sensitivity of 15 ng/ml. Determination of CPK-MB was carried out repeatedly in the first 48 hours from the beginning of the clinical manifestations of the disease, using immunochemiluminometric assay. **Results and discussion.** It was revealed that in patients with myocardial infarction (MI), CPK-MB content after 6–24 hours and also after 24–48 hours from the onset of pain was significantly higher than in patients without MI. H-FABP content 15 ng/ml and more, determined in the majority of patients in the first 6 hours from the onset of pain, was recorded much more often in MI presence than in MI absence. Using partial correlation analysis, it was determined that age influenced the association of MI with CPK-MB 6–24 hours after the onset of pain (which is probably due to the increase in the influence of a number of factors modulating the level of protein cardiac markers with age), and the correlation of MI with CPK-MB in 24–48 hours from the onset of pain did not depend on this factor ($r = 0.322$; $p = 0.46$). In the regression model ($\chi^2 = 13.6$; $p = 0.001$) it was revealed that H-FABP content 15 ng/ml and more regardless of age ($p = 0.006$) is associated with the presence of MI in the patients, which confirms information about the high significance of identifying this H-FABP level in early diagnosis of myocardial infarction.

Key words: protein markers, cardiac necrosis, acute coronary syndrome, dynamics, age.

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, head of Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, deputy director of the Institute of Cytology and Genetics, professor of department of fundamental medicine

Yarokhno N.N. – doctor of medical sciences, associate professor, senior researcher of laboratory of emergency treatment

Kruchinina M.V. – doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory of gastroenterology, associate professor of department of internal diseases

Ragino Yu.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, deputy director, leading researcher of laboratory of clinical, biochemical and hormonal studies of therapeutic diseases

Kruchinin V.N. – candidate of chemical sciences, researcher of laboratory of ellipsometry

Nikolaev K.Yu. – doctor of medical sciences, leading researcher, head of laboratory of emergency treatment

ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ПАТОГЕНЕТИКЕ ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Сергей Александрович АФАНАСЬЕВ¹, Мария Владимировна ГОЛУБЕНКО²,
Людмила Петровна ЦАПКО¹, Валерий Павлович ПУЗЫРЕВ²

¹ НИИ кардиологии Томского НИМЦ
634050, г. Томск, ул. Киевская, 111а

² НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ
634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Изучение причин и процессов, приводящих к внезапной смерти, – одна из важнейших задач кардиологии. Данные многочисленных исследований указывают на то, что значительную роль в патогенезе внезапной смерти играет дисфункция митохондрий. Недостаток АТФ, избыток активных форм кислорода и нарушение ионного баланса в митохондриях могут вызывать развитие жизнеугрожающей аритмии. Митохондриальная ДНК, кодирующая некоторые субъединицы дыхательной цепи митохондрий, характеризуется значительным полиморфизмом в популяциях человека. Показано, что распространенные в популяции варианты мтДНК могут влиять на интенсивность клеточного дыхания. Кроме того, получены данные об ассоциации полиморфизма мтДНК с предрасположенностью к различным заболеваниям сердечно-сосудистой системы, в том числе к состояниям, связанным с высоким риском внезапной смерти. Эти особенности энергетического метаболизма, характеризующие различные генотипы мтДНК, не оказывают существенного влияния на функцию миокарда в норме, но могут оказаться критически важными в условиях острой ишемии. Таким образом, митохондриальный геном можно рассматривать как одну из важных составляющих в патогенетике внезапной сердечной смерти.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, полиморфизм, внезапная сердечная смерть, митохондрии, окислительный стресс.

В современном обществе среди причин общей смертности населения сердечно-сосудистые заболевания продолжают удерживать печальное первенство. При этом от четверти до половины случаев смерти лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями относят к так называемой внезапной сердечной смерти (ВСС) [14, 15]. Патологии сердечно-сосудистой системы составляют подавляющее большинство случаев внезапной смерти у спортсменов [1, 38]. По этой причине ВСС вполне обоснованно следует считать одной из важнейших проблем кардиологии. Именно с этой позиции ВСС рассматривается и в монографии Е.В. Шляхто с соавт. [4]. Несмотря на достаточно многочисленные обзоры по ВСС и описания клинических случаев, в реальных ситуациях врачи часто оказываются в ситуациях, когда

применение уже известных алгоритмов оценки риска ВСС оказывается неэффективным. В связи с этим стоит признать, что проблема ВСС далека от решения, и утверждение о необходимости поиска новых факторов и причин, определяющих риск ВСС, является полностью обоснованным [11, 27].

Функционирование сердца в условиях физического или психоэмоционального напряжения сопровождается дополнительными нагрузками на энергетический метаболизм кардиомиоцитов и в первую очередь систем, ответственных за синтез АТФ. Очевидно, что без наличия необходимого количества АТФ невозможно обеспечить повышение частоты и силы сердечных сокращений. Возникновение острого дефицита АТФ, в том числе при ишемии, может привести к жизне-

Афанасьев С.А. – д.м.н., проф., зав. лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики,
e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru

Голубенко М.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики,
e-mail: maria-golubenko@medgenetics.ru

Цапко Л.П. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, E mail: lpc@cardio-tomsk.ru

Пузырев В.П. – д.м.н., проф., академик РАН, научный руководитель НИИ медицинской генетики,
e-mail: p.valery@medgenetics.ru

угрожающим аритмиям и стать причиной ВСС, причем без значимых морфологических изменений сердца. Таким образом, недостаточность основной функции митохондрий – выработки энергии – играет ключевую роль в детерминации исхода острой ишемии миокарда.

В настоящем обзоре функциональная несостоятельность хондриома кардиомиоцитов рассматривается как один из факторов риска внезапной сердечной смерти.

МНОГОФАКТОРНАЯ ПРИРОДА ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ

Согласно документам ВОЗ, внезапной сердечной смертью считается прекращение работы сердца у лиц с известной или неизвестной ранее кардиальной патологией, если она наступает в течение одного часа после первых угрожающих симптомов. Отмечено, что причины развития ВСС в детском возрасте и у взрослых лиц различаются. Для взрослого населения ВСС наиболее часто связывают с двумя факторами. К наиболее значимым относится ишемическое поражение миокарда в форме ишемической болезни сердца или инфаркта. Следующим фактором, способным провоцировать ВСС, являются нарушения ритма сердца. Для этой формы ВСС даже введен термин «внезапная аритмическая смерть» [10]. В детском и молодом возрасте среди причин ВСС преобладают аномалии развития сердца, врожденные нарушения ритма сердца и гипертрофическая кардиомиопатия [12, 14, 22].

Обращаясь к проблеме определения риска развития ВСС, большинство исследователей отмечает необходимость анализа отдельных факторов, способных провоцировать ВСС, а также важность дифференцированной оценки их значимости у конкретного пациента. Это в полной мере можно отнести и к генетическим предикторам ВСС. Такой подход хорошо согласуется со сложившейся практикой работы с генами, способными быть предикторами сердечно-сосудистых заболеваний. Уже отмечалось, что для взрослой популяции ишемическое поражение миокарда является значимой причиной ВСС. Поэтому неудивительно, что мутации и полиморфизмы генов, ассоциированные с развитием ишемической болезни сердца, были проанализированы и в отношении их сопряженности с ВСС. Этому вопросу посвящено достаточно много отечественных и зарубежных обзоров, а также оригинальных исследований [9, 17, 19, 20, 45, 46].

Хорошо известно, что большинство патологий сердечно-сосудистой системы полигенны и,

соответственно, могут быть обусловлены комбинацией генетических полиморфизмов, физических и других факторов. Представляется, что это обстоятельство в полной мере может быть отнесено и к генетическим предикторам ВСС. Так, для полиморфизма rs1800588 гена *HL* показана сопряженность с состоянием липидного обмена и, следовательно, с развитием ишемической болезни сердца [20]. Однако статистически значимого результата при оценке сопряженности носительства этого генотипа с ВСС не получено [9]. Данный отрицательный результат, на наш взгляд, только подтверждает сложность поиска генетических предикторов ВСС. Функция сердца как органа, обеспечивающего циркуляцию крови, зависит от состоятельности энергетического метаболизма кардиомиоцитов – в том числе уже на уровне митохондрий [2, 8].

АРИТМОГЕННАЯ РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ

Функциональная состоятельность миокарда предполагает согласованную работу всех систем, вовлеченных в процесс электромеханического сопряжения каждого кардиомиоцита. Поэтому основными потребителями АТФ в этих клетках являются контрактильные белки и системы ионного транспорта [39]. При этом на ионные каналы в кардиомиоцитах тратится около четверти всего АТФ [49]. Обеспечение синтеза АТФ является, таким образом, критическим для функции миокарда. Митохондрии отвечают за 95 % синтеза АТФ в кардиомиоцитах и занимают до 30 % объема этих клеток [29].

Острая ишемия миокарда приводит к резкому истощению запасов АТФ, и исход этого периода зависит как от действия защитных механизмов, направленных на экономию АТФ, так и от имеющегося запаса АТФ в клетках, величина которого зависит от эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях. Даже умеренное разобщение дыхательной цепи приводит к снижению синтеза АТФ и потенциально увеличивает вероятность неблагоприятных последствий ишемии. Кроме влияния на сократительную способность миокарда, снижение синтеза АТФ в митохондриях и увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) ведут к нарушению регуляции ионного баланса (открытие калиевых каналов, снижение поступления в клетку натрия и кальция) и деполяризации митохондриальных мембран. Эти процессы оказывают критический эффект на проведение электрического импульса в миокарде, т.е. непосредственно связаны с развитием жизнеугрожающих аритмий [48].

В настоящее время и на экспериментальных моделях, и в клинике убедительно показано, что неконтролируемое развитие свободнорадикальных процессов является важным элементом патогенеза ишемического поражения клеток и их органелл. При сердечной недостаточности ишемического генеза, характеризующейся высоким риском ВСС, показана повышенная продукция АФК в митохондриях кардиомиоцитов [25]. В этих условиях использование препаратов, снижающих синтез АФК в митохондриях, устраняет риск ВСС. Вполне вероятно, что в основе этого эффекта может лежать сохранение мембран митохондрий и работоспособности сопряженных с ними ферментативных систем. Действительно, показано, что использование ряда антиоксидантов, в частности пластохинонилдецилтрифенилфосфонид (SkQ1), препятствует окислению АФК митохондриального кардиолипина [3, 16].

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ И КЛЕТЧНОЕ ДЫХАНИЕ

Исследования особенностей клеточного дыхания в зависимости от генотипа мтДНК могут позволить выявить новые аспекты, определяющие роль митохондрий в ВСС. Для этих исследований используют специальный подход, заключающийся в создании так называемых цибридных клеточных линий: в культуре клеток разрушают мтДНК путем инкубации с бромистым этидием и затем «заселяют» клетки митохондриями из тромбоцитов индивидов с другим генотипом мтДНК. Таким образом получают клеточные линии, имеющие одинаковый ядерный геном, но различающиеся по генотипу мтДНК. Чаще всего изучают особенности функции дыхательной цепи у представителей различных гаплогрупп – крупных «ветвей» на родословном древе мтДНК человека, которые принято обозначать латинскими буквами. Каждая гаплогруппа характеризуется совокупностью нуклеотидных замен в последовательности мтДНК, в том числе аминокислотных замен, а также вариантов генов рибосомных и транспортных РНК, которые могут влиять и на эффективность белкового синтеза в митохондриях, и на функцию субъединиц дыхательной цепи, кодируемых мтДНК. Проведенные эксперименты продемонстрировали, что гаплогруппа J мтДНК ассоциирована с более низким уровнем продукции как АТФ, так и АФК, чем гаплогруппа H; также выявлены различия в экспрессии некоторых ядерных генов, вовлеченных в различные биохимические пути (апоптоз, воспаление, система комплемента) [32, 33]. Цибридные линии с гаплогруппой J имели также более высокую скорость

роста, по сравнению с H, в том числе при воздействии сублетальных доз ультрафиолетового излучения [37]. Гаплогруппа T была ассоциирована с более высоким по сравнению с гаплогруппой H числом копий мтДНК в клетке, большей скоростью роста культуры и меньшей чувствительностью к окислительному стрессу, однако при этом активность комплексов I–V дыхательной цепи не различалась между двумя генотипами [40]. Сравнение параметров клеточного дыхания в цибридных линиях с гаплогруппой H (наиболее частая европейская гаплогруппа) и L (африканская) показало, что клетки с мтДНК африканского происхождения имели меньшее число копий мтДНК, более высокий уровень экспрессии мтДНК, меньшую скорость оборота АТФ и более низкую продукцию АФК, а также отличались по экспрессии некоторых ядерных генов [32].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что «нормальный» популяционный полиморфизм мтДНК действительно может влиять на эффективность синтеза АТФ и продукции АФК. Более того, полиморфизм мтДНК ассоциирован с изменением активности ядерных генов, связанных с воспалением и апоптозом – процессами, которые играют важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе острых состояний.

ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Тот факт, что митохондрии, являясь внутриклеточными органеллами, имеют собственный геном, подчеркивает их роль в развитии патологических процессов и может изменить существующие представления о многих заболеваниях. В пользу правомерности такого предположения говорит известная роль митохондрий в процессе программируемой гибели клеток (апоптоз) и формирование целого понятия – «митохондриальная болезнь». Первым обращением к понятию «митохондриальная болезнь», наверное, можно считать публикацию 1962 г. R. Luft с соавторами [36]; заболевание было выявлено у женщины с симптомокомплексом гиперметаболизма, не ассоциированного с дисфункцией щитовидной железы [13]. Развитие этого направления привело к созданию классификации митохондриальных болезней, в основу которой была положена оценка биохимических показателей функции этих органелл [26]. Начало «молекулярной эры» митохондриальных болезней можно связать с практически одновременной публикацией работ двух независимых групп исследователей, описавших ассоциации полиморфизмов мтДНК и клинических фенотипов [31, 47]. В последние годы

предпринимаются попытки систематизировать идентифицированные мутации мтДНК, а также их ассоциацию с клиникой того или иного заболевания [13]. В настоящее время информация о митохондриальном геноме, полиморфизмах мтДНК и сопряженных с ними симптомокомплексах депонируется главным образом в специализированных базах данных MITOMAP (<http://mitomap.org>) и mtDB (<http://www.mtddb.igp.uu.se>).

Митохондриальные заболевания, вызванные мутациями мтДНК, зачастую проявляются нарушениями ритма сердца. Например, одним из основных симптомов синдрома Кернса – Сейра является атриовентрикулярная блокада, и при этом заболевании высок риск ВСС [5]. Другой митохондриальный синдром – MELAS, вызываемый наиболее частой митохондриальной мутацией A2343G, тоже повышает риск развития аритмии и ВСС [41]. В целом, электрокардиографические аномалии часто встречаются при мутациях мтДНК, а «истощение» мтДНК (критическое снижение числа копий мтДНК в клетке) может быть ассоциировано с риском ВСС [21, 35]. Недавно показано, что индивиды с числом копий мтДНК на клетку (измеренным в лейкоцитах), находящимся в нижнем квантиле популяционного распределения, имеют более высокий риск внезапной смерти, чем лица с числом копий мтДНК, попадающим в верхний квантиль (OR = 2,24) [50].

Известно, что крупные делеции мтДНК накапливаются с возрастом в различных тканях, в том числе в миокарде при коронарном атеросклерозе [23]. В одном исследовании показано, что доля молекул мтДНК с делецией в миокарде умерших внезапной смертью выше, чем в миокарде лиц, погибших по другим причинам [43]. В другой работе установлена более тесная ассоциация накопления «большой» делеции мтДНК с фибрилляцией предсердий [34].

Ишемия миокарда – основной фактор, обуславливающий риск ВСС во взрослом возрасте, – также может быть связана с вариантами митохондриального генома, но в этих случаях ассоциации получены главным образом с популяционным полиморфизмом. Например, показана связь атеросклероза и инфаркта миокарда с несколькими гаплогруппами мтДНК, в частности, H [42]. При изучении полиморфизма мтДНК в выборке пациентов с ишемической кардиомиопатией обнаружено, что гаплогруппа H чаще встречается у пациентов по сравнению с популяцией (фактор риска), а гаплогруппа J – реже, т.е. имеет протективный эффект [28]. Наиболее частая субгаплогруппа H (H1) показала ассоциацию с вероятностью повторных сердечно-сосудистых катастроф

в течение года после инфаркта миокарда [6] и со смертью от сердечно-сосудистых заболеваний в возрасте до 55 лет [7]. Полиморфизм T16189C был ассоциирован с коронарным атеросклерозом у населения Саудовской Аравии [18] и с вероятностью повторных инфарктов в течение года у русских [6], а для гаплогруппы D в популяции японцев выявлен протективный эффект в отношении инфаркта миокарда [44]. Известно также, что гаплогруппа T мтДНК в испанской популяции у больных с гипертрофической кардиомиопатией встречается с более высокой частотой, чем в популяционной выборке [24]. В популяции датчан у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией чаще регистрируется (по сравнению с популяцией) гаплогруппа H [30]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что полиморфизм мтДНК вносит определенный вклад в предрасположенность к развитию критических состояний в сердечно-сосудистом континууме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мтДНК может быть задействована в провокации жизнеугрожающих состояний, связанных с нарушениями проводящей системы сердца, с одной стороны, и с прогрессированием атеросклероза и недостаточностью функции рабочего миокарда, с другой стороны. Митохондриальный геном, который кодирует жизненно важные белки дыхательной цепи митохондрий и является при этом высокополиморфным в популяциях человека, можно, следовательно, рассматривать как один из важных генетических факторов в подверженности ВСС. Выявление роли дисфункции митохондрий и митохондриальной ДНК в развитии критических состояний может дать новые идеи для разработки стратегий лечения и лекарственных средств, а также позволит уточнять оценки индивидуального риска, что будет способствовать развитию персонализированной медицины.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии возможного конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований СО РАН, проект № 0550-2018-0002 «Митохондриальная дисфункция и изменчивость митохондриального генома в развитии инфаркта миокарда и внезапной сердечной смерти».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аль-Обади И.С., Смоленский А.В. Немодулируемые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний, или генные маркеры как предикторы внезапной сердечной смерти в спорте // Рос. кардиол. журн. 2006. (6). 73–78.
2. Афанасьев С.А., Егорова М.В., Кондратьева Д.С., Реброва Т.Ю., Козлов Б.Н., Попов С.В. К вопросу о возможной метаболической составляющей аритмогенной резистентности миокарда при сочетанном развитии постинфарктного ремоделирования сердечной мышцы и сахарного диабета // Вестн. аритмологии. 2010. (60). 65–69.
3. Бакеева Л.Е. Возраст-зависимые изменения ультраструктуры митохондрий. Действие SkQ1 // Биохимия. 2015. 80. (12). 1843–1850.
4. Аверьянов А.В., Адрианов А.В., Ардашев А.В., Арутюнов Г.П., Арутюнов А.Г., Беленков Ю.Н., Бойцов С.А., Болдуева С.А., Гарькина С.В., Гринева Е.Н., Гришаев С.Л., Громько Г.А., Гусейнова Р.Р., Думтис Я.Ю., Дупляков Д.В., Егоров Д.Ф., Желяков Е.Г., Забозлаев Ф.Г., Зайратьянци О.В., Зарудский А.А., Затейщиков Д.А., Ильницкий А.Н., Кактурский Л.В., Каронова Т.Л., Карпенко Ю.И., Киякбаев Г.К., Ковальчук В.В., Козиолова Н.А., Кондратьева И.В., Конев А.В., Королева О.С., Кочарян А.А., Кручина Т.К., Линчак Р.М., Лышова О.В., Мамчур С.Е., Мареев В.Ю., Мареев Ю.В., Меркурьева А.Б., Мишнев О.Д., Моисеев С.В., Мухин Н.А., Никифоров В.С., Овчинников Р.С., Пауков В.С., Процаев К.И., Сайганов С.А., Стаферов А.В., Тюрина Т.В., Фомин В.В., Химий О.В., Шляхто Е.В., Юзвинкевич С.А., Явелов И.С., Яковлева М.В., Яшин С.М. Внезапная сердечная смерть. М.: Медпрактика-М, 2015. 704 с.
5. Васильев В.Б. Генетические основы митохондриальных болезней. СПб.: Нестор-История, 2006. 146 с.
6. Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Макеева О.А., Гончарова И.А., Кашталап В.В., Барбараиш О.Л., Пузырев В.П. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза // Молекул. биология. 2015. 49. (6). 968–976.
7. Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Шумакова Т.В., Буйкин С.В., Макеева О.А., Назаренко М.С., Пузырев В.П. Полиморфизм митохондриальной ДНК и заболевания сердечно-сосудистого континуума // Мед. генетика. 2018. 17. (1). 9–13.
8. Егорова М.В., Афанасьев С.А., Попов С.В., Карпов Р.С. Проявление адаптивно-приспособительных изменений при сочетанном развитии постинфарктного ремоделирования сердца и сахарного диабета // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. 150. (8). 132–135.
9. Иванова А.А., Максимов В.Н., Орлов П.С., Ивановцук Д.Е., Савченко С.В., Воевода М.И. Ассоциация некоторых генетических маркеров сердечно-сосудистых заболеваний с внезапной сердечной смертью у мужчин // Рос. кардиол. журн. 2014. (10). 40–45.
10. Методическое пособие МЗ РФ «Использование Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра (МКБ-10)». М., 2002. 29 с.
11. Крылова Н.С., Ковалевская Е.А., Потешкина Н.Г., Демкина А.Е., Хашиева Ф.М. Внезапная смерть при гипертрофической кардиомиопатии: поиск новых факторов риска // Рос. кардиол. журн. 2017. (2). 62–67.
12. Кулешова Э.В., Демченко Е.А., Шляхто Е.В. Всегда ли внезапна внезапная сердечная смерть? // Вестн. аритмологии. 2006. (42). 22–27.
13. Патрушев М.В., Каменский П.А., Мазунин И.О. Мутации митохондриальной ДНК и методы их коррекции // Биохимия 2014. 79. (11). 1417–1428.
14. Пронина Е.Н., Тарасов Н.А. Внезапная сердечная смерть у молодых – случайность или закономерность? // Рос. кардиол. журн. 2010. (2). 22–24.
15. Рабочая группа Европейского общества кардиологов (ESC) по лечению пациентов с желудочковыми нарушениями ритма и профилактике внезапной сердечной смерти. Рекомендации ESC по лечению пациентов с желудочковыми нарушениями ритма и профилактике внезапной сердечной смерти 2015 // Рос. кардиол. журн. 2016. (7). 5–86.
16. Скулачев В.П. Новые сведения о биохимическом механизме запрограммированного старения организма и антиоксидантной защите митохондрий // Биохимия. 2009. 74. (12). 1718–1721.
17. Школьникова М.А., Харлап М.С., Ильдарова Р.А. Генетически детерминированные нарушения ритма сердца // Рос. кардиол. журн. 2011. (1). 8–25.
18. Abu-Amero K.K., Al-Boudari O.M., Mousa A., Gonzalez A.M., Larruga J.M., Cabrera V.M., Dzimiri N. The mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs // Genet. Test. Mol. Biomarkers. 2010. 14. (1). 43–47.
19. Arking D.E., Reinier K., Post W., Jui J., Hilton G., O'Connor A., Prineas R.J., Boerwinkle E., Psaty B.M., Tomaselli G.F., Rea T., Sotoodehnia N., Siscovick D.S., Burke G.L., Marban E., Spooner P.M., Chakravarti A., Chugh S.S. Genome-wide association study identifies GPC5 as a novel genetic locus

- protective against sudden cardiac arrest // PLoS One. 2010. 5. (3). 1–7.
20. Ayyappa K.A., Ghosh S., Mohan V., Radha V. Association of hepatic lipase gene polymorphisms with hypertriglyceridemia and low high-density lipoprotein-cholesterol levels among South Indian subjects without diabetes // Diabetes Technol. Ther. 2013. 15. (6). 503–512.
21. Baik R., Chae J.H., Lee Y.M., Kang H.C., Lee J.S., Kim H.D. Electrocardiography as an early cardiac screening test in children with mitochondrial disease // Korean J. Pediatr. 2010. 53. (5). 644–647.
22. Berul C.I. Congenital long-QT syndromes: who's at risk for sudden cardiac death? // Circulation. 2008. 117. (17). 2178–2180.
23. Botto N., Berti S., Manfredi S., Al-Jabri A., Federici C., Clerico A., Ciofini E., Biagini A., Andreassi M.G. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease // Mutat. Res. 2005. 570. (1). 81–88.
24. Castro M.G., Huerta C., Reguero J.R., Soto M.I., Doménech E., Alvarez V., Gómez-Zaera M., Nunes V., González P., Corao A., Coto E. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy // Int. J. Cardiol. 2006. 112. (2). 202–206.
25. Dey S., DeMazumder D., Sidor A., Foster D.B., O'Rourke B. Mitochondrial ROS drive sudden cardiac death and chronic proteome remodeling in heart failure // Circ. Res. 2018. 123. (3). 356–371.
26. DiMauro S., Bonilla E., Zeviani M., Nakagawa M., DeVivo D.C. Mitochondrial myopathies // Ann. Neurol. 1985. 17. (6). 521–538.
27. Dubourg O., Charron P., Sirol M., Siam-Tsieu V., Mansencal N. Risk stratification of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy in 2016 // Presse Med. 2016. 45. (10). 903–910. [In French].
28. Fernández-Caggiano M., Barallobre-Barreiro J., Rego-Pérez I., Crespo-Leiro M.G., Paniagua M.J., Grillé Z., Blanco F.J., Doménech N. Mitochondrial haplogroups H and J: Risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy // PLoS One. 2012. 7. (8). e44128.
29. Gambardella J., Sorriento D., Ciccarelli M., Del Giudice C., Fiordelisi A., Napolitano L., Trimarco B., Iaccarino G., Santulli G. Functional role of mitochondria in arrhythmogenesis // Adv. Exp. Med. Biol. 2017. 982. 191–202.
30. Hagen C.M., Aidt F.H., Hedley P.L., Jensen M.K., Havndrup O., Kanters J.K., Moolman-Smook J.C., Larsen S.O., Bundgaard H., Christiansen M. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population // PLoS One. 2013. 8. (8). e71904.
31. Holt I.J., Harding A.E., Morgan Hughes J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies // Nature. 1988. 331. (6158). 717–719.
32. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Falatoonzadeh P., Ramirez C., Malik D., Tarek M., Del Carpio J.C., Nesburn A.B., Boyer D.S., Kuppermann B.D., Vawter M.P., Jazwinski S.M., Miceli M.V., Wallace D.C., Udar N. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases // Biochim. Biophys. Acta. 2014. 1842. (2). 208–219.
33. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Pavlis J.M., Falatoonzadeh P., Ramirez C., Malik D., Hsu T., Woo G., Soe K., Nesburn A.B., Boyer D.S., Kuppermann B.D., Jazwinski S.M., Miceli M.V., Wallace D.C., Udar N. Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration // PLoS One. 2013. 8. (1). e54339.
34. Lai L.P., Lin J.L., Huang S.K. Molecular genetic studies in atrial fibrillation // Cardiology. 2003. 100. (3). 109–113.
35. Lee S.R., Han J. Mitochondrial mutations in cardiac disorders // Adv. Exp. Med. Biol. 2017. 982. 81–111.
36. Luft R., Ikkos D., Palmieri G., Ernster L., Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study // J. Clin. Invest. 1962. 41. 1776–1804.
37. Malik D., Hsu T., Falatoonzadeh P., Cáceres-del-Carpio J., Tarek M., Chwa M., Atilano S.R., Ramirez C., Nesburn A.B., Boyer D.S., Kuppermann B.D., Jazwinski S.M., Miceli M.V., Wallace D.C., Udar N., Kenney M.C. Human retinal transmitochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases // PLoS One. 2014. 9. (2). e99003.
38. Maron B.J., Araujo C.G., Thompson P.D., Fletcher G.F., de Luna A.B., Fleg J.L., Pelliccia A., Balady G.J., Furlanello F., van Camp S.P., Elosua R., Chaitman B.R., Bazzarre T.L.; World Heart Federation; International Federation of Sports Medicine; American Heart Association Committee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention. Recommendations for preparticipation screening and the assessment of cardiovascular disease in masters athletes: an advisory for healthcare professionals

from the working groups of the World Heart Federation, the International Federation of Sports Medicine, and the American Heart Association Committee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention // *Circulation*. 2001. 103. (2). 3327–334.

39. *Montaigne D., Marechal X., Lacroix D., Staels B.* From cardiac mitochondrial dysfunction to clinical arrhythmias // *Int. J. Cardiol*. 2015. 184. 597–599.

40. *Mueller E.E., Brunner S.M., Mayr J.A., Stanger O., Sperl W., Kofler B.* Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 cybrid cells // *PLoS One*. 2012. 7. (12). e52367.

41. *Ng Y.S., Grady J.P., Lax N.Z., Bourke J.P., Alston C.L., Hardy S.A., Falkous G., Schaefer A.G., Radunovic A., Mohiddin S.A., Ralph M., Alhakim A., Taylor R.W., McFarland R., Turnbull D.M., Gorman G.S.* Sudden adult death syndrome in m.3243A>G related mitochondrial disease: an unrecognized clinical entity in young, asymptomatic adults // *Eur. Heart J*. 2016. 37. (32). 2552–2559.

42. *Palacin M., Alvarez V., Martin M., Diaz M., Corao A.I., Alonso B., Diaz-Molina B., Lozano I., Avanzas P., Moris C., Reguero J.R., Rodriguez I., Lopez-Larrea C., Cannata-Andia J., Batalla A., Ruiz-Ortega M., Martinez-Camblor P., Coto E.* Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: Evidence for an association to haplogroup H // *Mitochondrion*. 2011. 11. (1). 176–181.

43. *Polisecki E.Y., Schreier L.E., Ravioli J., Corach D.* Common mitochondrial DNA deletion associated with sudden natural death in adults // *J. Forensic Sci*. 2004. 49. (6). 1335–1338.

44. *Takagi K., Yamada Y., Gong J.S., Sone T., Yokota M., Tanaka M.* Association of a 5178C->A

(Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals // *Atherosclerosis*. 2004. 175. (2). 281–286.

45. *Todur S.P., Ashavaid T.F.* Association of CETP and LIPC gene polymorphisms with HDL and LDL sub-fraction levels in a group of Indian subjects: A cross-sectional study // *Indian J. Clin. Biochem*. 2013. 28. (2). 116–123.

46. *Virani S.S., Brautbar A., Lee V.V., MacArthur E., Morrison A.C., Grove M.L., Nambi V., Frazier L., Wilson J.M., Willerson J.T., Boerwinkle E., Ballantyne C.M.* Chromosome 9p21 single nucleotide polymorphisms are not associated with recurrent myocardial infarction in patients with established coronary artery disease // *Circ. J*. 2012. 76. (4). 950–956.

47. *Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Shurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J., Nikoskelainen E.K.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Science*. 1988. 242. (4884). 1427–1430.

48. *Yang K.C., Bonini M.G., Dudley S.C. Jr.* Mitochondria and arrhythmias // *Free Radic. Biol. Med*. 2014. 71. 351–361.

49. *Yang K.C., Kyle J.W., Makielski J.C., Dudley S.C. Jr.* Mechanisms of Sudden Cardiac Death: Oxidants and Metabolism // *Circ. Res*. 2015. 116. (12). 1937–1955.

50. *Zhang Y., Guallar E., Ashar F.N., Longchamps R.J., Castellani C.A., Lane J., Grove M.L., Coresh J., Sotoodehnia N., Ilkhanoff L., Boerwinkle E., Pankratz N., Arking D.E.* Association between mitochondrial DNA copy number and sudden cardiac death: findings from the Atherosclerosis Risk in Communities study (ARIC) // *Eur. Heart J*. 2017. 38. (46). 3443–3448.

MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM AND PATHOGENETICS OF SUDDEN CARDIAC DEATH (REVIEW)

**Sergey Alexandrovich AFANASYEV¹, Mariya Vladimirovna GOLUBENKO²,
Lyudmila Petrovna TSAPKO¹, Valery Pavlovich PUZYREV²**

¹ *Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of SB RAS
634012, Tomsk, Kievskaya str., 111a*

² *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of SB RAS
634050, Tomsk, Naberezhnaya Ushaiki, 10*

Study of the causes and mechanisms leading to sudden death is one of the most important goals in cardiology. Multiple studies suggest substantial role of mitochondrial dysfunction in the sudden death pathogenesis. Lack of ATP, excess of reactive oxygen species, and disruption of ionic balance in mitochondria are all able to provoke life-threatening arrhythmia. Mitochondrial DNA, which encodes several subunits of mitochondrial respiratory chain, is characterized by considerably high variability in human populations. It has been shown that cell respiration can depend on common mtDNA polymorphisms. In addition, there are data on associations of mtDNA polymorphisms with predisposition to cardiovascular diseases, including those associated with high risk of sudden death. The differences in cell bioenergetics between mtDNA genotypes do not influence myocardial function in normal state but may appear to be critical under acute ischemic conditions. So, mitochondrial genome should be considered as one of main components in the pathogenetics of sudden cardiac death.

Key words: mitochondrial DNA, polymorphism, sudden cardiac death, mitochondria, oxidative stress.

Afanasyev S.A. – doctor of medical sciences, head of laboratory for molecular cellular pathology and gene diagnostics, e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru

Golubenko M.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory for population genetics, e-mail: maria-golubenko@medgenetics.ru

Tsapko L.P. – junior researcher of laboratory for molecular cellular pathology and gene diagnostics, e-mail: lpc@cardio-tomsk.ru

Puzyrev V.P. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, academic advisor, e-mail: p.valery@medgenetics.ru

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРЕПАНОБИОПТАТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ И ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ: ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МИЕЛОФИБРОЗА ПРИ СОПОСТАВЛЕНИИ С КЛИНИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ

Татьяна Юрьевна ДОЛГИХ, Елена Владимировна ВИНОГРАДОВА,
Валентина Ильинична КАПУСТИНА, Светлана Робертовна СЕНЧУКОВА

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

Цель исследования – изучить взаимосвязь качественных и количественных характеристик миелофиброза и клинических проявлений хронического миелолейкоза и хронического лимфолейкоза. **Материал и методы.** Проведено комплексное патоморфологическое исследование трепанобиоптатов подвздошной кости и комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование 154 больных хроническим миелолейкозом и хроническим лимфолейкозом. **Результаты.** У пациентов в хронической фазе хронического миелолейкоза в дебюте заболевания и при потере ответа на химиотерапию наибольшая площадь селезенки выявлена при выраженном миелофиброзе, наименьшая – при его отсутствии. У пациентов в дебюте или рецидиве хронического лимфолейкоза спленомегалия, гепатомегалия и генерализованная лимфаденопатия наиболее часто встречаются у пациентов с миелофиброзом по сравнению с пациентами без миелофиброза. Выраженный миелофиброз во всех случаях был ассоциирован с гепатоспленомегалией. При сопоставлении морфометрических и клинических данных установлено, что в хронической фазе хронического миелолейкоза в дебюте заболевания относительная площадь очагов начального миелофиброза более 60 %, относительная площадь очагов выраженного миелофиброза более 40 % и гранулоцитарно-мегакариоцитарный подтип опухолевого поражения костного мозга ассоциированы с развитием рецидива или прогрессии после 1-й или 2-й линии химиотерапии. В дебюте хронического лимфолейкоза относительная площадь очагов начального миелофиброза более 20 %, относительная площадь очагов выраженного миелофиброза более 11 % и диффузный тип опухолевого поражения костного мозга ассоциированы с развитием рецидива или прогрессии после 1-й или 2-й линии химиотерапии.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз, миелофиброз, клиническая и прогностическая значимость.

Комплексное патоморфологическое исследование костного мозга при гемобластозах имеет большое значение для определения типа опухолевого поражения, оценки микроокружения, а в сопоставлении с клиническими данными позволяет уточнить прогноз течения заболеваний и оценить эффективность использованных схем химиотерапии [3, 7]. Стромальное микроокружение костного мозга является сложной и динамичной системой, регулирующей гемопоэз как в физиологических условиях, так и при развитии патологических процессов. Стромальное микро-

окружение образуют клетки разных типов (ретикулярные клетки, остеобласты/остеопрогениторные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, моноциты, макрофаги, адвентициальные клетки сосудов, адипоциты) [14] и волокнистые структуры (ретикулярные волокна), которые формируют трехмерную ячеистую сеть (стромальные ниши). Располагающиеся в этих нишах гемопоэтические стволовые клетки под действием секретируемых стромальными клетками цитокинов и хемокинов постоянно пролиферируют и проходят последовательные этапы дифференцировки и созревания.

Долгих Т.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных механизмов неопластических процессов, e-mail: pathol@inbox.ru

Виноградова Е.В. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей патологии и патоморфологии, e-mail: pathol@inbox.ru

Капустина В.И. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов, e-mail: pathol@inbox.ru

Сенчукова С.Р. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных механизмов неопластических процессов, e-mail: pathol@inbox.ru

Изменяющиеся взаимоотношения между гемопоэтическими клетками и клетками стромально-микроокружения могут обуславливать в ряде случаев развитие миелодиспластических синдромов и гемобластозов.

Одним из значимых компонентов стромального микроокружения в костном мозге являются соединительнотканые волокна (в основном ретикулярные, состоящие из коллагена III типа), гиперпродукция которых при некоторых патологических состояниях приводит к развитию миелофиброза (МФ) [9, 16]. Так, увеличенное количество ретикулярных волокон, выявляемых методом серебрения, выявлено у 40 % больных с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) [13] и у 10–20 % больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) при постановке диагноза [12]. Установлено также, что при ХМЛ повышение количества ретикулярных волокон в костном мозге коррелирует с возрастанием числа мегакариоцитов, анемией и размеров селезенки [13].

Клинико-лабораторная и прогностическая значимость МФ при гемобластазах изучена недостаточно. Одни авторы полагают, что развитие МФ может снижать риск развития бластного криза и ассоциировано с большей продолжительностью жизни [7], другие отмечают, что после трансплантации костного мозга восстановление гемопоэза замедлено у пациентов с более выраженным МФ [17]. Развитие МФ ассоциировано с более тяжелым течением ХЛЛ и меньшей общей 5-летней выживаемостью [15]. Эти факты свидетельствуют о необходимости изучения распространенности и выраженности МФ для уточнения патогенеза гемобластозов и разработки новых критериев прогноза течения заболеваний. При этом информация в литературе зачастую противоречива, данные о взаимосвязях количественных характеристик МФ и клиническими проявлениями ХМЛ и ХЛЛ немногочисленны и, по существу, не систематизированы. В свою очередь, эта информация может дать существенный вклад в понимание патогенеза гемобластозов и открыть новые перспективы лечения.

Цель исследования – изучить взаимосвязь качественных и количественных характеристик миелофиброза и клинических проявлений хронического миелолейкоза и хронического лимфолейкоза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 154 пациента с гемобластазами, находившиеся на лечении в Государственной Новосибирской областной клинической больнице с 2006 по 2012 год в динамике химиотерапии.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.), на проведение исследования получено разрешение локального комитета Института молекулярной патологии и патоморфологии.

В хронической фазе ХМЛ до начала лечения обследованы 46 пациентов (32 мужчины, 14 женщин, средний возраст $55,8 \pm 1,9$ года). Диагноз ХМЛ устанавливали на основании утвержденных критериев [2]. Потеря ответа отмечена у 40 человек (17 мужчин, 23 женщины, средний возраст $55,2 \pm 1,3$ года). У 80 % пациентов с ХМЛ (32 человека) потеря ответа наступила после одной линии химиотерапии (гидроксикарбамид + интерферон α -2 β), у 20 % пациентов (8 человек) – после двух линий (гидроксикарбамид + интерферон α -2 β , иматиниба мезилат). Из 108 пациентов с ХЛЛ в дебюте обследованы 80 человек (55 мужчин, 25 женщин, средний возраст $59,2 \pm 1,2$ года), в рецидиве – 28 (19 мужчин и 11 женщин, средний возраст $60,4 \pm 2,5$ года). Диагноз ХЛЛ определяли в соответствии с руководством [10]. Стадию ХЛЛ устанавливали по Binet [4]. Рецидив ХЛЛ отмечен у 74 % больных (20 человек) после одной линии химиотерапии (по схеме «циклофосфамид + преднизолон» или по схеме «циклофосфамид + флударабин + преднизолон»), у 26 % пациентов (8 человек) после двух линий (по схеме «циклофосфамид + флударабин + преднизолон» и по схеме «ритуксимаб + циклофосфамид + флударабин + преднизолон»). Группу сравнения составили 50 человек без гематологических заболеваний и анемического синдрома (30 мужчин, 20 женщин, средний возраст $44,73 \pm 2,48$ года). У всех пациентов исследованы показатели периферического звена эритрона, у 10 из них для исключения диагноза гемобластаза проведено цитологическое исследование костно-мозгового компартмента эритрона и патоморфологическое изучение трепанобиоптатов подвздошной кости.

У всех пациентов с целью диагностики заболеваний и оценки эффективности лечения выполняли трепанобиопсию подвздошной кости, проводили ультразвуковое исследование печени и селезенки. Для комплексного морфологического анализа трепанобиоптаты подвздошной кости обрабатывали с помощью стандартных методов, получали парафиновые срезы (толщиной 4 мкм), которые импрегнировали серебром по методу Гомори, окрашивали по ван Гизону. Абсолютную площадь фиброзной ткани оценивали при увеличении в 200 раз. Затем, как описано ранее [1], рассчитывали относительную площадь фиброзной ткани ($S_{\text{МФ}}$), которая характеризовала

распространенность МФ. При качественной характеристике МФ руководствовались следующими характеристиками: начальный МФ (МФ 1-й степени – МФ₀₋₁) – преимущественное присутствие ретикулярных волокон, выраженный МФ (МФ 2-й и 3-й степеней – МФ₂₋₃) – преобладание пучков и «полей» коллагеновых волокон [15, 17]. При проведении количественных и сравнительных клинко-морфологических исследований все пациенты были разделены на две основные группы: без миелофиброза и с начальным миелофиброзом – МФ0–1, с миелофиброзом 2-й и 3-й степеней – МФ2–3. Такое разделение было произведено по принципу обратимости фибротических изменений. Как известно, начальный фиброз обратим при благоприятных обстоятельствах, в то время как выраженный миелофиброз (т.е. II и III степеней) является необратимым процессом даже при устранении этиологического фактора.

При проведении статистической обработки данных вычисляли среднее арифметическое значение (M) и ошибку среднего (m), результаты представляли в виде $M \pm m$. Достоверность различий определяли с помощью критерия Манна – Уитни при уровне значимости $p < 0,05$ и отноше-

нии шансов $OR > 1,0$. Связь между переменными определяли с помощью коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Очаги МФ в трепанобиоптатах подвздошной кости, образованные ретикулярными волокнами, располагались периваскулярно, перитрабекулярно и непосредственно в костно-мозговых полостях (рисунок, *а*). Архитектоника костного мозга существенно не изменялась, но в результате развития МФ отмечалось вытеснение из костно-мозговых полостей кроветворной ткани (рисунок, *б*).

Данные сравнительного клинко-лабораторного обследования и патоморфологического анализа свидетельствуют о том, что симптомы хронической фазы ХМЛ в дебюте заболевания и при потере ответа на химиотерапию чаще регистрировались у пациентов с МФ по сравнению с пациентами без МФ. Больные, у которых был выявлен МФ, чаще жаловались на снижение работоспособности (в 2,8 раза; $p < 0,05$), слабость (в 5 раз; $p < 0,05$), тяжесть в левом подреберье (в 1,2 раза; $p < 0,01$), у них чаще (в 8 раз; $p < 0,001$) выявлялась

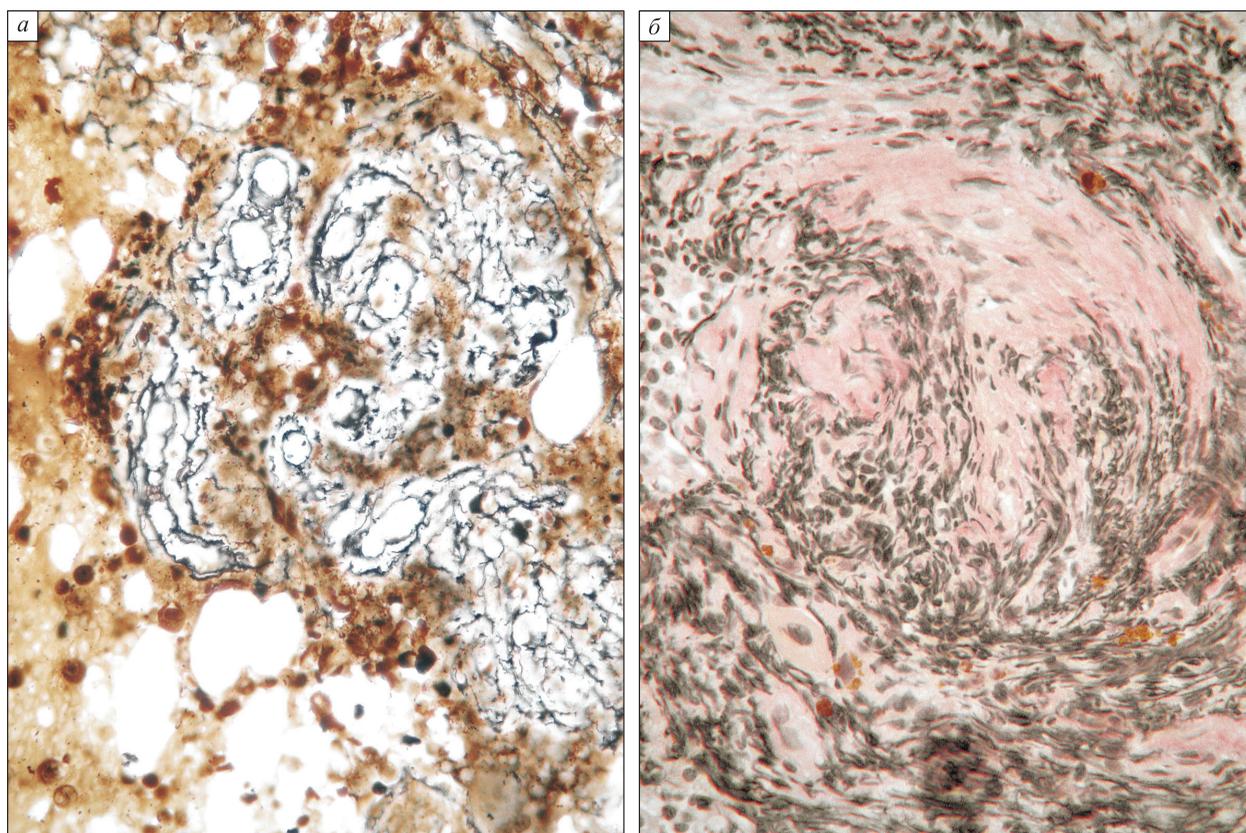


Рис. Трепанобиоптаты подвздошной кости при ХЛЛ. *а* – МФ II степени, периваскулярная локализация ретикулярных волокон. Импрегнация по Гомори, ув. $\times 400$; *б* – миелофиброз III степени, вытеснение кроветворной ткани из костно-мозговых полостей. Окраска по ван Гизону, ув. $\times 200$

спленомегалия. Наибольшая площадь селезенки ($96,7 \pm 13,9 \text{ см}^2$), по данным УЗИ, отмечена при выраженном МФ, наименьшая ($65,9 \pm 14,5 \text{ см}^2$) – при его отсутствии; в группе сравнения данный показатель ($32,1 \pm 10,2 \text{ см}^2$) был меньше соответственно в 3 и 2 раза ($p < 0,05$). Между относительной площадью очагов МФ и площадью селезенки выявлена прямая положительная корреляционная связь: для начального МФ $r = 0,549$ ($p = 0,006$), для выраженного МФ $r = 0,614$ ($p = 0,003$).

По данным однофакторного анализа, в хронической фазе ХМЛ в дебюте заболевания и при потере ответа на химиотерапию $S_{\text{МФ0-1}}$ более 60 %, $S_{\text{МФ2-3}}$ более 40 % и гранулоцитарно-мегакариоцитарный подтип опухолевого поражения костного мозга ассоциированы с развитием рецидива или прогрессией заболевания после 1-й или 2-й линии химиотерапии (соответственно $p = 0,006$, OR 87,14, 95%-й доверительный интервал CI 11,17–385,01, $p = 0,013$; OR 74,10, 95 % CI 9,17–203,43, $p = 0,025$; OR 63,18, 95 % CI 7,3–107,09).

Анализ клинических данных показал, что при ХЛЛ гепатомегалия, спленомегалия и генерализованная лимфаденопатия чаще встречаются у пациентов с МФ, чем у больных без МФ (табл. 1). Во всех случаях гепатоспленомегалия была ассоциирована с выраженным МФ ($p = 0,012$, OR 79,15, 95 % CI 5,06–348,12). У пациентов этой группы наибольшая площадь

селезенки ($64,5 \pm 12,7 \text{ см}^2$) и наибольшие размеры печени ($17,9 \pm 4,4/8,6 \pm 3,0 \text{ см}$) выявлены при выраженном МФ, наименьшие показатели – при его отсутствии (соответственно $44,8 \pm 10,9 \text{ см}^2$ и $11,2 \pm 3,0/5,9 \pm 1,1 \text{ см}$, $p < 0,05$). Обнаружено увеличение переднезадних размеров правой и левой долей печени при начальном и выраженном МФ (соответственно $13,5 \pm 3,7/7,9 \pm 1,4$ и $17,9 \pm 4,4/8,6 \pm 3,0 \text{ см}$) по сравнению с размерами печени у пациентов без МФ ($11,2 \pm 3,0/5,9 \pm 1,1 \text{ см}$, $p < 0,05$), которые достоверно не отличались от таковых в группе сравнения ($11,5 \pm 1,8/6,4 \pm 1,2 \text{ см}$).

Установлена прямая положительная корреляционная связь между относительной площадью очагов начального МФ и площадью селезенки, а также между переднезадним размером правой доли печени и переднезадним размером левой доли печени (соответственно $r = 0,436$, $p = 0,007$; $r = 0,622$, $p = 0,039$ и $r = 0,504$, $p = 0,015$). Аналогичные корреляционные взаимосвязи наблюдались и у пациентов с выраженным МФ (соответственно $r = 0,518$, $p = 0,002$; $r = 0,705$, $p = 0,002$ и $r = 0,544$, $p = 0,047$).

Относительная площадь очагов МФ у пациентов как с начальным, так и с выраженным МФ была наибольшей при стадии С ХЛЛ, при этом $S_{\text{МФ0-1}}$ превышала $S_{\text{МФ2-3}}$ в 15,5 раза ($p < 0,05$) (табл. 2). Следует отметить, что относительная площадь очагов начального МФ была больше та-

Таблица 1

Частота встречаемости спленомегалии, гепатомегалии и генерализованной лимфаденопатии в активной фазе ХЛЛ в зависимости от наличия миелофиброза, n (%)

Показатель		Пациенты без МФ (n = 79)	Пациенты с МФ (n = 29)	OR (95 % CI)	p
Спленомегалия	Есть	21 (27 %)	19 (66 %)	32,18 (9,08–125,39)	0,005
	Нет	58 (73 %)	10 (34 %)		
Гепатомегалия	Есть	25 (32 %)	21 (72 %)	14,54 (8,35–106,54)	0,042
	Нет	54 (68 %)	8 (28 %)		
Генерализованная лимфаденопатия	Есть	18 (23 %)	22 (76 %)	12,7 (2,43–95,4)	< 0,001
	Нет	61 (77 %)	7 (24 %)		

Таблица 2

Относительная площадь очагов МФ (%) у пациентов с начальным и выраженным миелофиброзом при различных стадиях в активной фазе ХЛЛ, M ± m

Стадия ХЛЛ	Начальный МФ	Выраженный МФ
Стадия А, n = 15	5,3 ± 6,4	2,2 ± 3,4*
Стадия В, n = 64	14,6 ± 26,7	10,3 ± 17,8*
Стадия С, n = 29	18,9 ± 23,5	12,7 ± 15,8*
p	$p_{\text{А,В}} = 0,041$; $p_{\text{А,С}} = 0,007$; $p_{\text{В,С}} < 0,001$	$p_{\text{А,В}} = 0,013$; $p_{\text{А,С}} = 0,007$; $p_{\text{В,С}} = 0,034$

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя пациентов с начальным МФ статистически значимо при $p < 0,05$.

ковой для выраженного МФ также при стадиях А и В (соответственно в 2,4 и 1,4 раза, $p < 0,05$). По данным однофакторного анализа, $S_{\text{МФ0-1}}$ более 20 %, $S_{\text{МФ2-3}}$ более 11 % и диффузный тип опухолевого поражения костного мозга в дебюте ХЛЛ ассоциированы с развитием рецидива или прогрессией после 1-й или 2-й линий химиотерапии ($p = 0,005$, OR 95,12, 95 % CI 10,01–399,02; $p = 0,008$, OR 29,75, 95 % CI 5,15–118,09; $p = 0,046$, OR 75,12, 95 % CI 6,54–310,06 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Установленные нами факты наличия взаимосвязи между МФ и клиническими проявлениями гемобластоза, в частности, развитием спленомегалии и гепатомегалии, были выявлены также и другими авторами как при ХМЛ [11, 18], так и при ХЛЛ [15, 19]. Можно полагать, что увеличение тяжести заболевания, развитие анемии и тромбоцитопении, стимулирование экстрамедулярного гемопоэза сопровождаются усилением фибрирования костного мозга. В этом аспекте выраженность МФ отражает один из этапов развития гемобластоза, на котором оно было выявлено [8, 15].

Прогностическое значение МФ при ХМЛ и ХЛЛ исследовано в ряде работ [5, 6, 15]. В частности, установлено, что более выраженный МФ ассоциирован с большим уровнем сывороточного $\beta 2$ -микроглобулина, чаще встречается у пациентов с тромбоцитопенией. Показано, что содержание гемоглобина у пациентов с МФ₂₋₃ достоверно ниже, чем у больных с МФ₀₋₁ (соответственно 117 и 127 г/л) [15].

Немногочисленность и противоречивость данных литературы не позволяли использовать МФ в качестве прогностического критерия при гемобластозах. Следует отметить, что для проведения сопоставлений клинико-лабораторных и морфологических данных необходимо представление результатов в виде количественных показателей. С этой целью нами ранее был разработан способ автоматизированной морфометрической оценки МФ в трепанобиоптатах, который позволил количественно охарактеризовать выраженность и распространенность МФ. После проведения корреляционного анализа были выделены некоторые прогностические критерии течения гемобластозов. В частности, установлена прямая корреляционная связь между продолжительностью онкогематологических заболеваний и распространенностью начального и выраженного МФ [1].

Выявленные в данной работе корреляции между выраженностью МФ и гепатоспленомега-

лий при ХМЛ и ХЛЛ свидетельствуют о том, что степень и характер опухолевого поражения костного мозга влияют не только на изменения паренхиматозно-стромальных отношений, параметры гемопоэза, но и на структурно-функциональную реорганизацию селезенки и печени, которые компенсаторно вовлекаются в процессы экстрамедулярного гемопоэза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным комплексного клинико-инструментального и патоморфологического анализа, у пациентов в хронической фазе ХМЛ в дебюте заболевания и при потере ответа на химиотерапию отмечается прямая положительная корреляционная связь между распространенностью и выраженностью МФ и спленомегалией. Относительная площадь очагов начального МФ более 60 %, относительная площадь очагов выраженного МФ более 40 % в сочетании с гранулоцитарно-мегакариоцитарным подтипом опухолевого поражения костного мозга в хронической фазе ХМЛ в дебюте заболевания ассоциированы с развитием рецидива или прогрессии после 1-й или 2-й линии химиотерапии. Гепатомегалия, спленомегалия и генерализованная лимфаденопатия в дебюте или рецидиве ХЛЛ наиболее часто встречаются у пациентов с МФ, чем у пациентов без МФ. Выраженный МФ всегда ассоциирован с гепатоспленомегалией. По данным УЗИ, наибольшие площади селезенки и печени выявляются при выраженном МФ, наименьшие – при его отсутствии. По нашим данным, относительная площадь очагов начального МФ более 20 %, относительная площадь очагов выраженного МФ более 11 % в сочетании с диффузным типом опухолевого поражения костного мозга в дебюте ХЛЛ ассоциированы с развитием рецидива или прогрессии заболевания после 1-й или 2-й линии химиотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Домникова Н.П., Долгих Т.Ю. Распространенность миелофиброза при хроническом миелолейкозе, множественной миеломе и хроническом лимфолейкозе в различные фазы заболеваний // Сиб. науч. мед. журн. 2016. (5). 53–57.
2. Программное лечение заболеваний системы крови: Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / ред. В.Г. Савченко. М.: Практика, 2012. 1056 с.
3. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю. Особенности нишеобразующих структур и стромы костного мозга больных хроническим лимфоцитарным лейкозом // Medline.Ru. 2013. 14. (2). 347–361.

4. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Pigué H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis // *Cancer*. 1981. 48. (1). 198–206.
5. Buesche G., Georgii A., Duensing A., Schmeil A., Schlue J., Kreipe H. Evaluating the volume ratio of bone marrow affected by fibrosis: a parameter crucial for the prognostic significance of marrow fibrosis in chronic myeloid leukemia // *Hum. Pathol.* 2003. 34. (4). 391–401.
6. Buesche G., Hehlmann R., Hecker H., Heimpe H., Heinze B., Schmeil A., Pfirrmann M., Gomez G., Tobler A., Herrmann H., Kappler M., Hasford J., Buhr T., Kreipe H.H., Georgii A. Marrow fibrosis, indicator of therapy failure in chronic myeloid leukemia – prospective long-term results from a randomized-controlled trial // *Leukemia*. 2003. 17. 2444–2453.
7. Burkhardt R., Bartl R., Jager K., Frisch B., Kettner G., Mahl G., Sund M. Working classification of chronic myeloproliferative disorders based on histological, haematological and clinical findings // *J. Clin. Pathol.* 1986. 39. 237–252.
8. Clough V., Geary G.C., Hashmi K. Myelofibrosis in chronic granulocytic leukemia // *Br. J. Haematol.* 1979. 42. 515–526.
9. Crawford S.E., Stellmach V., Murphy-Ullrich J.E., Ribeiro S.M.F., Lawler J., Hynes R.O., Boivin J.P., Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 *in vivo* // *Cell*. 1998. 93. 1159.
10. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating M.J., Montserrat E., Rai K.R., Kipps T.J. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines // *Blood*. 2008. 111. (12). 5446–5456.
11. Kantarjian H.M., Bueso-Ramos C.E., Talpaz M., O'Brien S., Giles F., Faderl S., Wierda W., Beth Rios M., Shan J., Cortes J. Significance of myelofibrosis in early chronic-phase, chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy // *Cancer*. 2005. 104. (4). 777–780.
12. Kimura A., Hyodo H., Nakata Y., Kuramoto A. Chronic lymphocytic leukemia associated with bone marrow fibrosis: Possible role of interleukin 1 α in the pathogenesis // *Am. J. Hematol.* 1993. 43. 47–50.
13. Lazzarino M., Morra E., Castello A., Inverardi D., Coci A., Pagnucco G., Magrini U., Zei G., Bernasconi C. Myelofibrosis in chronic granulocytic leukemia: clinicopathological correlation and prognostic significance // *Br. J. Haematol.* 1986. 64. 227–240.
14. Rankin E.B., Narla A., Park J.K., Lin S., Sakamoto K.M. Biology of the bone marrow microenvironment and myelodysplastic syndromes // *Mol. Genet. Metab.* 2015. Vol. 116 (1-2). P. 24–28.
15. Tadmor T., Shvidel L., Aviv A., Ruchlemer R., Bairey O., Yuklea M., Herishanu Ya., Braester A., Levene N., Vernea F., Ben-Ezra J., Bejar J., Polliack A. Significance of bone marrow reticulin fibrosis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: a study of 176 patients with prognostic implications // *Cancer*. 2013. 119. (10). 1853–1859.
16. Thiele J., Kvasnicka H.M. Myelofibrosis – What's in a Name? // *Pathobiology*. 2007. 74. (2). 89–96.
17. Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F., Franco V., van der Walt J., Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity // *Haematologica*. 2005. 90. 1128–1132.
18. Thiele J., Kvasnicka H.M., Titius B.R., Parpert U., Nebel R., Zankovich R., Dienemann D., Stein H., Diehl V., Fischer R. Histological features of prognostic significance in CML: An immunohistochemical and morphometric study (multivariate regression analysis) on trephine biopsies of the bone marrow // *Ann. Hematol.* 1993. 66. 291–302.
19. Weistner A., Rosenwald A., Barry T.S. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile // *Blood*. 2003. 101. 4944–4951.

PATHOMORPHOLOGICAL ANALYSIS OF TREPANOBIOPTATES IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: ASSESSMENT OF THE PROGNOSTIC VALUE OF MYELOFIBROSIS WHEN COMPARED WITH CLINICAL DATA

**Tatyana Yuryevna DOLGIKH, Elena Vladimirovna VINOGRADOVA,
Valentina Il'yinichna KAPUSTINA, Svetlana Robertovna SENCHUKOVA**

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

The aim of the study was to study the relationship between the qualitative and quantitative characteristics of myelofibrosis and the clinical manifestations of chronic myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia. **Material and methods.** A complex pathomorphological study of ilium bone trepanobiopates and a complex clinical-laboratory and instrumental examination of 154 patients with chronic myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia were performed. **Results.** In patients in the chronic phase of chronic myeloid leukemia in the onset of the disease and with a loss of response to chemotherapy, the largest area of the spleen was detected with pronounced myelofibrosis, the smallest – in the absence of myelofibrosis. In patients in the onset or relapse of chronic lymphocytic leukemia, splenomegaly, hepatomegaly and generalized lymphadenopathy are most common in patients with myelofibrosis compared to patients without myelofibrosis. The expressed myelofibrosis in all cases was associated with hepatosplenomegaly. Comparing the morphometric and clinical data, it is established that in the chronic phase of chronic myeloid leukemia in the onset of the disease, the relative area of foci of initial myelofibrosis more than 60 %, the relative area of foci of pronounced myelofibrosis more than 40 %, and the granulocyte-megakaryocytic subtype of bone marrow tumor are associated with the development of relapse or progression of disease after 1st or 2nd line of chemotherapy. In the onset of chronic lymphocytic leukemia, the relative area of foci of initial myelofibrosis more than 20 %, the relative area of foci of pronounced myelofibrosis more than 11 %, and the diffuse type of bone marrow tumor lesion are associated with the development of relapse or progression of disease after 1st or 2nd line of chemotherapy.

Key words: chronic myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, myelofibrosis, clinical and prognostic value.

*Dolgikh T.Yu. – candidate of medical sciences, senior researcher of laboratory of molecular cell mechanisms
of neoplastic processes, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Vinogradova E.V. – doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory of general pathology
and pathomorphology, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Kapustina V.I. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of molecular mechanisms
of pathological processes, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Senchukova S.R. – doctor of medical sciences, leading researcher of laboratory of molecular cell mechanisms
of neoplastic processes, e-mail: pathol@inbox.ru*

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ МЕТОДОМ ИЛИЗАРОВА

Марина Владимировна ЧЕПЕЛЕВА, Николай Михайлович КЛЮШИН,
Дарья Сергеевна ЛЕОНЧУК, Елена Ивановна КУЗНЕЦОВА

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

Изучены показатели клеточного иммунитета 26 пациентов (13 женщин и 13 мужчин) со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита плеча в возрасте 46 (39–51) лет в процессе хирургического лечения методом монолокального чрескостного остеосинтеза по Илизарову. Исследования проводились в дооперационном периоде и на этапах лечения: 3-и, 7-е, 21-е сутки после остеосинтеза, 1-е сутки после снятия аппарата. Обязательным критерием отбора было отсутствие послеоперационных осложнений, а также рецидивов не менее года после демонтажа аппарата. В качестве контрольных использовались иммунологические показатели 30 относительно здоровых добровольцев аналогичного возраста (15 мужчин и 15 женщин), составивших контрольную группу. В исследование не включались носители HCV, HIV, HBsAg, лица с сопутствующей соматической патологией, способной повлиять на результаты иммунологического исследования. Изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови осуществлялось методом лазерной проточной цитофлуориметрии. Показатели клеточного иммунитета у пациентов со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита плеча характеризовались умеренной лимфопенией и увеличением числа клеток, несущих маркеры ранней и поздней активации Т-лимфоцитов (соответственно CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺). Физиологическая реакция иммунной системы на санацию гнойного очага и чрескостный остеосинтез выражалась в нормализации количества активированных Т-лимфоцитов на заключительном этапе хирургического лечения. В целом, динамика иммунологических показателей свидетельствовала в пользу стойкого купирования гнойно-воспалительного процесса, что было подтверждено клиническими наблюдениями.

Ключевые слова: посттравматический остеомиелит, остеосинтез, клеточный иммунитет, проточная цитометрия, CD3⁺CD19⁻, CD3⁻CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺.

На внедрение инфекционного агента иммунная система отвечает изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов и появлением на их поверхности определенных функциональных молекул. Под воздействием патогена клетки адаптируются к новым условиям, меняется экспрессия тех или иных мембранных маркеров, что является одним из эффективных механизмов иммунорегуляции [5]. В настоящий момент исследования субпопуляционного состава лимфоцитов при гнойно-воспалительных заболеваниях находятся на стадии накопления данных [6–8]. В связи с увеличением количества тестов интерпретация полученных результатов представляет сложную

задачу. Необходимо учитывать, что на показатели иммунного статуса значительное влияние оказывает метод хирургического лечения. Следовательно, определение взаимосвязей между исследуемыми параметрами может оказать существенную помощь в прогнозировании течения послеоперационного периода [3, 4, 9]. При этом для выявления прогностических и диагностических маркеров осложнений необходимо в первую очередь изучить особенности динамики иммунологических показателей при благоприятном течении послеоперационного периода.

Цель исследования – изучить показатели клеточного иммунитета у пациентов с хроническим

Чепелева М.В. – к.м.н., старший научный сотрудник научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии, e-mail: citoz@mail.ru

Клюшин Н.М. – д.м.н., проф., руководитель клиники гнойной остеологии, e-mail: elenka_kgn@mail.ru

Леончук Д.С. – врач-травматолог-ортопед гнойного травматолого-ортопедического отделения № 2, e-mail: elenka_kgn@mail.ru

Кузнецова Е.И. – младший научный сотрудник научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии, e-mail: citoz@mail.ru

посттравматическим остеомиелитом плеча в процессе лечения методом Илизарова при использовании методики монолокального компрессионно-го остеосинтеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 26 пациентов (13 женщин и 13 мужчин) со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита плеча в возрасте 46 (39–51) лет на этапах хирургического лечения методом монолокального чрескостного остеосинтеза по Илизарову (до операции, на 3-и, 7-е, 21-е сутки после остеосинтеза, на 1-е сутки после снятия аппарата). Длительность заболевания составляла $24,4 \pm 13,5$ месяца. Продолжительность пребывания пациентов в аппарате находилась в пределах $138,0 \pm 11,7$ суток. Обязательным критерием отбора было отсутствие послеоперационных осложнений, а также рецидивов не менее года и более после снятия аппарата. Контрольную группу составили 30 относительно здоровых добровольцев аналогичного возраста (15 мужчин и 15 женщин). В исследование не включались носители HCV, HIV, HBsAg, лица с сопутствующей соматической патологией, способной повлиять на результаты иммунологического исследования. В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, Fortaleza, Brazil, October 2013).

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови изучали с помощью лазерной проточной цитофлуориметрии на лазерном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител производства Immunotech (Франция). Определяли содержание Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$), В-лимфоцитов ($CD3^-CD19^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$), Т-лимфоцитов с маркером ранней ($CD3^+CD25^+$) и поздней активации ($CD3^+HLA-DR^+$), подсчитывали иммунорегуляторный индекс ($CD4/CD8$). Содержание лейкоцитов и лимфоцитов определяли на гемоанализаторе ABX Pentra 60 (HORIBA Medical, США).

Каждый из этапов хирургического лечения сравнивали с дооперационным уровнем. Показатели дооперационного периода и периода после снятия аппарата сравнивали с контрольной группой. Полученные данные анализировали с помощью методов непараметрической статистики; межгрупповые сравнения проводили с использованием рангового метода Манна – Уит-

ни, внутригрупповые – при помощи рангового метода Уилкоксона. Описательные статистики результатов исследования представлены также в виде непараметрических статистик: медианы, первого и третьего квартилей (Me [Q1; Q3]). Исходный уровень альфа для принятия или отклонения нулевой гипотезы в настоящем исследовании был принят равным 0,05. При сравнении этапов хирургического лечения с дооперационным периодом (4 пары сравнения) с учетом поправки Бонферрони критической величиной альфа считали $\alpha = 0,0125$. При сравнении дооперационного этапа и периода после снятия аппарата Илизарова с контрольной группой (2 пары сравнения) с учетом поправки Бонферрони критической величиной альфа считали $\alpha = 0,025$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На дооперационном этапе отмечалась тенденция к увеличению количества лейкоцитов в группе с остеомиелитом. Относительное содержание лимфоцитов было достоверно ниже, чем в контрольной группе (рис. 1, а). В настоящее время сведения, касающиеся Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с хроническим остеомиелитом, достаточно противоречивы, что, вероятно, связано с множеством факторов, включая стадию заболевания, активность гнойно-воспалительного процесса, локализацию очага, количество хирургических вмешательств в анамнезе, наличие сопутствующей патологии и т.п. С одной стороны, приводятся данные о выраженной депрессии клеточного звена иммунной системы, с другой стороны – о нормальном содержании CD3 [1, 2]. Наши исследования не выявили (см. рис. 1, а, таблицу) статистически значимых отличий от показателей контрольной группы в отношении Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$) и В-лимфоцитов ($CD3^-CD19^+$). В связи с активным гнойно-воспалительным процессом количество активированных лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$ и $CD3^+HLA-DR^+$) было повышено (см. рис. 1, а, таблицу).

Реакция иммунной системы на операционную травму характеризовалась еще более выраженным снижением количества лимфоцитов в сравнении с показателями дооперационного периода (см. таблицу). Ожидаемым было увеличение числа лейкоцитов, однако показатель остался на уровне дооперационных значений, что, по нашему мнению, объясняется снижением резервных возможностей иммунной системы у пациентов с хроническим остеомиелитом. В связи с уменьшением числа лимфоцитов в раннем послеоперационном периоде достоверно повышалось относительное содержание Т-лимфоцитов

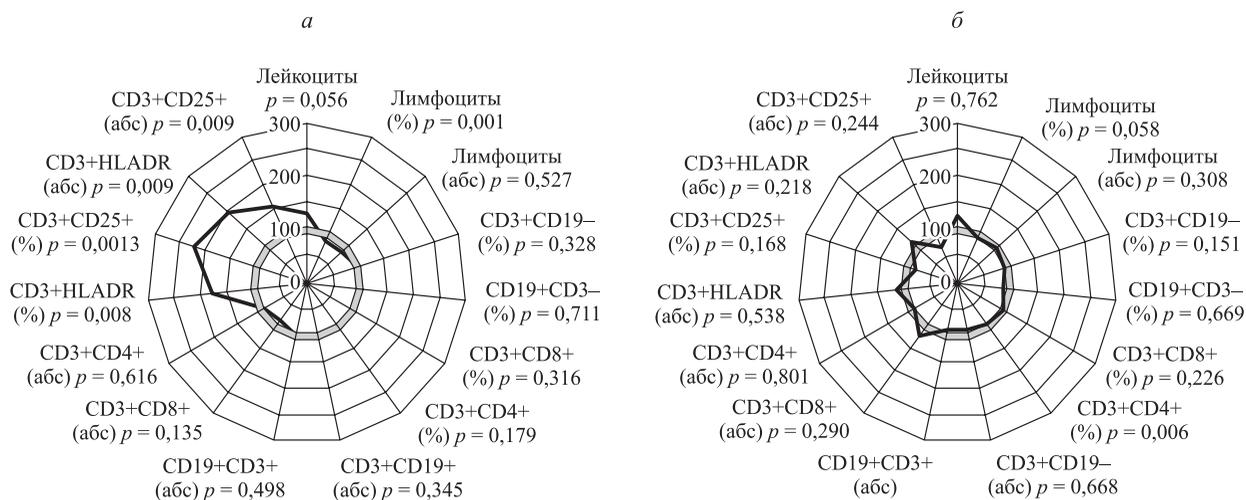


Рис. 1. Показатели клеточного иммунитета пациентов с остеомиелитом на дооперационном этапе (а) и после снятия аппарата (б) в сравнении с контрольной группой. Медианные значения иммунологических показателей в подгруппах больных представлены в виде относительной величины от медианного уровня контрольной группы, принятого за 100 %

(CD3⁺CD19⁻). Увеличение показателя происходило за счет хелперной популяции (CD3⁺CD4⁺) и было обусловлено стрессорной реакцией иммунной системы на хирургическую травму. На 3-и сутки отмечалась тенденция к повышению количества клеток, характеризующих раннюю активацию Т-лимфоцитов. Относительное и абсолютное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) при этом сохранялось на уровне дооперационных значений. Уже через 7 суток после операции относительное количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов возвращалось к дооперационному уровню.

Интересными были изменения, отмеченные на 21-е сутки после операции (см. таблицу). На данном этапе, в сравнении с дооперационными значениями, достоверно снижалось количество лейкоцитов. Отмечена тенденция к снижению относительного количества Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) при одновременном увеличении относительного числа цитотоксических Т-лимфоцитов, что привело к статистически значимому снижению иммунорегуляторного индекса (рис. 2). Если важная роль Т-хелперов как активного участника бактериальной воспалительной реакции определена, то участие в бактериальном воспалении цитотоксических Т-лимфоцитов, привычно ассоциирующихся с вирусной инфекцией, вызывает много вопросов [10]. Высказываются предположения, что цитотоксические лимфоциты задействованы в элиминации фагоцитирующих клеток, внутри которых способны выживать инфекционные агенты, а также о возможной экспрессии ими медиаторов костной резорбции [10]. При этом роль CD8-позитивных Т-клеток в этиопатогенезе

бактериальных инфекций не доказана. Наблюдаемое на 21-е сутки увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов происходило на фоне благоприятного течения послеоперационного периода и, по-видимому, являлось следствием физиологического перераспределения субпопуляций Т-лимфоцитов, вызванного стиханием воспалительного процесса. Кроме того, на данном этапе, в сравнении с дооперационным уровнем, достоверно снижалось количество CD3⁺CD25⁺, харак-

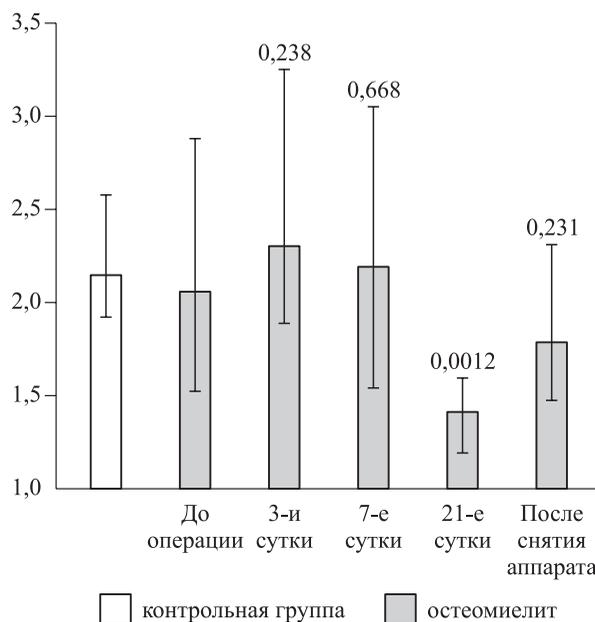


Рис. 2. Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) у пациентов с остеомиелитом в процессе монолокального компрессионного остеосинтеза; приведены абсолютные значения p в сравнении с дооперационным периодом

Таблица

Содержание лейкоцитов и субпопуляций лимфоцитов у пациентов с остеомиелитом в процессе монолокального компрессионного остеосинтеза, Me [Q1; Q3]

Этап лечения	Лейкоциты	Лимфоциты	Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻	Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	Цитотоксические Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD8 ⁺	В-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺	Т-лимфоциты с маркером ранней активации CD3 ⁺ CD25 ⁺	Т-лимфоциты с маркером поздней активации CD3 ⁺ HLA-DR ⁺
До операции	7,2 [5,9; 8,25]	28,0 [25,0; 32,0]	72,65 [70,55; 78,25]	50,5 [45,55; 53,60]	24,05 [18,43; 28,85]	10,15 [6,43; 13,10]	6,95 [4,52; 9,2]	5,85 [3,63; 7,58]
		1,79 [1,49; 2,2]	1,3 [1,1; 1,73]	0,86 [0,74; 1,1]	0,36 [0,28; 0,49]	0,21 [0,14; 0,28]	0,11 [0,1; 0,18]	0,11 [0,06; 0,15]
На 3-и сутки		22,0 ^{p=0,001} [14,0; 29,0]	79,95 ^{p=0,0037} [74,43; 82,68]	58,6 ^{p=0,0053} [50,9; 60,0]	23,5 ^{p=0,94} [19,65; 28,38]	8,35 ^{p=0,919} [6,50; 13,18]	9,3 ^{p=0,063} [7,08; 9,83]	6,92 ^{p=0,728} [5,13; 8,0]
	7,0 ^{p=0,673} [5,0; 8,0]	1,41 ^{p=0,0053} [1,06; 1,87]	1,07 ^{p=0,019} [0,82; 1,40]	0,76 ^{p=0,122} [0,59; 0,91]	0,32 ^{p=0,139} [0,23; 0,45]	0,13 ^{p=0,047} [0,08; 0,24]	0,13 ^{p=0,748} [0,1; 0,16]	0,08 ^{p=0,728} [0,07; 0,14]
На 7-е сутки		24,5 ^{p=0,174} [20,0; 28,25]	79,55 ^{p=0,033} [72,6; 82,0]	55,5 ^{p=0,118} [45,0; 61,7]	25,3 ^{p=0,727} [18,75; 31,83]	9,05 ^{p=0,749} [6,07; 13,6]	7,85 ^{p=0,156} [7,15; 8,3]	7,06 ^{p=0,156} [5,33; 8,21]
	6,45 ^{p=0,308} [5,68; 7,28]	1,52 ^{p=0,013} [1,27; 1,77]	1,14 ^{p=0,089} [0,92; 1,36]	0,8 ^{p=0,125} [0,62; 0,89]	0,35 ^{p=0,727} [0,3; 0,44]	0,14 ^{p=0,013} [0,09; 0,18]	0,12 ^{p=0,749} [0,1; 0,15]	0,11 ^{p=0,969} [0,07; 0,14]
На 21-е сутки		30,0 ^{p=0,602} [23,5; 35,0]	76,25 ^{p=0,014} [73,73; 81,08]	44,45 ^{p=0,0311} [41,2; 48,7]	31,0 ^{p=0,0008} [28,98; 34,35]	8,0 ^{p=0,437} [6,0; 13,5]	4,2 ^{p=0,0003} [3,7; 5,0]	5,9 ^{p=0,580} [4,9; 6,65]
	5,75 ^{p=0,0085} [5,0; 6,4]	1,52 ^{p=0,514} [1,35; 1,76]	1,13 ^{p=0,101} [0,93; 1,35]	0,7 ^{p=0,0120} [0,53; 0,83]	0,48 ^{p=0,072} [0,39; 0,61]	0,11 ^{p=0,041} [0,09; 0,20]	0,07 ^{p=0,0098} [0,05; 0,08]	0,09 ^{p=0,472} [0,07; 0,11]
После снятия аппарата		30,0 ^{p=0,520} [22,7; 33,5]	72,50 ^{p=0,513} [70,75; 75,73]	46,0 ^{p=0,083} [39,9; 49,5]	26,3 ^{p=0,298} [19,7; 30,35]	9,4 ^{p=0,432} [8,93; 13,05]	2,5 ^{p=0,0098} [2,3; 4,0]	3,5 ^{p=0,0029} [2,9; 4,0]
	7,0 ^{p=0,790} [6,15; 7,4]	2,02 ^{p=0,714} [1,6; 2,4]	1,45 ^{p=0,444} [0,91; 1,65]	0,93 ^{p=0,096} [0,7; 1,05]	0,51 ^{p=0,245} [0,35; 0,71]	0,18 ^{p=0,974} [0,14; 0,25]	0,05 ^{p=0,0084} [0,03; 0,07]	0,07 ^{p=0,011} [0,06; 0,08]
Контрольная группа		32,5 [29,3; 36,0]	75,1 [71,3; 77,8]	49,0 [44,0; 52,9]	25,0 [22,5; 30,0]	10,4 [8,23; 12,0]	3,1 [2,93; 4,2]	3,0 [2,0; 4,0]
	5,5 [5,0; 6,9]	2,0 [1,7; 2,23]	1,4 [1,23; 1,78]	0,98 [0,71; 1,12]	0,42 [0,36; 0,61]	0,2 [0,16; 0,24]	0,07 [0,04; 0,08]	0,05 [0,04; 0,082]

Примечание. Обозначена статистическая значимость отличий от величин соответствующих показателей в дооперационным периоде наблюдения.

теризующих раннюю активацию Т-лимфоцитов (см. таблицу).

После снятия аппарата относительное и абсолютное содержание В- и Т-лимфоцитов, а также субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов с остеомиелитом не отличалось от значений контроля (см. рис. 1, б), наиболее показательной была динамика содержания активированных лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺HLA-DR⁺), которая значительно уменьшилась по сравнению с 21 сутками после операции (см. таблицу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показатели клеточного иммунитета до оперативного вмешательства у пациентов со свищевой формой хронического посттравматического остеомиелита плеча характеризовались умеренной лимфопенией и увеличением числа клеток, несущих маркеры ранней и поздней активации Т-лимфоцитов. Физиологическая реакция иммунной системы на санацию гнойного очага и чрескостный остеосинтез выражалась в нормализации количества активированных Т-лимфоцитов на заключительном этапе хирургического лечения. В целом динамика иммунологических показателей свидетельствовала в пользу стойкого купирования гнойно-воспалительного процесса, что коррелировало с клиническими проявлениями заболевания. Полученные данные можно использовать для контроля и прогнозирования течения послеоперационного периода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев М.Ю., Крестова Е.И., Живцов О.П. Оценка применения иммуномодулирующей терапии в лечении хронического остеомиелита длинных трубчатых костей // *Соврем. пробл. науки и образования*. 2017. (5). 174–176.

2. Тевс Д.С., Калуцкий П.В., Лазаренко В.А. Нарушения иммунного и цитокинового статуса у больных хроническим остеомиелитом костей стопы // *Казан. мед. журн.* 2013. 94. (4). 460–463.

3. Чепелева М.В., Ключин Н.М. Иммунологические особенности хронического посттравматического остеомиелита // *Травматология и ортопедия России*. 2012. (2). 67–70.

4. Чепелева М.В. Факторный анализ в оценке состояния клеточного иммунитета у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями длинных трубчатых костей и крупных суставов // *Клин. лаб. диагностики*. 2013. (11). 41–45.

5. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.

6. Gupta N., Banerjee S., Timitrov, Sharma R., Roy S.G., Shende T.M., Ansari M.T., Singh G., Nischal N., Wig N., Soneja M. Osteomyelitis due to multiple rare infections in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia // *Intractable Rare Dis. Res.* 2017. 6. (3). 206–210.

7. Lee L.Y., Miyamoto Y.J., McIntyre B.W., Höök M., McCrea K.W., McDevitt D., Brown E.L. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses // *J. Clin. Invest.* 2002. 110. (10). 1461–1471.

8. Legarth R.A., Christensen M., Calum H., Katzenstein T.L., Helweg-Larsen J. Cryptococcal rib osteomyelitis as primary and only symptom of idiopathic CD4 penia // *Med. Mycol. Case Rep.* 2014. 25. (4). 16–18.

9. Tiemann A.H., Müller W.L., Wuthe F., Hofmann G.O., Sack U. Risikoeinschätzung bei der Therapie der Osteitis anhand immunologischer Parameter // *Z. Orthop. Unfall.* 2011. 149. (3). 330–335.

10. Wagner C., Heck D., Lautenschläger K., Iking-Konert C., Heppert V., Wentzensen A., Hänsch G.M. T lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: Identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection // *Shock*. 2006. 25. (3). 241–246.

CELL-MEDIATED IMMUNITY IN PATIENTS WITH POSTTRAUMATIC LONG BONE OSTEOMYELITIS IN THE COURSE OF MANAGEMENT WITH THE ILIZAROV METHOD

**Marina Vladimirovna CHEPELEVA, Nikolay Mikhailovich KLYUSHIN,
Dar'ya Sergeevna LEONCHUK, Elena Ivanovna KUZNETSOVA**

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

Cell-mediated immunity parameters were studied in 26 patients (13 males, 13 females) aged 46 years (range: 39–51 years) with fistular type of chronic posttraumatic osteomyelitis of the humerus during the course of surgical treatment with the Ilizarov monofocal transosseous osteosynthesis. The study time-points were pre-surgery period and the following treatment stages: days 3, 7, 21 after osteosynthesis and day 1 after removal of the device. An obligatory criterion of inclusion was absence of postoperative complications and infection recurrence at least a year after removal of the apparatus. Control group were 30 healthy volunteers in the similar age (15 males, 15 females). Carriers of HCV, HIV, HBsAg and persons with concomitant somatic pathology that could affect the results of immunological study were not included. The study of subpopulation composition of the peripheral blood lymphocytes was carried out using laser flow cytometry. The parameters of cell-mediated immunity in patients with a fistular type of chronic posttraumatic osteomyelitis of the humerus were characterized by mild lymphopenia, increase in the number of cells of early and late activation of T lymphocytes (CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺). Physiological response of the immune system to debridement of the purulent foci and transosseous osteosynthesis was normalization of the number of activated T-lymphocytes at the final stage of surgical treatment. In general, the dynamic changes of immunological indices were in favor of persistent arrest of the infection process and were confirmed by clinical observations.

Key words: posttraumatic osteomyelitis, osteosynthesis, flow cytometry, cell-mediated immunity, CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺.

Chepeleva M.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of clinical laboratory of microbiology and immunology, e-mail: citoz@mail.ru

Klyushin N.M. – doctor of medical sciences, professor, head of the clinic of phylogenic osteology, e-mail: elenka_kgn@mail.ru

Leonchuk D.S. – orthopaedic surgeon of bone infection department, e-mail: elenka_kgn@mail.ru

Kuznetsova E.I. – junior researcher of clinical laboratory of microbiology and immunology, e-mail: citoz@mail.ru

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫМ ФОКУСИРОВАННЫМ УЛЬТРАЗВУКОМ В СОЧЕТАНИИ С АНДРОГЕННОЙ ДЕПРИВАЦИЕЙ

Владимир Павлович ЛЕВИН¹, Александр Израилевич НЕЙМАРК¹,
Игорь Викторович КАЧЕСОВ², Сергей Маркович БАЛАХНИН²,
Максим Александрович БАКАРЕВ²

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

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

Цель исследования – изучить параметры микрокровотока и морфометрические особенности микроциркуляторного русла предстательной железы в условиях воздействия высокоинтенсивным фокусированным ультразвуком (ВИФУ) в сочетании с андрогенной депривацией для оценки эффективности лечения рака предстательной железы. **Материал и методы.** 119 пациентов с аденокарциномой предстательной железы (T2a-cN0M0) обследованы в предоперационный период и через 3–36 мес. после применения ВИФУ. Проведен сравнительный анализ численной плотности микроциркуляторного русла предстательной железы и параметров лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) в точке проекции простаты. **Результаты и их обсуждение.** Показано, что к факторам, ассоциированным с успешной ВИФУ-абляцией (отсутствие рецидива в течение 3-летнего периода наблюдения), относятся более высокая численная плотность микрососудов в зоне опухолевого очага, а также выраженная редукция этого показателя в зоне сохранившихся неопухолевых желез после сеанса ВИФУ, сопряженная со значительным снижением параметров микроциркуляции по данным ЛДФ. Применение андрогенной депривации в течение 1–3 мес. перед ВИФУ уже на предоперационном этапе приводит к уменьшению плотности сосудистого русла первичной опухоли и снижению показателя микроциркуляции в точке проекции предстательной железы. В сравнении с изолированным воздействием ВИФУ, сочетание ультразвуковой абляции с курсом андрогенной блокады сопровождается относительным снижением числа микрососудов в зонах опухолевой и неопухолевой паренхимы в контрольных образцах биопсий пациентов с рецидивом. Достоверная ассоциация между повышением показателей микроциркуляции через 6 мес. и более после ВИФУ и выявлением локального рецидива указывает на возможность использования ЛДФ в комплексном мониторинге результатов ВИФУ-терапии аденокарциномы предстательной железы.

Ключевые слова: рак предстательной железы, высокоинтенсивный фокусированный ультразвук, андрогенная депривация, численная плотность микрососудов, лазерная доплеровская флоуметрия.

Рак предстательной железы (РПЖ) – одна из важнейших причин онкологической заболеваемости и смертности мужского населения развитых стран мира [2]. За последние десятилетия повысилась частота выявления локализованных форм заболевания, предложены новые малоинвазивные и мультимодальные подходы к лечению, одним из которых является абляция предстательной желе-

зы (ПЖ) высокоинтенсивным фокусированным ультразвуком (ВИФУ) [10] в сочетании с курсом неoadьювантной гормональной терапии (ГТ) [6].

Применение альтернативных методик требует уточнения критериев оценки эффективности лечения и прогноза дальнейшего течения заболевания [7]. Поскольку рост и метастазирование новообразований различных локализаций сопряжены

Левин В.П. – аспирант кафедры урологии и нефрологии, e-mail: pathol@inbox.ru

Неймарк А.И. – д.м.н., проф., зав. кафедрой урологии и нефрологии, e-mail: rector@agmu.ru

Качесов И.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии важнейших заболеваний, e-mail: pathol@inbox.ru

Балахнин С.М. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов, e-mail: pathol@inbox.ru

Бакарев М.А. – д.м.н., проф., зав. лабораторией клинической морфологии важнейших заболеваний, e-mail: pathol@inbox.ru

с процессами опухоль-ассоциированного ангиогенеза, большое значение в этом аспекте может иметь оценка ангиогенного статуса опухоли, взаимосвязь которого с клиническим прогнозом при РПЖ пока не находит однозначного подтверждения [13–16]. Противоречивые данные частично можно объяснить тем, что результаты определения наиболее часто используемого показателя – численной плотности микроциркуляторного русла (ПМЦР) – зависят от вида использованных антител, а также от выбора репрезентативных участков в условиях мультицентричной топографии опухоли и гетерогенной архитектоники микрососудистой сети [13, 14].

В условиях быстрого развития методов неинвазивной визуализации перспективным подходом к оценке опухолевого ангиогенеза может стать синтез функциональных и морфологических способов анализа микроциркуляторно-тканевых систем. В настоящее время для оценки кровообращения в ПЖ наиболее часто используется ультразвуковая цветная доплерография, однако разрешение данного метода недостаточно для регистрации кровотока в новообразованных микрососудах [16]. Применение коротковолнового лазерного излучения делает возможным получение отраженного сигнала от отдельных эритроцитов из более тонкого слоя ткани [3].

Поскольку анатомическое расположение ПЖ не позволяет провести непосредственное измерение, ряд авторов предлагает использовать метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) для кожной регистрации кровотока в точке проекции простаты (Т1) исходя из представления о том, что состояние микроциркуляции в этой зоне отражает соответствующие процессы в органе [1, 3]. Сопоставление параметров ЛДФ-граммы при кожной регистрации с показателями, полученными непосредственно с органа во время операции при аденоме и РПЖ, показало выраженную корреляцию между ними, что позволяет использовать полученные результаты для косвенной оценки микроциркуляции в ткани ПЖ [3].

Цель исследования – изучить параметры микрокровоотока и морфометрические особенности микроциркуляторного русла ПЖ в условиях воздействия ВИФУ в сочетании с андрогенной депривацией для оценки безрецидивной выживаемости и уточнения критериев прогноза локального рецидива.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 119 пациентов с РПЖ, которым за период 2011–2017 г. проведено лечение ВИФУ на аппарате Ablatherm (EDAP TMS S.A.,

Франция) с предшествующей трансуретральной резекцией ПЖ (ТУР ПЖ) на базе урологического отделения Отделенческой клинической больницы ст. Барнаул ОАО «РЖД». Показанием для проведения ВИФУ был морфологически верифицированный РПЖ (стадия T2a-cN0M0) у пациентов, имеющих соматические противопоказания для радикальной простатэктомии или отказавшихся от ее выполнения. Период мониторинга результатов лечения составил от 3 мес. до 3 лет. Контрольные пункционные биопсии простаты носили плановый характер (12 ± 3 мес.) либо выполнялись при подозрении на биохимический рецидив. Показаниями к проведению ТУР ПЖ были снижение объема ПЖ перед сеансом ВИФУ, а также стриктуры простатического отдела уретры.

По результатам патоморфологического анализа контрольного материала все пациенты были разделены на две группы: 1-я – 91 пациент в возрасте от 49 до 82 лет ($65,8 \pm 8,46$ года), у которых за период мониторинга не выявлено признаков местного прогрессирования; 2-я группа – 28 пациентов в возрасте от 52 до 82 лет ($67,6 \pm 7,94$ года) с местным рецидивом (резидуальным ростом) РПЖ. В 75 % случаев рецидив диагностирован в относительно ранние сроки – через 6–18 мес. (21 наблюдение), в 25 % – через 21–36 мес. после сеанса ВИФУ.

В 27 (30 %) наблюдениях 1-й и 11 (39 %) случаях 2-й группы ультразвуковая абляция ПЖ проведена в сочетании с андрогенной депривацией. Использовали флутамид (по 250 мг 3 раза в день) в течение 1–3 мес. перед ВИФУ и гозерелин (золадекс) в дозировке 3,6 мг каждые 28 дней или 10,8 мг каждые 3 мес. на протяжении 3–6 месяцев.

Для косвенной неинвазивной оценки микроциркуляции в ткани ПЖ применяли метод ЛДФ в биологически активной точке проекции простаты (Т1) [3–5]. Использован лазерный анализатор микроциркуляции крови ЛАКК-02 (НПП «ЛАЗ-МА», Россия). Исследование проводили через 3 и 6 мес. после ВИФУ, затем каждые 6 мес. С целью определения нормальных значений аналогичным способом осуществляли запись ЛДФ у 32 человек в возрасте от 53 до 68 лет без патологии со стороны ПЖ (контрольная группа). При обработке ЛДФ-грамм с использованием программного обеспечения определяли средний поток крови, или показатель микроциркуляции (ПМ, перфузионные единицы (пф. ед.)), среднее квадратическое отклонение (СКО, пф. ед.) и коэффициент вариации (КВ) [3].

Патоморфологическое исследование проведено на материале 253 образцов первичных и контрольных биопсий, а также ТУР ПЖ 32 больных

(17 пациентов 1-й и 15 – 2-й группы в возрасте от 52 до 82 лет, средний возраст $68,1 \pm 7,7$ года), выполненных перед сеансом лечения ВИФУ с целью уменьшения объема простаты. Особенности микроциркуляторного русла при сочетанном применении ВИФУ и ГТ проанализированы у 20 пациентов (11 наблюдений 1-й группы и 9 – 2-й группы). Распределение больных по возрасту и клинико-лабораторным показателям в исследуемых группах и соответствующих подгруппах общего массива наблюдений достоверно не отличалось. У 15 пациентов 1-й группы (без рецидива) в образцах до лечения зарегистрирована умеренно дифференцированная аденокарцинома ($\leq 3+4$ балла по шкале Глисона), в 2 (12 %) случаях индекс Глисона составил 7 (4+3) баллов. Во 2-й группе доля менее дифференцированных форм составила в сумме 60 % – аденокарцинома с суммой баллов 7 (4+3), 8 и 9 баллов установлена в 6 (40 %), 1 (7 %) и 2 (13 %) наблюдениях соответственно.

Биоптаты и образцы, полученные при ТУР ПЖ, фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, обрабатывали по общепринятой методике и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса, по ван Гизону с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Парафиновые срезы анализировали в универсальном исследовательском микроскопе Leica DM 4000B (Leica Microsystems GmbH, Германия), для получения микрофотографий использовали цифровую камеру Leica DFC320 и компьютерную программу Leica QWin V3. С целью выявления сосудов микроциркуляторного русла проводили иммуногистохимическое окрашивание с использованием моноклональных антител к маркеру эндотелиальных клеток CD34 (клон QVEnd/10, Spring Bioscience, разведение 1:100).

Морфометрический анализ выполняли при помощи компьютерной программы Leica QWin V3. Измеряли численную плотность микрососудов (число на мм^2) в зонах опухолевой и неопухолевой паренхимы. Подсчет проводили в 5–7 полях зрения при $\times 200$, численную плотность определяли как среднее трех максимальных значений. Отдельно расположенные CD34-позитивные клетки и кластеры клеток расценивали как один микрососуд.

Проверку гипотезы о нормальности распределения и равенстве выборочных дисперсий осуществляли с использованием критериев Шапиро – Уилка и Левена. Для относительных величин значения представлены в виде процентного соотношения, для непрерывных – в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$). С целью сравнения двух независимых

групп, а также связанных выборок по количественному признаку использовали *t*-критерий и парный *t*-критерий Стьюдента. При анализе таблиц сопряженности применяли точный критерий Фишера, рассчитывали относительный риск (ОР) и границы 95%-го доверительного интервала (95 % ДИ). Коррелятивные взаимоотношения оценивали с помощью критериев Пирсона и Спирмена. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке микроциркуляции методом ЛДФ у пациентов с РПЖ до сеанса ультразвуковой абляции выявлено существенное уменьшение основных параметров микроциркуляции в точке проекции простаты в сравнении с контрольной группой лиц, не имеющих патологии со стороны ПЖ, – средние значения ПМ и СКО ($6,26 \pm 0,66$ и $2,25 \pm 0,23$ пф. ед.) были на 34 и 32 % ниже соответствующих показателей контрольной группы ($10,28 \pm 0,94$ и $3,32 \pm 0,07$ пф. ед., $p < 0,001$). При сравнительном анализе наблюдений 1-й и 2-й групп отмечена тенденция к преобладанию более высоких исходных значений ПМ у пациентов без рецидива ($p = 0,06$) (табл. 1). Предварительное применение андрогенной депривации в течение 1–3 мес. перед ВИФУ ассоциировано с более значительным снижением ПМ и СКО ($6,02 \pm 0,47$ и $2,17 \pm 0,22$ пф. ед. соответственно) в сравнении со случаями без ГТ ($6,38 \pm 0,71$ и $2,29 \pm 0,23$ пф. ед. соответственно, $p < 0,01$).

По данным морфометрического исследования первичной биопсии ПЖ до проведения сеанса ВИФУ плотность микрососудов в зоне опухолевой паренхимы в образцах 1-й группы была на 41 % больше аналогичного показателя у пациентов с рецидивом ($p < 0,001$) и в 1,75 раза превышала ПМЦР в области неопухолевой паренхимы (табл. 2, рис. 1, а). В наблюдениях 2-й группы различия между показателями опухолевой и неопухолевой паренхимы выявлены лишь на уровне тенденции ($p = 0,07$). Плотность микрососудов в опухоли в первичном биопсийном материале не коррелировала со степенью ее дифференцировки (суммарной оценкой по шкале Глисона) и была отрицательно ассоциирована с наличием рецидива РПЖ после лечения ($r = -0,49$; $p < 0,001$). Отсутствие положительной корреляции между ПМЦР и клинико-патологическими характеристиками опухоли было отмечено и в ряде других работ, что подчеркивает имеющиеся противоречия в оценке роли ангиогенного статуса в прогрессировании РПЖ [13–15].

Предварительное применение неoadьювантной гормональной терапии сопровождалось от-

Таблица 1

Динамика показателя микроциркуляции в точке проекции предстательной железы на фоне лечения РПЖ методом ВИФУ в сочетании с андрогенной депривацией (пф. ед., $M \pm \sigma$)

№	Пациенты	n	До ВИФУ	Сроки наблюдения после ВИФУ, мес.			Контроль [#]
				3	6–18*	24–36*	
			1	2	3	4	5
1	1-я группа	91	6,33 ± 0,69	4,24 ± 0,82 ¹	3,29 ± 0,23 ^{1,2}	3,54 ± 0,30 ^{1,2,3}	3,36 ± 0,39 ^{1,2,3,4}
2	ВИФУ	64	6,43 ± 0,75	4,18 ± 0,77 ¹	3,33 ± 0,24 ^{1,2}	3,55 ± 0,32 ^{1,2,3}	3,40 ± 0,40 ^{1,2,4}
3	ВИФУ+ГТ	27	6,09 ± 0,45	4,40 ± 0,94 ¹	3,20 ± 0,15 ^{1,2}	3,50 ± 0,25 ^{1,2,3}	3,26 ± 0,34 ^{1,2,4}
4	2-я группа	28	6,06 ± 0,50	4,32 ± 0,84 ¹	3,91 ± 0,43 ^{1,2}	3,90 ± 0,60 ¹	5,57 ± 0,88 ^{1,2,3,4}
5	ВИФУ	17	6,21 ± 0,47	4,48 ± 0,92 ¹	4,04 ± 0,41 ¹	3,86 ± 0,59 ¹	5,50 ± 1,07 ^{1,2,3,4}
6	ВИФУ+ГТ	11	5,86 ± 0,47	4,09 ± 0,70 ¹	3,74 ± 0,42 ¹	3,96 ± 0,64 ¹	5,66 ± 0,57 ^{2,3,4}
<i>p</i>			$p_{1-4, 5-6} = 0,06$; $p_{2-3} = 0,03$		$p_{1-4, 2-5, 3-6} < 0,001$; $p_{2-3} = 0,01$; $p_{5-6} = 0,08$	$p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-5, 3-6} < 0,01$	$p_{1-4, 2-5, 3-6} < 0,001$

Примечание. * – средние значения ПМ за соответствующий период наблюдения, # – значения ПМ в сроки, предшествующие контрольной биопсии; здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей: 1–4 – в соответствующих столбцах ($p < 0,05$); p_{1-6} – в соответствующих строках.

Таблица 2

Численная плотность микрососудов в зонах опухолевой и неопухолевой паренхимы предстательной железы на фоне лечения РПЖ методом ВИФУ в сочетании с андрогенной депривацией (число на мм², $M \pm \sigma$)

№	Образцы	n	Опухолевая паренхима		Неопухолевая паренхима	
			до ВИФУ	контроль	до ВИФУ	контроль
			1	2	3	4
1	1-я группа	118	127,8±41,1	–	73,0 ± 17,9 ¹	48,0 ± 14,1 ³
2	ВИФУ	48	168,7±47,6	–	84,9 ± 19,0 ¹	50,7 ± 14,0 ³
3	ВИФУ+ГТ	70	113,4±27,6	–	70,2 ± 17,0 ¹	46,6 ± 14,4 ³
4	2-я группа	135	90,5±29,8	106,4 ± 46,6	77,2 ± 14,4	90,6 ± 31,6
5	ВИФУ	58	99,8±31,7	143,0 ± 43,6 ¹	82,4 ± 9,8	110,2 ± 30,0 ³
6	ВИФУ+ГТ	77	76,8±21,0	75,8 ± 18,9	73,0 ± 16,5	68,3 ± 14,0
<i>p</i>			$p_{1-4, 2-5, 3-6, 2-3} < 0,001$; $p_{5-6} = 0,03$	$p_{5-6} = 0,007$		$p_{1-4, 2-5} < 0,001$; $p_{3-6, 5-6} < 0,01$

носителем снижением ПМЦР первичной опухоли у пациентов 1-й и 2-й групп на 33 и 23 % соответственно ($p < 0,001$). В зонах неопухолевой паренхимы морфометрические показатели микроциркуляторного русла в образцах 1-й и 2-й групп до ВИФУ достоверно не различались (см. табл. 2), однако при анализе всех случаев зафиксированы умеренное снижение ПМЦР на фоне андрогенной депривации (71,3 ± 16,5 пф. ед.) по сравнению с величиной показателя при отсутствии ГТ (83,1 ± 12,5 пф. ед., $p = 0,03$), умеренная отрицательная взаимосвязь ПМЦР с наличием ГТ ($r = -0,39$; $p = 0,01$), а также ее положительная корреляция с ПМ в точке проекции ПЖ ($r = 0,65$; $p < 0,01$).

Воздействие фокусированного ультразвука на ткань ПЖ, обусловленное суммарным эффектом

теплового воздействия, кавитации и разрушения сосудов опухоли [10, 17], приводит к массивному коагуляционному некрозу [9], очаги которого в последующем замещаются грануляционной и фиброзной тканью (см. рис. 1, б, в). Через 6–18 мес. после ВИФУ-терапии в контрольных биоптатах пациентов 1-й группы наблюдались распространенные фиброзные изменения и выраженная редукция микроциркуляторного русла в области сохранившейся неопухолевой паренхимы, степень которой как при монотерапии ВИФУ, так и при ее сочетании с ГТ была почти одинаковой (см. табл. 2).

У пациентов с рецидивом фиброз во многих случаях захватывал лишь фрагмент образца, в оставшейся части которого на фоне относительно сохраненной стромы располагались скопления

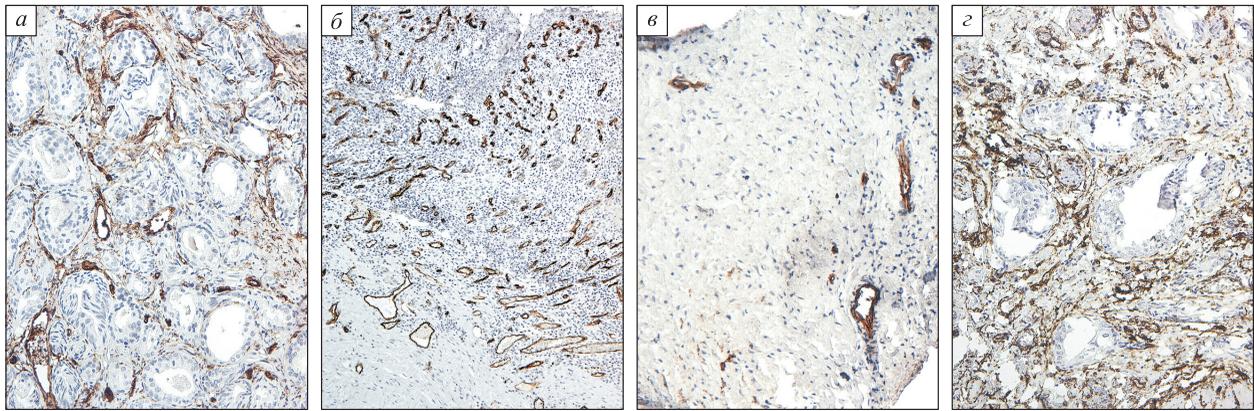


Рис. 1. Экспрессия CD34 в образцах предстательной железы на фоне лечения РПЖ методом ВИФУ в сочетании с андрогенной депривацией. а – высокая плотность микрососудов в очаге аденокарциномы пациента 1-й группы до ВИФУ, $\times 200$; б – неоангиогенез в зоне грануляций у пациента 1-й группы через 3 мес. после ВИФУ, $\times 100$; в – редукция микрососудистого русла на фоне выраженного фиброза у пациента 1-й группы через 12 мес. после ВИФУ в сочетании с ГТ, $\times 100$; г – высокая плотность микроциркуляторного русла в очаге рецидивной опухоли через 12 мес. после монотерапии ВИФУ, $\times 200$

опухолевой или неопухолевой паренхимы. После монотерапии ВИФУ плотность микрососудов в этих зонах (см. рис. 1, г) превышала исходные параметры, в то время как в наблюдениях с сочетанной андрогенной депривацией ее средние значения сохранялись на дооперационном уровне и были достоверно ниже соответствующих показателей после изолированного воздействия ВИФУ (см. табл. 2). Отрицательная корреляционная взаимосвязь между применением ГТ и показателями микрососудистой плотности в зонах опухолевой и неопухолевой паренхимы ($r = -0,81$ и $-0,59$; $p = 0,003$ и $0,02$ соответственно) может указывать на существенную роль андрогенной депривации в ремоделировании микроциркуляторного русла.

По данным клинических и экспериментальных исследований, депрессивный эффект андрогенной блокады на сосудистое русло ПЖ может быть связан с изменением баланса про- и антиангиогенных факторов [8, 11], а также с прямым влиянием на гомеостаз эндотелиальных клеток [12].

При исследовании микрогемодинамики методом ЛДФ уже через 3 мес. после ВИФУ на фоне не до конца завершенных процессов созревания грануляционной ткани (см. рис. 1, б) у пациентов обеих групп зафиксировано резкое снижение параметров микрокровотока при сохранении значительной вариабельности индивидуальных значений ПМ в точке проекции ПЖ (рис. 2, а, б). Достоверные различия между показателями

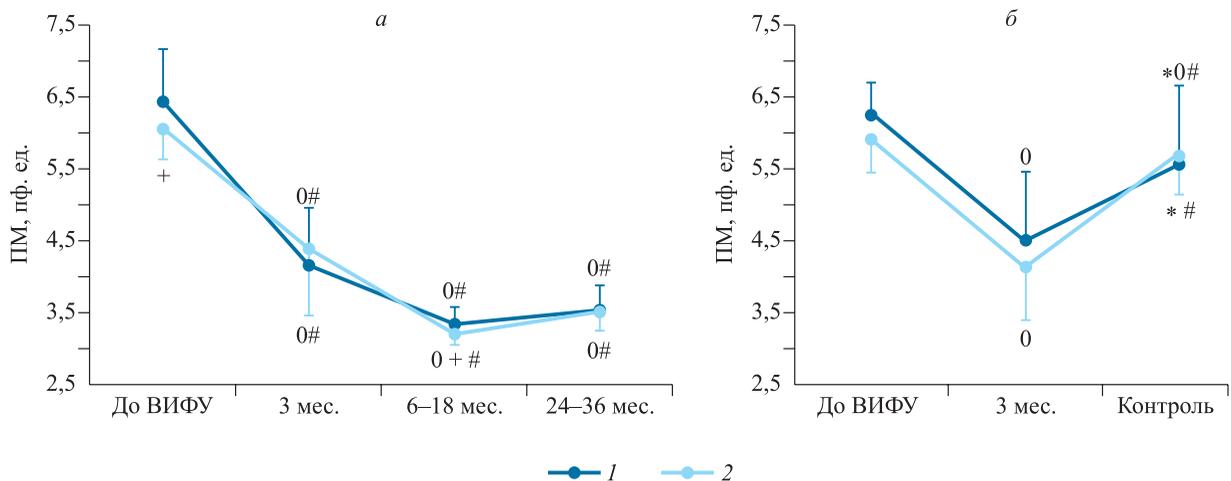


Рис. 2. Динамика показателя микроциркуляции в точке проекции ПЖ в наблюдениях 1-й (а) и 2-й групп (б) на фоне ВИФУ в режиме монотерапии (1) и в сочетании с ГТ (2). Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей: * – 1-й группы (среднее значение ПМ в сроки, предшествовавшие контрольной биопсии, см. табл. 1; $p < 0,001$), + – без ГТ ($p < 0,05$), 0 – до лечения ($p < 0,05$); # – предыдущего периода наблюдения ($p < 0,05$).

1-й и 2-й групп (соответственно $4,24 \pm 0,82$ и $4,32 \pm 0,84$ пф. ед.), а также наблюдениями с наличием и отсутствием ГТ в обеих группах отсутствовали (см. табл. 1).

Через 6–18 мес. после ультразвуковой абляции у пациентов без рецидива фиксировались минимальные значения ПМ (в среднем $3,29 \pm 0,23$ пф. ед.), что совпадало по времени со сроками выполнения плановых контрольных биопсий. Отмечено более выраженное снижение ПМ в случаях с применением сочетанной ГТ (см. табл. 1, рис. 2, а). Через 24–36 мес. у пациентов 1-й группы зарегистрировано умеренное повышение ПМ по сравнению с предыдущим периодом наблюдения при отсутствии различий, ассоциированных с сочетанным применением андрогенной депривации (см. табл. 1, рис. 2, а).

У большинства пациентов 2-й группы показатели микроциркуляции в точке проекции ПЖ после первичного снижения в последующем (через 6–36 мес.) значительно повышались, практически возвращаясь к предоперационному уровню (см. рис. 2, б). Такое возрастание сопряжено с резким увеличением вероятности прогрессирования РПЖ – повышению контрольных значений ПМ до уровня $\geq 4,5$ пф. ед. в 24 из 28 наблюдений (85,7 %) предшествовало морфологической верификации рецидива, в то время как более низкие значения лишь в четырех (4,4 %) случаях были ассоциированы с последующим прогрессированием (ОР = 19,5; 95%-й ДИ 7,4–51,4; чувствительность – 86 %, специфичность – 96 %).

Установлена положительная корреляция контрольных значений ПМ с плотностью микрососудов в области неопухолевых желез ($r = 0,54$; $p = 0,02$) и уровнем ПСА в соответствующий период наблюдения ($r = 0,57$; $p = 0,004$), а также с выявлением локального рецидива ($r = 0,70$; $p < 0,001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ параметров микрогемодинамики в точке проекции простаты и морфометрических особенностей микроциркуляторного русла ПЖ на фоне ВИФУ-терапии локализованного РПЖ показал, что к факторам, ассоциированным с успешной ВИФУ-абляцией (отсутствием рецидива в течение 3-летнего периода наблюдения), относится более высокая численная плотность микрососудов в зоне первичного опухолевого очага, а также выраженная редукция ПМЦР в зоне сохранившихся неопухолевых желез после сеанса ВИФУ, сопряженная со значительным снижением параметров ЛДФ в точке проекции ПЖ.

Заметный вклад в ремоделирование микроциркуляторного русла ПЖ вносит использование андрогенной депривации, которое уже на предварительном этапе приводит к уменьшению ПМЦР первичной опухоли и снижению косвенных показателей микрокровотока. В сравнении с изолированным воздействием ВИФУ сочетание ультразвуковой абляции с курсом андрогенной блокады сопровождается относительным снижением числа микрососудов в зонах опухолевой и неопухолевой паренхимы в контрольных образцах пациентов с рецидивом, а также меньшими значениями ПМ у пациентов 1-й группы через 6–18 мес. после ультразвуковой абляции.

Корреляционные взаимосвязи между параметрами ЛДФ в точке проекции ПЖ и морфометрическими характеристиками ее микрососудистого русла, а также достоверная ассоциация между повторным повышением показателей ЛДФ и выявлением местного рецидива РПЖ через 6 мес. и более после сеанса ультразвуковой абляции указывают на возможность использования данного метода в комплексном мониторинге результатов ВИФУ-терапии локализованного РПЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крянга А.А., Кулишова Т.В., Газаматов А.В. Косвенная оценка состояния микроциркуляции в предстательной железе у больных хроническим абактериальным простатитом в динамике на фоне комплексного сочетанного лечения // Лазер. медицина. 2016. 20. (4). 52–55.
2. Мерабишвили В.М., Петрова Н.Г., Атрощенко А.В., Харитонов М.В. Эпидемиология рака предстательной железы (популяционное исследование) // Вопр. онкологии. 2014. 60. (4). 458–464.
3. Неймарк А.И., Кондратьева Ю.С., Неймарк Б.А. Лазерная доплеровская флоуметрия при заболеваниях мочеполовой системы. М.: Практ. медицина, 2011. 104 с.
4. Неймарк А.И., Неймарк Б.А., Лушикова Е.Л., Бакарев М.А., Левин В.П., Ноздрачев Н.А., Тачалов М.А. Способ диагностики рецидивов рака предстательной железы у мужчин. Пат. 2658460 РФ; Опубл. 21.06.2018.
5. Неймарк А.И., Тарасова Т.С. Способ дифференциальной диагностики рака предстательной железы. Пат. 2361520 РФ; Опубл. 20.07.2009.
6. Неймарк А.И., Тачалов М.А., Неймарк Б.А. Аджувантная гормональная терапия у пациентов, перенесших НИФУ-терапию по поводу локализованного рака предстательной железы // Онкоурология. 2014. (3). 69–72.
7. Фомкин Р.Н., Воронина Е.С., Попков В.М., Маслякова Г.Н., Блумберг Б.И. Прогностическое значение молекулярно-биологических, морфологи-

ческих и клинических маркеров в оценке эффективности лечения локализованного рака предстательной железы высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком // Эксперим. и клин. урология. 2013. (4). 29–33.

8. *Aslan G., Cimen S., Yorukoglu K., Tuna B., Sonmez D., Mungan U., Celebi I.* Vascular endothelial growth factor expression in untreated and androgen-deprived patients with prostate cancer // *Pathol. Res. Pract.* 2005. 201. (8-9). 593–598.

9. *Biermann K., Montironi R., Lopez-Beltran A., Zhang S., Cheng L.* Histopathological findings after treatment of prostate cancer using high-intensity focused ultrasound (HIFU) // *Prostate.* 2010. 70. (11). 1196–1200.

10. *Chaussy C.G., Thuorff S.* High-Intensity focused ultrasound for the treatment of prostate cancer: a review // *J. Endourol.* 2017. 31. (1). S30–37.

11. *Colombel M., Filleur S., Fournier P., Merle C., Guglielmi J., Courtin A., Degeorges A., Serre C.M., Bouvier R., Clézardin P., Cabon F.* Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate // *Cancer Res.* 2005. 65. (1). 300–308.

12. *Godoy A., Watts A., Sotomayor P., Montecinos V.P., Huss W.J., Onate S.A., Smith G.J.* Androgen receptor is causally involved in the homeostasis of the

human prostate endothelial cell // *Endocrinology.* 2008. 149. (6). 2959–2969.

13. *Luczynska E., Gasinska A., Wilk W.* Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in clinically localized prostate cancer // *Pol. J. Pathol.* 2013. 64. (1). 33–38.

14. *Miyata Y., Mitsunari K., Asai A., Takehara K., Mochizuki Y., Sakai H.* Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy // *Prostate.* 2015. 75. (1). 84–91.

15. *Rubin M.A., Buyyounouski M., Bagiella E., Sharir S., Neugut A., Benson M., de la Taille A., Katz A.E., Olsson C.A., Ennis R.D.* Microvessel density in prostate cancer: lack of association with tumor grade, pathologic stage and clinical outcome // *Urology.* 1999. 53. (3). 542–547.

16. *Russo G., Mischi M., Scheepens W., de la Rosette J.J., Wijkstra H.* Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging // *BJU Int.* 2012. 110. 794–808.

17. *Wu F., Chen W.Z., Bai J., Zou J.Z., Wang Z.L., Zhu H., Wang Z.B.* Tumor vessel destruction resulting from high-intensity focused ultrasound in patients with solid malignancies // *Ultrasound Med. Biol.* 2002. 28. (4). 535–542.

FUNCTIONAL AND MORPHOMETRIC EVALUATION OF PROSTATE MICROCIRCULATION FOLLOWING HIGH-INTENSITY FOCUSED ULTRASOUND THERAPY WITH ANDROGEN DEPRIVATION FOR PROSTATIC ADENOCARCINOMA

**Vladimir Pavlovich LEVIN¹, Aleksandr Izrailevich NEYMARK¹,
Igor Viktorovich KACHESOV², Sergey Markovich BALAKHNIN²,
Maksim Aleksandrovich BAKAREV²**

¹ *Altai State Medical University
656038, Barnaul, Lenin av., 40,*

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

Objective. To evaluate morphometric and hemodynamic changes in the prostate microcirculation under high-intensity focused ultrasound therapy (HIFU) combining with androgen deprivation in prostate cancer patients with a focus on the treatment effect assessment. **Material and methods.** 119 patients with localized adenocarcinoma of the prostate (T2a-cN0M0) were examined prior to HIFU ablation and 3 to 36 months following the treatment. Microvascular density in the prostate tissue and hemodynamic parameters recorded by laser Doppler flowmetry at the prostate projection area (PPA) of the skin were analyzed comparatively. **Results and discussion.** Successful HIFU ablation (recurrence free survival at 3-year follow-up period) was associated with higher pretreatment microvascular density in the prostate tumor tissue and with a marked reduction of this parameter in the areas of residual non-neoplastic parenchyma after the ablation, which was accompanied by a significant decrease in PPA microhemodynamics. A course of androgen deprivation administered 1–3 months prior to ablation contributed to a moderate pre-HIFU reduction of tumor vascularization and PPA microcirculation index. As compared to HIFU monotherapy, cooperative use of HIFU and androgen blockade was associated with a relative decrease in the number of microvessels in the areas of residual neoplastic and non-neoplastic parenchyma in cases with local recurrence. A substantial increase of PPA microcirculation indices 6 or more months after HIFU ablation was found to be strongly associated with prostate cancer local recurrence which suggests that laser Doppler flowmetry could be used in the complex monitoring of the outcome from HIFU therapy for prostatic adenocarcinoma.

Key words: prostate cancer, high-intensity focused ultrasound, HIFU, androgen deprivation, microvascular density, laser Doppler flowmetry.

Levin V.P. – postgraduate student, e-mail: pathol@inbox.ru

*Neymark A.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for urology and nephrology,
e-mail: pathol@inbox.ru*

*Kachesov I.V. – candidate of medical sciences, leading researcher of laboratory for clinical morphology
of main diseases, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Balakhnin S.M. – candidate of medical sciences, leading researcher of laboratory for molecular mechanisms
of pathological processes, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Bakarev M.A. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory for clinical morphology of main diseases,
e-mail: pathol@inbox.ru*

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ЦИСТИТА У ЖЕНЩИН РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Константин Геннадьевич НОТОВ^{1,2,3}, Елена Геннадьевна НОВИКОВА¹, Игорь Викторович ФЕОФИЛОВ², Андрей Анатольевич ЕРКОВИЧ^{2,3}, Федор Анатольевич СЕВРЮКОВ⁴, Лариса Петровна ПЛУТАЛОВА³, Игорь Михайлович МИТРОФАНОВ^{1,2}, Вера Георгиевна СЕЛЯТИЦКАЯ¹

¹ *НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

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

³ *Дорожная клиническая больница на станции Новосибирск-Главный
630001, г. Новосибирск, Владимировский спуск, 2А*

⁴ *Дорожная клиническая больница на станции Нижний Новгород ОАО «РЖД»
603140, г. Нижний Новгород, просп. Ленина, 18*

В исследование включено 348 женщин с хроническим циститом, которых распределили на три возрастные группы: группа 1 – от 20 до 39 лет, группа 2 – от 40 до 59 лет, группа 3 – пожилой возраст (от 60 лет и старше). Бактериальная флора выявлена в общей выборке у 35,3 % пациенток без достоверных различий между возрастными группами. Результаты позволяют говорить, что инфекция не является единственной причиной, влияющей на развитие и поддержание хронического воспалительного процесса мочевого пузыря. Встречаемость лейкоплакии мочевого пузыря в возрастных группах 1, 2 и 3 составила 71, 50 и 11 % соответственно. Результаты анкетирования показали нарастание тяжести симптоматики тазовой боли и нарушений мочеиспускания с возрастом. По данным оценки дневников мочеиспускания, выявлено уменьшение эффективного объема мочевого пузыря с возрастом, нарастание частоты мочеиспусканий в дневные и ночные часы. При этом показано достоверное усиление симптоматики при наличии лейкоплакии. Высокая встречаемость плоскоклеточной метаплазии и лейкоплакии, частоты обострений цистита у женщин молодого возраста может быть связана у них с кататоксическим, высокорезактивным типом реагирования переходного эпителия мочевого пузыря. Нарастание симптоматики нарушений мочеиспускания при хроническом цистите у женщин старшего возраста может быть обусловлено неблагоприятным влиянием системных метаболических факторов патогенеза этого заболевания.

Ключевые слова: женщины, возраст, хронический цистит, клинико-лабораторные характеристики, лейкоплакия мочевого пузыря.

Нотов К.Г. – к.м.н., руководитель Урологического центра, ассистент кафедры урологии,
e-mail: Notov@inbox.ru

Новикова Е.Г. – к.м.н., старший научный сотрудник, главный врач клиники, e-mail: rmdc.nsk@gmail.com

Феофилов И.В. – д.м.н., зав. кафедрой урологии, e-mail: fil_urolog@mail.ru

Еркович А.А. – д.м.н., проф. кафедры урологии, врач-уролог Урологического центра,
e-mail: erkovich31@mail.ru

Севрюков Ф.А. – д.м.н., главный внештатный уролог Центральной дирекции здравоохранения,
зав. отделением урологии, e-mail: fedor_sevryukov@mail.ru

Плуталова Л.П. – зам. директора по медицинской части, e-mail: plutalova.lp@med54.ru

Митрофанов И.М. – д.м.н., проф. кафедры педиатрии детских болезней педиатрического факультета,
ведущий научный сотрудник лаборатории патогенеза соматических заболеваний, e-mail: tim07@mail.ru

Селятицкая В.Г. – д.б.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории эндокринологии,
e-mail: csct@centercem.ru

Циститом болеют преимущественно женщины, что связано с анатомо-физиологическими и гормональными особенностями их организма. В течение жизни острый цистит переносят 20–25 % женщин, у каждой третьей из них в течение года возникает рецидив заболевания, а у 10 % оно переходит в хроническую рецидивирующую форму [4]. Для хронических циститов характерно нарушение функциональных и морфологических свойств слизистой оболочки мочевого пузыря с потерей барьерных функций. Причиной появления ирритативной симптоматики, более считается повышение проницаемости эпителия мочевого пузыря и последующее проникновение калия в интерстиций, что интерпретируют как дисфункцию эпителия нижних мочевых путей [12]. Известны возрастные пики заболеваемости циститом, у женщин они приходятся на период активной половой жизни (20–30 лет) и постменопаузальный возраст (старше 50 лет) [5].

Основным этиологическим фактором в развитии цистита у женщин разных возрастных групп считают инфекцию. Так, О.С. Стрельцова, В.Н. Крупин [9] указывают, что практически всегда цистит обусловлен инфекцией. При неосложненных циститах бактериальная инфекция выявляется в 64,7 % случаев [8]. У женщин молодого возраста также важную роль в развитии цистита играют воспалительные процессы внутренних органов, при этом степень и характер изменений в мочевом пузыре зависят от продолжительности патологического процесса в женских половых органах, его активности, степени изменений кровообращения в малом тазу, гормональных расстройств, видового состава микрофлоры и др. [6].

Частота появления расстройств мочеиспускания у женщин климактерического периода нарастает в зависимости от длительности постменопаузы. Это связывают со снижением уровня эстрогенов и на этом фоне с инволюцией переходного эпителия мочевого пузыря и уретры. При этом нарушаются свойства слизистой оболочки, в том числе устойчивость к инфекционным агентам. Следовательно, у женщин пожилого возраста появляется дополнительный гормональный фактор, предрасполагающий к нарушениям мочеиспускания и развитию хронического цистита [2]. К особенностям течения цистита в этой группе пациенток относится развитие явлений воспаления, симптомов нижних мочевых путей без колонизации мочевой системы патогенной микрофлорой, которая, однако, может присоединяться, усугубляя состояние больной [10].

Большое значение в патогенезе хронического цистита имеет лейкоплакия, или метаплазия, эпителия мочевого пузыря, которая обнаруживается

преимущественно у пациенток с рецидивирующими и устойчивыми к лечению формами хронического цистита и морфологически проявляется плоскоклеточной метаплазией эпителия с различной степенью ороговения. При лейкоплакии описаны идентичные интерстициальному циститу механизмы проникновения компонентов мочи в подслизистый слой с развитием болевого симптома [12]. При развитии лейкоплакии в сравнении с ее отсутствием происходит более грубое повреждение слизистой оболочки. С.Х. Аль-Шукри с соавторами [1], обследовав женщин репродуктивного возраста с синдромом хронической тазовой боли, обнаружили, что при наличии лейкоплакии мочевого пузыря наблюдаются более выраженные болевые ощущения и ирритативная симптоматика. Лейкоплакия мочевого пузыря при цистоскопии в группе женщин с синдромом хронических тазовых болей была выявлена в 64,4 % случаев. Выявлена связь между развитием лейкоплакии мочевого пузыря и основными инфекциями, передающимися половым путем [7]. Авторы предполагают, что при определенных условиях хроническая генитальная инфекция является одним из механизмов, вызывающих метаплазию переходного эпителия.

Целью исследования было изучить клинико-лабораторные характеристики хронического цистита и их особенности у женщин в зависимости от возраста и наличия лейкоплакии мочевого пузыря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включено 348 женщин с хроническим циститом, проходивших лечение в Дорожной клинической больнице на станции Новосибирск-Главный. Все женщины длительное время наблюдались у уролога, предъявляя жалобы на частые рецидивы заболевания, сопровождающиеся нарушениями мочеиспускания, преимущественно симптомов накопления, болями в проекции мочевого пузыря, по ходу уретры, появлением мутной мочи, примеси крови в моче. Все пациентки были ознакомлены с целью работы и дали информированное согласие на включение в исследование, которое соответствовало требованиям Хельсинкской декларации и Приказам Минздрава РФ. Возраст вошедших в группу исследования составлял от 19 до 83 лет. Женщин распределили на три возрастные группы: группа 1 – от 20 до 39 лет ($n = 144$), группа 2 – от 40 до 59 лет ($n = 118$), группа 3 – пожилой возраст, от 60 лет и старше ($n = 86$).

Проводили бактериологическое исследование мочи культуральным методом с использо-

ванием хромогенной среды – агара «Uriselect». Длительность инкубации составляла 48 часов. Определяли уровни суточной экскреции с мочой мочево́й кислоты, оксалатов, фосфатов и кальция. Для определения суточной экскреции уратов использовали уриказный тест с хромогенами, колориметрию. Оксалаты исследовали титрометрическим методом. Для определения суточной экскреции фосфатов проводили реакцию с молибдатом аммония без восстановления и депротеинизации, кальция – реакцию с Арсеназо III. Определяли также содержание эритроцитов и лейкоцитов в моче, удельный вес и pH мочи. Проводили общий анализ крови с использованием гематологического анализатора «Sysmex 4000i» (Sysmex Corporation, Япония), скорость оседания эритроцитов определяли по Вестергрену на аппарате Панченкова. Концентрацию креатинина, мочевины в крови определяли на биохимическом анализаторе «Konelab 60 prime» (Thermo Fisher Scientific, США). Оценивали функциональные характеристики почек, скорость клубочковой фильтрации рассчитывали по двум формулам: MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) и Кокрофта – Голта (Cockcroft – Gault). Всем пациентам проводили цистоскопию с использованием цистоскопа и видеосистемы «TELE PACK» (Karl Storz SE & Co. KG, Германия); оценивали наличие трех характеристик измененной слизистой оболочки мочевого пузыря: гиперемия, отек, метаплазия (лейкоплакия).

Учитывали частоту обострений цистита в возрастных группах по градации до двух и более двух обострений в год. Оценивали выраженность и интенсивность выраженности болевого синдрома и нарушений мочеиспускания по результатам анкетирования. Использовали «Шкалу симптомов тазовой боли, императивного учащенного мочеиспускания», PUFSS (Pelvic pain and urgency/frequency patient symptom scale). Легкую степень выраженности симптоматики диагностировали при сумме баллов менее 15, среднюю – от 15 до 19 баллов, тяжелую – более 19 баллов. Оценивали дневники мочеиспускания, в которых пациентки регистрировали частоту мочеиспусканий в дневные и ночные часы, объем порций мочи, частоту императивных позывов и эпизодов ургентного недержания мочи. Женщины заполняли дневник мочеиспускания в течение трех суток.

Поскольку распределение всех количественных признаков отличалось от нормального, их описывали в виде медианы с указанием верхнего и нижнего квартилей (Me [Q_L; Q_H]). Качественные признаки представлены в абсолютных числах (n) и процентах (%). Для сравнительного анализа количественных переменных в группах

с наличием и отсутствием лейкоплакии был применен U-критерий Манна – Уитни, качественных переменных – двусторонний вариант точного критерия Фишера. Множественные сравнения возрастных групп по количественным признакам выполняли с использованием непараметрического варианта критерия Ньюмена – Кейлса, по качественным – с помощью двустороннего варианта точного критерия Фишера с поправкой Бонферрони. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали значение ошибки первого рода (p), уровень статистической значимости принимали равным 0,05 (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Патогенная флора по результатам посевов обнаружена у 35,3 % пациенток всей выборки. Значимая бактериурия (>10³ КОЕ/мл) выявлена в младшей возрастной группе у 41 %, в средней группе – у 30 %, в старшей группе – у 35 % женщин, при этом достоверных различий между группами не было. Наиболее часто встречалась *Escherichia coli* (62,8 %), что согласуется с литературными данными [8]. Обратило на себя внимание отсутствие значимых различий в солевом составе мочи пациенток разных возрастных групп (табл. 1). Это коснулось всех трех видов измеряемых параметров – суточного количества оксалатов, уратов и фосфатов. По содержанию лейкоцитов в крови группы также не различались. Скорость оседания эритроцитов оказалась достоверно выше в старшей возрастной группе, составив 20 мм/ч (1-я и 2-я группы – по 13,0 мм/ч, p < 0,0001).

Сравнение скорости клубочковой фильтрации по двум использованным при расчете формулам (MDRD и Кокрофта – Голта) дало схожие результаты. Отмечено достоверное уменьшение величины показателя с возрастом (см. табл. 1), что указывает на снижение функции почек, при этом в старшей возрастной группе встречались пациентки со скоростью клубочковой фильтрации ниже границы нормы (60 мл/мин).

При оценке результатов эндоскопического исследования (цистоскопии) выявлены следующие особенности слизистой оболочки: гиперемия, отек, наличие метаплазии эпителия (табл. 2). Гиперемия и отек слизистой оболочки мочевого пузыря у пациенток были выражены в разной степени. Лейкоплакия (плоскоклеточная метаплазия эпителия с разной степенью ороговения) встречалась в виде очагов белого рыхлого налета. Внешне метаплазия с ороговением и без него не различалась, одинаковыми были и клинические проявления заболевания. Гиперемия слизистой оболочки оказалась самым распространенным

Таблица 1

Показатели мочи и функциональная характеристика почек пациенток с хроническим циститом разных возрастных групп, Me [Q_L; Q_H]

Показатель	Группа 1, 20–39 лет, n = 128	Группа 2, 40–59 лет, n = 108	Группа 3, 60 лет и старше, n = 79	p		
				1–2	1–3	2–3
Суточная экскреция оксалатов, мг/сутки	26,4 [20,5; 33,2]	30,2 [20,6; 42,7]	28,38 [14,81; 42,68]	0,3471	1,0000	0,7000
Суточная экскреция уратов, ммоль/сутки	2,34 [1,96; 3,30]	2,48 [1,80; 3,67]	2,4 [1,8; 3,4]	1,0000	1,0000	1,0000
Суточная экскреция фосфатов, ммоль/сутки	19,4 [14,3; 24,6]	19,5 [14,1; 23,5]	16,72 [13,68; 20,20]	1,0000	0,0556	0,0644
Эритроцитов в поле зрения в общем анализе мочи	1,00 [0,00; 3,50]	1,00 [0,00; 3,00]	1,00 [0,0; 5,0]	1,0000	1,0000	1,0000
Лейкоцитов в поле зрения в общем анализе мочи	5,00 [3,00; 8,00]	4,00 [2,00; 9,00]	5,00 [3,0; 12,0]	1,0000	0,1058	0,2252
pH мочи в общем анализе	6,00 [6,00; 6,00]	6,00 [6,00; 6,00]	6,00 [6,00; 6,00]	1,0000	1,0000	1,0000
Удельный вес мочи в общем анализе, г/л	1015 [1010; 1020]	1014 [1010; 1018]	1012 [1010; 1015]	1,0000	0,1239	0,3344
Скорость клубочковой фильтрации по формуле MDRD, мл/(мин × 1,73 м ²)	92,0 [80,0; 112,0]	78,0 [70,5; 91,0]	64,0 [42,0; 74,0]	0,3471	1,0000	0,7000
Скорость клубочковой фильтрации по формуле Кокрофта – Голта, мл/(мин × 1,73 м ²)	96,0 [87,0; 113,0]	85,5 [74,0; 103,0]	56,0 [41,0; 64,0]	1,0000	1,0000	1,0000

Таблица 2

Частота встречаемости нарушений слизистой оболочки мочевого пузыря у пациенток с хроническим циститом разных возрастных групп по данным цистоскопии, n [%]

Показатель	Группа 1, 20–39 лет, n = 137	Группа 2, 40–59 лет, n = 115	Группа 3, 60 лет и старше, n = 82	p		
				1–2	1–3	2–3
Гиперемия слизистой оболочки мочевого пузыря	131 [97 %]	112 [98 %]	81 [99 %]	1,0000	1,0000	1,0000
Отек слизистой оболочки мочевого пузыря	67 [51 %]	68 [60 %]	61 [74 %]	0,5466	0,0021	0,0936
Метаплазия (лейкоплакия)	99 [71 %]	58 [50 %]	9 [11 %]	0,0021	<0,0001	<0,0001

нарушением, однако значимых различий между группами по частоте ее встречаемости не выявлено. Отек слизистой оболочки, который локализовался преимущественно в области треугольника Льево и шейки мочевого пузыря, обнаруживался чаще в средней и старшей возрастных группах пациенток; по встречаемости метаплазии эпителия выявлена обратная зависимость (см. табл. 2). Частые обострения (3 раза в год и более) были более характерны для женщин молодого и среднего возраста, среди которых они наблюдались в 69 и 59 % случаев соответственно, в то время как в старшей группе – лишь в 25 % случаев.

Результаты анкетирования по «Шкале симптомов тазовой боли, императивного учащенно-

го мочеиспускания» PUFSS выявили нарастание тяжести симптоматики с возрастом: в младшей, средней и старшей группах средний балл составил 10, 13 и 17 соответственно. По данным оценки дневников мочеиспускания обнаружено уменьшение эффективного объема мочевого пузыря с возрастом, нарастание частоты мочеиспусканий в дневные и ночные часы. Выраженность симптоматики нарушений мочеиспускания во всех возрастных группах оказалась больше при наличии лейкоплакии (табл. 3). Данная тенденция прослеживалась и в частоте дневных мочеиспусканий. Среднеэффективный объем мочевого пузыря во всех возрастных группах был ниже у пациенток с лейкоплакией.

Таблица 3

Показатели клинической характеристики пациентов с хроническим циститом разных возрастных групп при наличии или отсутствии лейкоплакии мочевого пузыря

Показатель	Группа 1, 20–39 лет, n = 137		Группа 2, 40–59 лет, n = 115		Группа 3, 60 лет и старше, n = 82		p		
	n	Me [Q _L ; Q _H]	n	Me [Q _L ; Q _H]	n	Me [Q _L ; Q _H]	1–2	1–3	2–3
Шкала симптомов тазовой боли и императивного учащенного мочеиспускания	Нет	7 [5; 10]	57	10 [9; 13]	73	17 [15; 19]	0,0090	0,0000	0,0000
	Есть	12 [8; 15]	58	17 [14; 18]	9	22 [18; 24]	0,0000	0,0001	0,4102
Количество мочеиспусканий за сутки	Нет	7 [6; 8]	57	7 [7; 9]	73	10 [9; 12]	0,4192	0,0000	0,0000
	Есть	8 [7; 10]	58	9 [8; 11]	9	13 [11; 14]	0,0003	0,0007	0,2229
Количество ночных мочеиспусканий	Нет	0 [0; 1]	57	1 [0; 1]	73	2 [1; 2]	0,0962	0,0000	0,0000
	Есть	0 [0; 1]	58	1 [1; 2]	9	2 [1; 3]	0,0000	0,0019	1,0000
Средний эффективный объем мочеиспусканий	Нет	245 [210; 300]	57	220 [190; 263]	73	165 [140; 180]	0,9337	0,0000	0,0000
	Есть	210 [170; 234]	58	174 [160; 193]	9	150 [120; 160]	0,0010	0,0008	0,1742

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что инфекция не является единственной причиной, влияющей на развитие и поддержание хронического воспалительного процесса мочевого пузыря. Следует отметить, что в обследованной нами выборке женщин с хроническим циститом инфекционный агент выявлялся в 1,8 раза реже, чем, по данным литературы, при неосложненных циститах (64,7 %) [8]. Подобные различия могут быть связаны с климатоэкологическими условиями проживания обследованных, их социально-экономическим статусом, сезоном года и т.д. При бактериологическом исследовании в моче преимущественно выявлена *E. coli* (62,8 %), что близко к данным других авторов, которые указывают, что *E. coli* при инфекции мочевых путей встречается в 80 % случаев [3]. Отсутствие 100-процентной встречаемости инфекций при хроническом цистите, возможно, связано с тем, что воспалительный процесс поддерживают и другие факторы, в том числе и возраст-зависимые, приводящие к нарушению иммунного реагирования, а инфекционный этиологический фактор играет роль не на всех этапах заболевания.

Полученные нами результаты и их трактовка согласуются с мнением других авторов [14], указывающих, что превалирующая патогенетическая роль инфекционного фактора, первично индуцирующего воспалительную уротелиальную реакцию, со временем может отойти на второй план, когда хронический воспалительный процесс в уротелии будет протекать и рецидивировать уже по асептическому пути, в основе которого лежат каскадные патофизиологические реакции, запущенные инфекцией при первичном проникновении.

Учитывая возрастные изменения метаболизма у женщин, можно было предположить возможные колебания в составе солей, экскретируемых с мочой за сутки, однако различий между возрастными группами найдено не было. В общем анализе крови различия найдены только по СОЭ, которая оказалась несколько выше в старшей возрастной группе, что может свидетельствовать о большей системной реакции на воспалительный процесс у женщин группы 3. С возрастом у обследованных также наблюдалось падение функциональной способности почек.

Особое внимание обращает на себя уменьшение частоты выявления лейкоплакии мочевого пузыря и плоскоклеточной метаплазии эпителия в старших возрастных группах. Так, встречаемость метаплазии в группах 1, 2 и 3 составила 71, 50 и 11 % соответственно (см. табл. 2), т.е. развитие метаплазии уротелия на фоне хронического цистита более характерно для женщин молодого,

в меньшей степени – для женщин среднего и относительно редко встречается у женщин старшего возраста. Учитывая, что частота обострений цистита также падала при увеличении возраста, обосновано считать лейкоплакию и плоскоклеточную метаплазию признаками более тяжелого течения заболевания, а снижение встречаемости метаплазии с возрастом – тенденцией к уменьшению активности воспалительного процесса. На это же указывают и результаты исследования, свидетельствующие о большей выраженности симптоматики нарушений мочеиспускания у пациенток с лейкоплакией в разных возрастных группах (см. табл. 3). Связь между лейкоплакией и выраженностью симптоматики описывается также и в литературных источниках [1].

Несмотря на выраженное снижение частоты лейкоплакии у женщин старшей группы, такие показатели, как средний балл по шкале PUFSS, средний эффективный объем мочеиспускания и частота мочеиспускания в дневные и ночные часы, убедительно доказывают нарастание тяжести симптоматики с возрастом у женщин с хроническим циститом. Можно предполагать, что причинами этого являются метаболические системные нарушения, развивающиеся и усиливающиеся после менопаузы и способствующие ухудшению анатомо-функционального состояния мочевого пузыря [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Факторы, вызывающие развитие и прогрессирование устойчивых форм хронического цистита, не могут быть приведены к одной общей, объединяющей причине. Отводить инфекции роль единственной причины рецидивирующего, устойчивого к терапии хронического цистита не оправдано. Возраст, играя важную роль в развитии нарушений мочеиспускания, может рассматриваться как фактор, повышающий вероятность развития хронического цистита, но, в то же время, он снижает частоту формирования лейкоплакии мочевого пузыря, а также частоту обострений. Обнаруженная нами тенденция к высокой встречаемости метаплазии и частоты обострений цистита у женщин молодого возраста может быть связана у них с кататоксическим, высокореактивным типом реагирования переходного эпителия мочевого пузыря. Формирование при этом лейкоплакии является реакцией, приводящей к усилению симптоматики и к учащению обострений цистита.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аль-Шукри С.Х., Кузьмин И.В., Слесаревская М.Н., Соколов А.В., Игнашов Ю.А. Расстройства мочеиспускания у больных с синдромом хронической тазовой боли и лейкоплакией мочевого пузыря // Урол. ведомости. 2016. 6. (2). 5–10.
2. Аляев Ю.Г., Григорян В.А., Гаджиева З.К. Расстройства мочеиспускания. М.: Литерра, 2006. 208 с.
3. Болезни мочевого пузыря / ред. Е.В. Кульчавеня, В.А. Краснов. Новосибирск: Наука, 2012. 187 с.
4. Зайцев А.В., Касян Г.Р., Сивак Л.Г. Цистит // Урология. 2016. (3). 18–26.
5. Зайцев Н.В., Гузуцидзе Е.Н. Особенности диагностики и лечения больных хроническим циститом в урологическом стационаре // Доктор.Ру. 2007. (6). 5–9.
6. Мартыненко Г.М., Соколов Д.А. Этиопатогенетические факторы возникновения цистита у женщин // Прикл. инф. аспекты медицины. 2016. 19. (3). 151–155.
7. Неймарк А.И., Ильинская Е.В., Таранина Т.С. Клинико-лабораторные особенности цистита у женщин с лейкоплакией мочевого пузыря // Сиб. мед. журн. 2007. (3). 51–54.
8. Перепанова Т.С., Синякова Л.А., Зайцев А.В., Козлов Р.С., Шевелев А.Н., Gualco L., Schito G., Naber K.G. Российские результаты международного эпидемиологического исследования клинических аспектов и резистентности к антимикробным препаратам возбудителей цистита у женщин (ARESC): Значение для эмпирической терапии // Урология. 2011. (2). 30–36.
9. Стрельцова О.С., Крутин В.Н. Хронический цистит: новое в диагностике и лечении // Лечащий врач. 2008. (7). 12–18.
10. Суфияров А.Д. Менопаузальный цистит. Цисталгия. (Клинические лекции. Практические рекомендации). Казань: Медок, 2007. 128 с.
11. Тюзиков И.А., Гусакова Д.А., Калинин С.Ю. Особенности метаболического статуса и его влияние на частоту рецидивов хронического цистита у женщин (пилотное исследование) // Эффектив. фармакотерапия. 2018. (2). 10–15.
12. Parsons C.L. The role of a leaky epithelium and potassium in the generation of bladder symptoms in interstitial cystitis/overactive bladder, urethral syndrome, prostatitis and gynaecological chronic pelvic pain // BJU Int. 2011. 107. (3). 370–375.
13. Parsons C.L., Zupkas P., Parsons J.K. Intravesical potassium sensitivity in patients with interstitial cystitis and urethral syndrome // Urology. 2001. 57. (3). 428–432.
14. Speer L.M., Mushkbar S., Erbele T. Chronic pelvic pain in women // Am. Fam. Physician. 2016. 93. (5). 380–387.

CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF CHRONIC CYSTITIS IN WOMEN OF DIFFERENT AGE GROUPS

**Konstantin Gennadyevich NOTOV^{1,2,3}, Elena Gennadyevna NOVIKOVA¹,
Igor Viktorovich FEOFILOV², Andrey Anatolyevich ERKOVICH^{2,3},
Fedor Anatolyevich SEVRYUKOV⁴, Larisa Petrovna PLUTALOVA³,
Igor Mikhaylovich MITROFANOV^{1,2}, Vera Georgievna SELYATITSKAYA¹**

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

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

³ *Railway Clinical Hospital at Novosibirsk Main Railway Station
630001, Novosibirsk, Vladimirovsky ramp, 2A*

⁴ *Railway Clinical Hospital at Nizhny Novgorod Railway Station
603140, Nizhny Novgorod, Lenin av., 18*

The study included 348 women with chronic cystitis who were divided into 3 age groups: Group 1 – 20 to 39 years old; Group 2 – 40 to 59 years old; Group 3 – elderly age (60 years and older). Bacterial flora was detected for the total sample in 35.3 % of patients without significant differences between age groups. The results indicate that infection is not the only cause affecting the development and persistence of chronic inflammation of the bladder. The incidences of leukoplakia of the bladder in age groups 1, 2 and 3 were 71 %, 50 % and 11 %, respectively. The survey results revealed increasing severity of symptoms such as pelvic pain and urination disorders with age. The evaluation of urination diaries revealed a decrease in the bladder effective volume with age and an increase in urination frequency in the daytime and at night. A significant increase in symptoms in the presence of leukoplakia was also revealed. High incidence of squamous metaplasia and leukoplakia and increased frequency of exacerbations of cystitis in young women may be associated with the catatoxic, highly reactive type of response of the transitional epithelium of the bladder. Increasing symptoms such as urinary disorders in older women with chronic cystitis may be caused by an adverse effect of systemic metabolic factors of the disease pathogenesis.

Key words: women, age, chronic cystitis, clinical and laboratory characteristics, bladder leukoplakia.

*Notov K.G. – candidate of medical sciences, head of urology center, assistant of department of urology,
e-mail: Notov@inbox.ru*

Novikova E.G. – candidate of medical sciences, senior researcher, chief physician, e-mail: rmdc.nsk@gmail.com

Feofilov I.V. – doctor of medical sciences, head of department of urology, e-mail: fil_urolog@mail.ru

*Erkovich A.A. – doctor of medical sciences, professor of department of urology, urologist of urology center,
e-mail: erkovich31@mail.ru*

*Sevryukov F.A. – doctor of medical sciences, chief freelance urologist of the central directorate of health,
head of the department of urology, e-mail: fedor_sevryukov@mail.ru*

Plutalova L.P. – deputy medical director, e-mail: plutalova.lp@med54.ru

*Mitrofanov I.M. – doctor of medical sciences, professor of department of propedeutics of children diseases,
leading researcher of laboratory for somatic diseases pathogenesis, e-mail: mim07@mail.ru*

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

ПОИСК НОВЫХ микроРНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Евгений Вячеславович СТУПАК¹, Сергей Евгеньевич ТИТОВ^{2,3},
Юлия Андреевна ВЕРЯСКИНА², Лариса Григорьевна АХМЕРОВА²,
Вячеслав Владимирович СТУПАК¹, Самуил Семенович РАБИНОВИЧ¹,
Дмитрий Андреевич ДОЛЖЕНКО¹, Игорь Федорович ЖИМУЛЁВ²

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

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8/2

³ АО «Вектор-Бест»
630117, г. Новосибирск, ул. Арбузова, 1/1

Цель исследования – поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности. **Материал и методы.** Операционный материал – опухолевые и внешне неизменные ткани головного мозга – получены от 43 пациентов с глиомами разной степени анаплазии. У шести оперированных с глиомами головного мозга для определения уровня экспрессии 800 микроРНК использовалась высокопропускная платформа NanoString. У 37 больных с аналогичной патологией выявляли микроРНК-128, 143, 144, 182, 183, 199b, 204, 7, 99a с помощью ПЦР в реальном времени. **Результаты и их обсуждение.** С помощью технологии NanoString установлено, что уровень экспрессии микроРНК-199b при глиомах III и IV степени статистически значимо выше, чем при глиомах II степени, в то время как уровень экспрессии микроРНК-144 и микроРНК-182 – ниже. Также выявлено достоверное 10-кратное увеличение экспрессии микроРНК-7 при опухолях IV степени по сравнению с опухолями II степени. Полученные четкие различия показателей экспрессии этих четырех микроРНК в данных типах глиом могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (III, IV степени) от медленно растущих опухолей (II степени) и своевременно назначить адекватное комплексное лечение.

Ключевые слова: глиомы головного мозга, микроРНК, глиомы различной степени злокачественности, экспрессия микроРНК, технология NanoString, ПЦР.

Глиомы мозга являются наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга человека, на них приходится примерно 60 % всех опухолей центральной нервной системы у взрослых и детей [1, 2]. Полное удаление злокачественных глиом хирургическим путем невозможно, во-первых, в связи с тем, что опухоль часто располагается глубинно, в функционально

значимых зонах головного мозга, манипуляция на которых может привести к грубому неврологическому дефициту. Во-вторых, они обладают высокой степенью инвазии в здоровую мозговую ткань. Несмотря на разработанный комплексный подход в лечении данного вида новообразований, включающий современные высокотехнологические методы хирургии, лучевую и химиотерапию,

Ступак Е.В. – младший научный сотрудник отделения нейрохирургии, e-mail: stupakphoto@mail.ru

Титов С.Е. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, e-mail: titovse78@gmail.com

Веряскина Ю.А. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, e-mail: ft-31@mail.ru

Ахмерова Л.Г. – к.б.н., ученый секретарь, e-mail: ahmerova@mcb.nsc.ru

Ступак В.В. – д.м.н., проф., начальник отделения нейрохирургии, e-mail: VStupak@niito.ru

Рабинович С.С. – д.м.н., проф., преподаватель учебного отдела

Долженко Д.А. – д.м.н., проф., e-mail: hospital@hospital.e4u.ru

Жимулёв И.Ф. – д.б.н., академик РАН, зав. отделом структуры и функции хромосом, зав. лабораторией молекулярной цитогенетики, e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

они по-прежнему характеризуются низкими показателями 5-летнего выживания [16].

В настоящее время актуальной проблемой является не только улучшение результатов лечения пациентов со злокачественными глиомами, но и возможность прогнозирования течения заболевания. Для этого необходима более надежная и достоверная оценка степени злокачественности опухоли, которая влияет на выбор оптимальной тактики комплексного лечения больных. Несколько лет назад гистологический диагноз для большинства опухолей был основным фактором, определяющим долгосрочный прогноз. Однако при установлении гистологического диагноза и определении степени злокачественности нейроэктодермальных опухолей часто возникают ошибки, достигающие даже в ведущих клиниках от 38 до 64 % [19]. Поэтому в настоящее время молекулярно-генетические характеристики опухолей занимают важное место в их классификации, поскольку гораздо лучше коррелируют с прогнозом, чем существующая гистологическая характеристика глиом. Об этом свидетельствует опубликованная новая гистологическая классификация ВОЗ опухолей центральной нервной системы, принятая в 2016 г. [14]. Предлагаемые поправки касаются, прежде всего, нейроэктодермальных опухолей. Новая классификация основана не только на гистологической структуре опухоли, но и на обязательном исследовании ее наиболее значимых молекулярно-генетических характеристик. Конечно, по мере накопления новых данных о биологии и генетическом профиле новообразований центральной нервной системы, имеющих доказанное влияние на прогноз заболевания, классификация будет обязательно пополняться и совершенствоваться. Одним из направлений в ее совершенствовании и, соответственно, в оптимизации комбинированного лечения больных со злокачественными глиомами головного мозга, как нам представляется, является изучение роли микроРНК.

МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК (20–22 нуклеотида), которые контролируют экспрессию генов, кодирующих белки, и играют важную роль в таких биологических процессах, как клеточная пролиферация, дифференцировка и апоптоз [4, 21]. Последние исследования показали, что микроРНК не только ассоциированы с различными типами опухолей, но могут сами выступать в роли онкогенов и супрессоров и таким образом представляют собой диагностические маркеры и мишени потенциального воздействия на опухолевые процессы. Работы по этому направлению интенсивно раз-

виваются. Появляется все больше исследований, связанных со сравнительным анализом экспрессии микроРНК в тканях глиом головного мозга. Уже выявлен ряд микроРНК, которые рекомендуют как в качестве диагностических маркеров глиом головного мозга вообще, так и для определения степени злокачественности данных новообразований.

Известно, что глиомы разной степени злокачественности различаются уровнем экспрессии микроРНК. Так, глиомы высокой степени злокачественности (III и IV) по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями головного мозга имеют пониженную экспрессию онкосупрессорных микроРНК-31, 137, 153, 181 и 124 и повышенную экспрессию онкогенных микроРНК-21, 23а и 221/222 [3, 7, 8, 23, 24], при этом наиболее высокий уровень отмечен в глиобластомах [3, 8]. Глиомы низкой степени злокачественности (I и II) характеризуются уменьшением экспрессии онкосупрессорных микроРНК-137, 153 и 181 по сравнению с паратуморозной тканью [8, 24]. Для онкогенных микроРНК-21, 221/222 в глиомах низкой степени злокачественности прослеживается корреляция между уровнем экспрессии и степенью злокачественности [3, 8].

В настоящий момент накоплен большой научный опыт по определению уровня экспрессии микроРНК в глиомах головного мозга человека с применением различных методов. Но существуют серьезные препятствия, ограничивающие использование в клинической диагностике предлагаемых подходов на основе использования микроРНК. Они, во-первых, связаны с тем, что работы выполнялись на малых группах больных с различной гистоструктурой новообразований. Во-вторых, необходимо учитывать, что глиомы головного мозга являются гетерогенной группой. Это осложняет интерпретацию данных и выбор микроРНК, которые могли бы выступать в качестве маркеров для диагностики глиом. В связи с этим важной задачей является стандартизация методов определения уровня экспрессии микроРНК и подбора оптимальных референсных генов. Поэтому изучение роли микроРНК в процессах онкогенеза головного мозга человека и выявление спектра ключевых микроРНК, являющихся потенциальными маркерами злокачественных новообразований для диагностических и прогностических целей, представляет большой интерес.

Цель исследования – поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинический материал. Операционный материал – по два биоптата объемом 1 мм³ каждый – опухолевой и прилежащей к ней морфологически неизменной ткани головного мозга, забранный на расстоянии более 2 см от новообразования в функционально незначимой зоне, был получен от 43 первично оперированных пациентов с нейроэпителиальными типами опухолей супратенториальной локализации разной степени злокачественности. Пациенты распределились в группы в зависимости от гистологического диагноза по степени злокачественности опухоли: глиомы II степени – 12, глиомы III степени – 14 и глиомы IV степени – 11 человек. У шести пациентов для определения уровня экспрессии 800 микроРНК использовалась высокопропускная платформа NanoString. Для валидации полученных результатов методом ПЦР у 37 больных с аналогичной патологией забор биоптатов проведен в таком же объеме. Операционный материал получен в соответствии с законодательством РФ, работа одобрена этическим комитетом Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии. От каждого больного получено информированное согласие на участие в исследовании, все данные деперсонализированы.

Выделение суммарной РНК. Биоптат помещали в пробирку и добавляли 600 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3%-й саркозил, 3%-й дитиотреитол), расфасованного в бескислородной атмосфере (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Пробирки помещали в термошейкер на 10 мин при 65 °С, затем центрифугировали 2 мин при 10000 g, переносили супернатант в новые пробирки и добавляли к нему равный объем изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугировали 10 мин при 12 000 g, супернатант сливали, осадок промывали: 500 мкл 70%-го этанола, затем 300 мкл ацетона. РНК растворяли в 200 мкл деионизированной воды.

Детекция микроРНК с помощью технологии NanoString. Экспрессию 800 микроРНК определяли с помощью набора nCounter Human v2 miRNA Expression Assay (NanoString Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа брали 100 нг тотальной РНК, гибридизацию проводили 20 ч при 65 °С. После гибридизации образцы помещали в автоматическую станцию nCounter Prep Station для очистки и связывания репортерных зондов, затем каждый образец сканировали в 550 полях зрения в nCounter Digital Analyzer. Данные проанализированы с помощью программного обеспечения nSolver v2 (NanoString Technologies). Результаты нормировали на 100 наиболее представленных микроРНК.

Детекция микроРНК и малой РНК U58 с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ). Зрелые микроРНК и малую РНК U58 выявляли с помощью метода, включающего в себя обратную транскрипцию зрелой микроРНК с помощью длинного праймера со шпилькой, с последующей детекцией полученной кДНК с использованием ПЦР-РВ [5]. Для каждой микроРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Для каждого образца реакции обратной транскрипции и ПЦР проводили в одном повторе. Обратную транскрипцию выполняли с использованием лиофилизированной смеси «Мастер-микс ОТ» (АО «Вектор-Бест»). Реакцию проводили в течение 15 мин при 16 °С, 15 мин при 42 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали 2 мин при 95 °С и отбирали 3 мкл полученной смеси для ПЦР-РВ, которую выполняли на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием лиофилизированной смеси «Мастер-микс ПЦР» (АО «Вектор-Бест»). Протокол ПЦР: предварительный прогрев при 94 °С – 2 мин, 50 основных циклов: денатурация при 94 °С – 10 с, отжиг и элонгация: 60 °С – 20 с.

Статистическая обработка. Значимость различий между экспрессией микроРНК в образцах глиом различной степени злокачественности определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Для оценки значимости выявленных различий проводилась дополнительная статистическая обработка методом построения ROC-кривой с вычислением площади под кривой (AUC).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для поиска микроРНК-кандидатов, которые можно было бы использовать для дифференциальной диагностики глиом в зависимости от степени их злокачественности, мы использовали высокопропускную платформу NanoString, которая позволяет одновременно оценить экспрессию 800 микроРНК в 12 образцах [15]. Для анализа были взяты шесть парных образцов объемом 1 мм³ каждый (ткань глиомы и ткань внешне неизмененного головного мозга на расстоянии не менее 2 см от опухоли в функционально незначимой зоне). Согласно классификации ВОЗ от 2007 г. [18], к глиоме I, II, III и IV степени относились соответственно 1, 2, 2 и 1 образец. Для 261 микроРНК была показана достоверная экспрессия (выше, чем в отрицательных контролях) в тех или иных пробах. Мы отобрали 68 микроРНК, для которых отношение в паре опухоль/норма по модулю было больше пяти. Из них мы убрали

Таблица 1

Нормированное количество копий отобранных микроРНК в глиомах головного мозга

МикроРНК	Первый образец глиомы I степени	Первый образец глиомы II степени	Второй образец глиомы II степени	Первый образец глиомы III степени	Второй образец глиомы III степени	Первый образец глиомы IV степени
143	1,4	124,3	3,4	156,4	314,4	771,3
144	154,5	210,9	160,0	2119,6	97,6	296,1
7	37,9	75,3	85,1	88,6	223,7	158,1
128	148,9	1054,0	684,4	370,0	773,6	719,4
182	25,3	203,1	602,7	80,8	65,4	8,4
183	36,5	144,2	262,2	51,2	54,7	7,5
99a	21403,4	11492,4	12264,3	3727,5	10792,7	2349,1
204	17042,4	274,2	57,9	514,2	498,9	2656,1
199b	39,3	17,0	34,0	22,6	12,3	140,5

низко представленные, с количеством копий в образце меньше 50, и те, которые уже были описаны нами раньше – микроРНК-124, 181b, 21, 221 и 451a [25]. В конечном счете на рассмотрении осталось 9: микроРНК-143, 144, 7, 128, 182, 183, 99a, 204 и 199b.

Поскольку с практической точки зрения использовать прилежащую к опухоли неизмененную ткань проблематично, дальнейшие сравнения проводились на нормированное количество микроРНК в опухолевой ткани. Как следует из приведенных в табл. 1 данных, существуют тенденции в изменении уровня микроРНК в зависимости от степени злокачественности опухоли, но есть и отдельные выпадения. На тех же образцах для сравнения результатов была поставлена ПЦР-РВ на выбранные микроРНК. Напрямую сравнивать NanoString и ПЦР нельзя – в первом случае мы получаем количество копий в образце, во втором – количество копий относительно нормализатора (U58). Однако сравнению подлежит соотношение между количеством микроРНК в глиомах разной степени злокачественности (рис. 1).

Хотя результаты NanoString и ПЦР-РВ совпали не полностью, соотношения между различными степенями злокачественности для разных микроРНК оказались похожи, кроме микроРНК-99a, для которой такого совпадения не было. По этой причине мы исключили из анализа микроРНК-99a, а также микроРНК-204, поскольку по данным и NanoString, и ПЦР-РВ ее экспрессия менялась парадоксальным образом – была повышена в образцах глиомы I и IV степени и снижена в образцах опухоли II и III степени, т.е. увеличена в глиомах наименьшей и наибольшей степени злокачественности и уменьшена в глиомах промежуточных степеней.

Чтобы валидировать полученные результаты, мы взяли расширенную выборку глиом II, III и IV степени – соответственно 12, 14 и 11 образцов. Найти дополнительные опухоли первой степени злокачественности нам не удалось. Относительный уровень экспрессии выбранных микроРНК был определен методом ПЦР-РВ, медианные значения для каждой группы представлены на рис. 2. Сравнение этих данных с показателями, полученными на отдельных образцах с помощью как ПЦР-РВ, так и NanoString, позволяет говорить о том, что результаты по микроРНК-143 имеют схожую тенденцию, по микроРНК-144, 128 и 183 совпали плохо, по микроРНК-7, 182 и 199b совпали хорошо. Таким образом, видно, что результаты, полученные на группе образцов и на отдельных образцах, совпали только примерно для половины микроРНК. Это является одной из главных проблем использования высокопропускных методов для поиска новых маркеров, поскольку их можно применить только для небольшого количества образцов (в силу высокой цены и сложности), и полученные данные не всегда подтверждаются на расширенных выборках.

Чтобы определить, насколько значимы различия в экспрессии отобранных нами микроРНК между разными степенями злокачественности глиом, мы использовали критерий Манна – Уитни (табл. 2) и обнаружили, что разница в экспрессии микроРНК между образцами глиом, относящимся к II и III степени злокачественности, статистически значима для микроРНК-144, 182 и 199b. Для опухолей II и IV степеней статистически значима разница в экспрессии микроРНК-144, 7, 182 и 199b. Для глиом III и IV степеней злокачественности статистически значимой разницы в экспрессии каких-либо микроРНК не обнаружено.

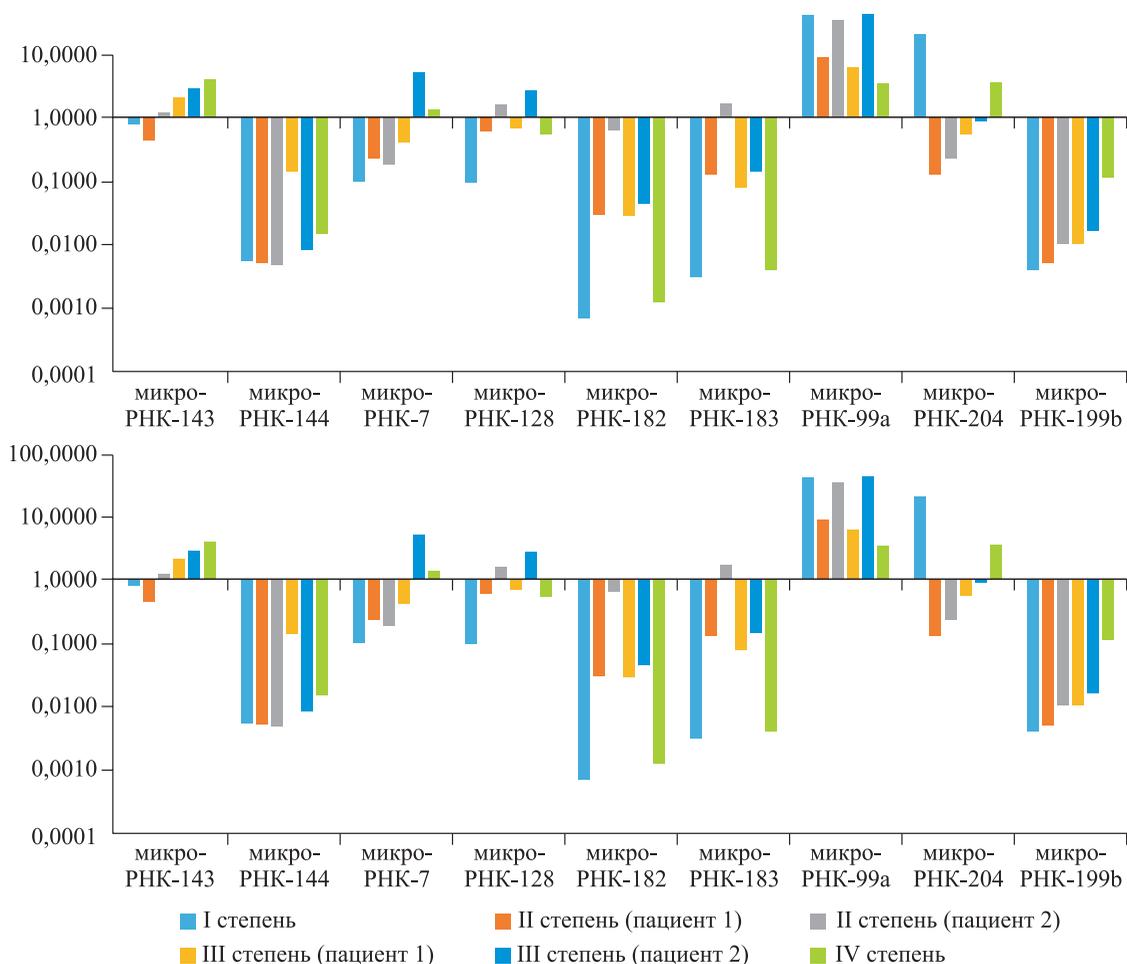


Рис. 1. Соотношение экспрессии выбранных микроРНК в глиомах различной степени злокачественности, измеренной с помощью Nanostring и ОТ-ПЦР. Логарифмическая шкала

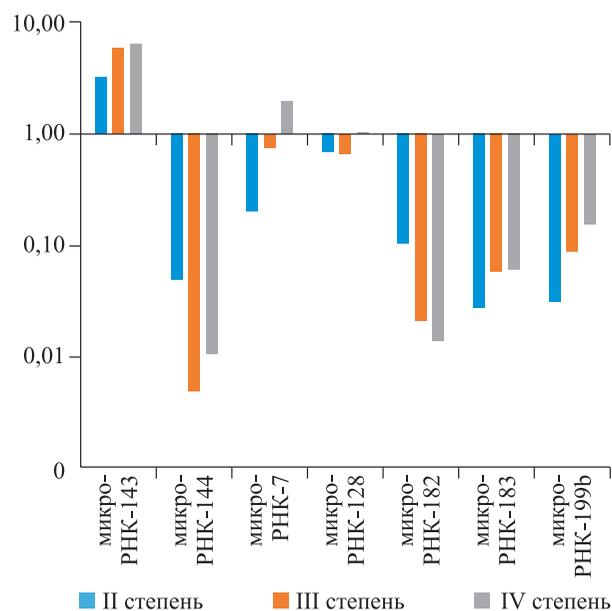


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии микроРНК в образцах глиом разной степени злокачественности. Представлены медианные значения, логарифмическая шкала

Таблица 2

Значимость различий между экспрессией микроРНК в образцах глиом различной степени злокачественности

МикроРНК	Уровень значимости (p)		
	p_1	p_2	p_3
143	0,109008	0,094167	0,598091
144	0,037798	0,012764	0,594033
7	0,059664	0,045456	0,921212
128	0,934973	0,558760	0,324663
182	0,049142	0,029490	0,531046
183	0,431033	0,531668	0,918456
199b	0,007699	0,000252	0,340779

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые различия ($p < 0,05$); обозначена значимость различий между экспрессией соответствующей микроРНК в глиомах II и III степени (p_1), II и IV степени (p_2), III и IV степени (p_3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия микроРНК всегда изменяется в опухолях по сравнению со здоровыми тканями, а также зависит от типа и стадии развития новообразования. Поскольку микроРНК высоко стабильны в биологических тканях, это делает их перспективными диагностическими маркерами. Однако у человека известно уже более 1800 микроРНК, и чтобы определить, какие из них могут оказаться полезными в том или ином приложении, требуется использовать высокопропускные методы, такие как массовое параллельное секвенирование или системы, позволяющие проводить мультиплексное измерение транскрипционной активности сотен генов или микроРНК, таких как NanoString.

Использование последней системы позволило нам выделить 14 микроРНК (из 800), которые отличались достаточным уровнем экспрессии и разной экспрессией в глиомах разных степеней. Поскольку пять из них уже описаны в нашей предыдущей работе (микроРНК-124, 181b, 21, 221 и 451a), в итоге их осталось девять: микроРНК-143, 144, 7, 128, 182, 183, 99a, 204, 199b. Дальнейшая валидация этих микроРНК с помощью ПЦР-РВ, в том числе на расширенной выборке, показала, что не все результаты NanoString подтвердились. Это связано с тем, что высокопропускные методы позволяют определять уровень экспрессии хотя и сразу нескольких сотен микроРНК, но лишь в небольшом количестве образцов (в нашем случае шесть пар «опухоль – норма»), и большее значение приобретает вариация экспрессии микроРНК, связанная с конкретным образцом, а не с группой, к которой он принадлежит. По-видимому, именно это объясняет то, что данные NanoString хорошо совпали с данными ПЦР-РВ на тех же образцах, но только примерно в половине случаев – с результатами ПЦР-РВ на расширенной выборке.

В итоге мы отобрали семь новых микроРНК, которые относятся как к онкосупрессивным – микроРНК-7, 128, 143 и 199b, так и к онкогенным – микроРНК-144-3р, 182 и 183. Однако после валидации на расширенной выборке статистически значимые различия в экспрессии обнаружили только для четырех микроРНК: 144, 7, 182 и 199b. Причем между III и IV степенью таких различий вообще не было, а наблюдались они преимущественно для II и IV степени злокачественности и, в меньшей степени, для II и III.

Онкосупрессорная микроРНК-7 задействована в регуляции PI3K/Akt-зависимого и Ras/Raf/MEK/ERK-зависимого сигнальных путей, контролируя процессы, отвечающие за рост и ма-

лигнизацию опухоли: инвазию, пролиферацию, миграцию, апоптоз. M. Visani et. al. описывают снижение ее экспрессии в глиомах по сравнению с паратуморозной тканью [26]. В нашем исследовании отмечено достоверное повышение экспрессии микроРНК-7 в 10 раз в опухолях IV степени по сравнению с глиомами II степени.

Нейронспецифическая микроРНК-128 участвует в дифференцировке нервной ткани, в глиобластомах она выступает в качестве онкосупрессора [6, 12]. Мишенью микроРНК-128 служит фактор транскрипции E2F3a, снижение ее экспрессии сопровождается угнетением клеточного цикла и пролиферации клеток опухоли [30]. Y. Zhang et al. в своих исследованиях установили, что в глиомах содержание микроРНК-128 меньше, чем в паратуморозной ткани [6, 12]. Мы также зафиксировали небольшое (в среднем в 1,5 раза) снижение экспрессии микроРНК-128 в глиомах II степени по сравнению с опухолями IV степени.

МикроРНК-143 является супрессором, непосредственно регулирует RAS-онкогенный гомолог нейробластомы (N-RAS). При повышении экспрессии микроРНК-143 снижается экспрессия N-RAS, происходит ингибирование передачи сигналов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)/АКТ, а также митоген-активированной протеинкиназы (MAPK)/внеклеточной сигнальной киназы (ERK), уменьшается как накопление p65 в ядрах клеток глиомы, так и их миграция, инвазия, ослабляется рост опухоли и ангиогенез [27]. МикроРНК-143 задействована в деградации микроРНК NUAК2, что также ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиобластомы [11]. По данным T.G. Fu et al., уровень ее экспрессии в злокачественных глиомах меньше, чем в паратуморозной ткани мозга, но одинаков в опухолях с разной степенью анаплазии [11]. Нами получены аналогичные данные, свидетельствующие об отсутствии статистически значимых различий экспрессии микроРНК-143 в глиомах II, III и IV степени, хотя имелся общий тренд к ее повышению от низкой к высокой степени злокачественности (в среднем в 1,9 раза между II и IV степенью).

Установлено, что уровень экспрессии микроРНК-144-3р снижен не только в тканях глиом вообще по сравнению с паратуморозной тканью, но и особенно в глиомах высокой степени анаплазии по отношению к опухолям меньшей степени злокачественности. Кроме того, у пациентов с низким уровнем экспрессии микроРНК-144-3р в глиоме хуже показатели выживаемости [27]. Наши данные свидетельствуют о том, что по экспрессии микроРНК-144-3р глиомы II степени

действительно достоверно отличаются от опухолей III и IV степени, причем в последних двух случаях она снижена в 5–10 раз по сравнению с прилежащей тканью.

МикроРНК-182 участвует в нескольких важных стадиях опухолевого генеза, таких как эпителиально-мезенхимальный переход, пролиферация, инвазия, регуляция клеточного цикла, способность к клеточной миграции *in vitro* и метастазирование, путем регуляции генов *FOXO3*, *BRCA1*, *MTSS1*, *NRN1* и *MITF* [10, 17, 20, 22, 28]. В тканях первичных глиом установлено пятикратное, а в образцах глиобластом – 32-кратное увеличение уровня ее экспрессии по сравнению с паратуморозной тканью [13]. Тем не менее нами обнаружено достоверное снижение экспрессии микроРНК-182 при глиоме II степени по сравнению с опухолями III и IV степени приблизительно в 5 и 7 раз соответственно.

Аналогичные данные получены при изучении уровня экспрессии микроРНК-183, который был выше в опухолевой ткани, чем во внешне неизменной ткани мозга, при этом в глиомах высокой степени злокачественности величина показателя доходила до максимальных значений. Увеличение содержания микроРНК-183 в глиомах, особенно с высокой степенью анаплазии, может индуцировать канцерогенез и прогрессирование опухоли путем воздействия на гены, которые влияют на выживание клеток, пролиферацию, миграцию и инвазию, такие как *PDCD4*, *EGR1/PTEN*, *FOXO1*, *IDH-2/HIF-1 α* , и гены, регулируемые активными формами кислорода, в конечном счете опосредуя степень злокачественности, а также плохой прогноз выживания пациентов [29]. Наши данные совпадают с литературными – уровень экспрессии микроРНК-183 в глиомах имеет тенденцию к повышению по мере увеличения степени их анаплазии (примерно в 2 раза).

МикроРНК-199b является ингибитором белка SET, который, угнетая активность опухолевого супрессора протеинфосфатазы A2, также участвует в приобретенной химиорезистентности при хроническом миелоидном лейкозе или раке яичников. Кроме того, микроРНК-199b функционирует как супрессор опухоли в медуллобластоме, гепатоцеллюлярной карциноме и раке молочной железы, воздействуя на такие мишени, как *HEIS1*, *HIF-1 α* или *HER2* [9]. Впервые (в литературных источниках таких данных нет) нами зафиксировано достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК-199b при глиоме II степени по сравнению с опухолями III и IV степени в 2,8 и 4,8 раза соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью технологии NanoString установлено, что уровень экспрессии микроРНК-199b в тканях глиом высокой степени злокачественности (II и IV) больше, чем в тканях опухолей низкой степени злокачественности (II степень), в то время как уровень экспрессии микроРНК-144 и микроРНК-182 – меньше. Также выявлено достоверное 10-кратное повышение экспрессии микроРНК-7 в опухолях II степени по сравнению с глиомами IV степени. С точки зрения практической нейрохирургии интерес представляют случаи различия между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом. Для их дифференциальной диагностики подошли только четыре микроРНК: для II и III степени – микроРНК-144 (AUC = 0,767), микроРНК-182 (AUC = 0,771) и микроРНК-199b (AUC = 0,852), для II и IV степени – микроРНК-7 (AUC = 0,612). Полученные четкие различия показателей экспрессии этих четырех микроРНК в данных типах глиом могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (III, IV степени) от медленно растущих опухолей (II степени) и своевременно назначить адекватное комплексное лечение.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований № 0310-2018-0007 и № 0310-2018-0010.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зозуля Ю.А., Васильева И.Г., Главацкий А.Я. Глиомы головного мозга. Киев: ЕксОб, 2007. 636 с.
2. Олюшин В.Е., Филатов М.В., Улитин А.Ю., Бажанов С.П. Специфическая противоопухолевая иммунотерапия на основе дендритных клеток в комплексном лечении больных злокачественными церебральными глиомами. СПб.: Знак, 2012. 212 с.
3. Ступак Е.В., Веряскина Ю.А., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Ступак В.В., Мишинов С.В., Копорушко Н.А., Петрова Ю.В., Пустаханов В.В., Иванов М.К., Жимулёв И.Ф., Колесников Н.Н. Значение профиля микроРНК в диагностике злокачественных глиом головного мозга // Рос. нейрохирург. журн. 2016. 8. (2). 54–58.
4. Andorfer C.A., Necela B.M., Thompson E.A., Perez E.A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers

for the diagnosis and treatment of breast cancer // Trends Mol Med. 2011. 17. (6). 313–319.

5. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Liva K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucl. Acids Res. 2005. 20. (33). e179.

6. Ciafre S.A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C.G., Sabatino G., Negrini M., Maira G., Croce C.M., Farace M.G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. 334. 1351–1358.

7. Conaco C., Otto S., Han J.J., Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. 103. (7). 2422–2427.

8. Conti A., Aguenouz M., la Torre D., Tomasello C., Cardali S., Angileri F.F., Maio F., Cama A., Germanò A., Vita G., Tomasello F. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors // J. Neurooncol. 2009. 93. (3). 325–332.

9. Cristóbal I., Caramés C., Rincón R., Manso R., Madoz-Gúrpide J., Torrejón B., González-Alonso P., Rojo F., García-Foncillas J. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer // Oncotarget. 2017. 8. 40169–40180.

10. Feng Y.A., Liu T., Wu Y. MicroRNA 182 inhibits the proliferation and migration of glioma cells through the induction of neuritin expression // Oncol. Lett. 2015. 10. (2). 1197–1203.

11. Fu T.G., Wang L., Li W., Li J.Z., Li J. miR-143 inhibits oncogenic traits by degrading NUA2 in glioblastoma // Int. J. Mol. Med. 2016. 37. (6). 1627–1635.

12. Godlewski J., Nowicki M.O., Bronisz A., Williams S., Otsuki A., Nuovo G., Raychaudhury A., Newton H.B., Chiocca E.A., Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal // Cancer Res. 2008. 68. 9125–9130.

13. Jiang L., Mao P., Song L., Wu J., Huang J., Lin C., Yuan J., Qu L., Cheng S.Y., Li J. miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival // Am. J. Pathol. 2010. 177. (1). 29–38.

14. Krutovskikh V.A., Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers // Bioessays. 2010. 32. (10). 894–904.

15. Kulkarni M.M. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2011. 25. 25B.10.

16. Law M., Young R.J., Babb J.S., Peccerelli N., Chheang S., Gruber M.L., Miller D.C., Golfinos J.G., Zagzag D., Johnson G. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume

measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging // Radiology. 2008. 247. 490–498.

17. Liu Z., Liu J., Segura M.F., Shao C., Lee P., Gong Y., Hernando E., Wei J.J. miR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma // J. Pathol. 2012. 228. (2). 204–215.

18. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system // Acta Neuropathol. 2007. 114. (2). 97–109.

19. Mittler M.A., Walters B.C., Stopa E.G. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies // J. Neurosurg. 1996. 85. (6). 1091–1094.

20. Qu Y., Li W.C., Hellem M.R., Rostad K., Popa M., McCormack E., Oyan A.M., Kalland K.H., Ke X.S. miR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells // Int. J. Cancer. 2013. 133. (3). 544–555.

21. Sasahira T., Kurihara M., Bhawal U.K., Ueda N., Shimomoto T., Yamamoto K., Kirita T., Kuniyasu H. Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer // Br. J. Cancer. 2012. 107. (4). 700–706.

22. Segura M.F., Hanniford D., Menendez S., Reavie L., Zou X., Alvarez-Diaz S., Zakrzewski J., Blochin E., Rose A., Bogunovic D., Polsky D., Wei J., Lee P., Belitskaya-Levy I., Bhardwaj N., Osman I., Hernando E. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. 106. (6). 1814–1819.

23. Shi L., Cheng Z., Zhang J., Li R., Zhao P., Fu Z., You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells // Brain Res. 2008. 1236. 185–193.

24. Silber J., Lim D.A., Petritsch C., Persson A.I., Maunakea A.K., Yu M., Vandenberg S.R., Ginzinger D.G., James C.D., Costello J.F., Bergers G., Weiss W.A., Alvarez-Buylla A., Hodgson J.G. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells // BMC Med. 2008. 6. 14.

25. Stupak E.V., Veryaskina Yu.A., Titov S.E., Achmerova L.G., Stupak V.V., Dolzhenko D.A., Rabinovich S.S., Zhimulev I.F., Kolesnikov N.N. Studying the MicroRNA role as a survival predictor and revealing its part in malignancy level determination in patients with supratentorial gliomas of brain // AIP Conf. Proc. 2017. 1882. 020073.

26. Visani M., de Biase D., Marucci G., Taccioli C., Baruzzi A. Precision Definition of miRNAs expression profile in glioblastoma samples: the relevance of non-neoplastic brain reference // PLoS One. 2013. 8. (1). e55314.

27. Wang L., Shi Z.M., Jiang C.F., Liu X., Chen Q.D., Qian X., Li D.M., Ge X., Wang X.F., Liu L.Z., You Y.P., Liu N., Jiang B.H. MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma // *Oncotarget*. 2014. 5. 5416–5427.
28. Xu X., Lu Z., Qiang W., Vidimar V., Kong B., Kim J.J., Wei J.J. Inactivation of AKT induces cellular senescence in uterine leiomyoma // *Endocrinology*. 2014. 155. (4). 1510–1519.
29. Ye Z., Zhang Z., Wu L., Liu C., Chen Q., Liu J., Wang X., Zhuang Z., Li W., Xu S., Hang C. Upregulation of miR-183 expression and its clinical significance in human brain glioma // *Neurol. Sci*. 2016. 37. (8). 1341–1347.
30. Zhang Y., Chao T., Li R., Liu W., Chen Y., Yan X., Gong Y., Yin B., Liu W., Qiang B., Zhao J., Yuan J., Peng X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2009. 87. (1). 43–51.

SEARCH FOR NEW MICRORNA MARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF DIFFERENT GRADE CEREBRAL GLIOMAS

Evgeniy Vyacheslavovich STUPAK¹, Sergey Evgenievich TITOV^{2,3},
Yuliya Andreevna VERYASKINA², Larisa Grigorievna AKHMEROVA²,
Vyacheslav Vladimirovich STUPAK¹, Samuil Semenovich RABINOVICH¹,
Dmitriy Andreevich DOLZHENKO¹, Igor Fedorovich ZHIMULEV²

¹Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17

²Institute of Molecular and Cell Biology of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 8/2

³Vector-Best
630117, Novosibirsk, Arbuzov str., 1/1

Purpose of the study – searching of new microRNA markers for differential diagnostics of different grade cerebral gliomas. **Material and methods.** Surgical material is tumor and externally unchanged brain tissue that was obtained from 41 patients with gliomas of different grade anaplasia. In 6 patients with cerebral glioma, a high-throughput Nanostring platform was used to determine the level of expression of 800 microRNAs. 37 patients with a similar pathology were subjected to real-time PCR, microRNA-128, 143, 144, 182, 183, 199b, 204, 7, 99a. **Results and discussion:** It has been established with the NanoString technology that the level of expression of miRNA 199b was significantly higher in gliomas of grade III and IV than in gliomas of grade II. In contrast, the expression level of miRNA-144 and miRNA-182 was reduced. There was also a significant 10-fold increase in the level of expression of microRNA-7 in tumors of grade IV in comparison with grade II. These differences in the expression of four microRNAs in these types of gliomas can be additional markers that distinguish rapidly growing malignant gliomas (grade III, IV) from slowly growing tumors (grade II) and timely assign an adequate comprehensive treatment.

Key words: cerebral glioma, microRNA, different grade gliomas, microRNA expression, NanoString technology, PCR.

Stupak E.V. – junior researcher, department of neurosurgery, e-mail: EStupak@niito.ru

Titov S.E. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of molecular genetics, e-mail: titovse78@gmail.com

Veryaskina Yu.A. – candidate of biological sciences, researcher at the laboratory of molecular genetics, e-mail: fl-31@mail.ru

Akhmerova L.G. – candidate of biological sciences, scientific secretary, e-mail: ahmerova@mcb.nsc.ru

Stupak V.V. – doctor of medical sciences, professor, head of department of neurosurgery, e-mail: VStupak@niito.ru

Rabinovich S.S. – doctor of medical sciences, professor, teacher of the training department

Dolzhenko D.A. – doctor of medical sciences, professor, e-mail: hospital@hospital.e4u.ru

Zhimulev I.F. – doctor of medical sciences, academician of RAS, head of the department of structure and function of chromosomes, head of the laboratory of molecular cytogenetics, e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

ЗАДЕРЖКА РОСТА ПЛОДА: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ, ПРОГНОЗ НА БУДУЩЕЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Надежда Сергеевна ДОЛГОВА, Светлана Дмитриевна ЯВОРСКАЯ,
Марина Борисовна ИГИТОВА

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

Задержка роста плода (ЗРП) – одна из ведущих причин перинатальной заболеваемости и смертности. Основным механизмом, лежащим в основе задержки роста плода, является хроническая плацентарная дисфункция в виде нарушения адекватного поступления кислорода и питательных веществ к плоду, что и приводит к нарушению его роста и развития. ЗРП ассоциирована с рядом метаболических, сердечно-сосудистых, неврологических нарушений, респираторных заболеваний в раннем младенчестве и в зрелом возрасте, требует длительного диспансерного наблюдения, проведения корригирующей терапии на протяжении всей последующей жизни. В настоящее время большая интерес представляет изучение молекулярных механизмов формирования ЗРП, ее дородовых и послеродовых осложнений. С развитием молекулярной биологии растет список генетических причин ЗРП. В обзоре мы постарались охватить генетические, метаболические и эндокринные факторы, ответственные за развитие ЗРП. Углубленное изучение основных молекулярных механизмов, формирующих ЗРП, позволит расширить спектр профилактических мероприятий, диагностических возможностей ее раннего выявления и своевременной коррекции, что позволит у данной группы пациентов снизить перинатальную заболеваемость, смертность, риск развития краткосрочных и долгосрочных последствий.

Ключевые слова: задержка роста плода, молекулярные механизмы, сердечно-сосудистые заболевания, неврологические нарушения, новорожденные, метаболический синдром.

Задержка роста плода (ЗРП) – грозное осложнение пренатального периода, при котором плод не может достигнуть генетически детерминированного потенциала массы и размеров по отношению к гестационному сроку согласно этнической и половой принадлежности, уровню социально-экономического развития страны [56]. ЗРП диагностируют при весе плода на уровне или ниже 10-го перцентиля для ожидаемой массы тела при рождении согласно сроку беременности [49]. По данным разных авторов, частота данной патологии колеблется в пределах 5–10 % в общей популяции [37, 62]. Рождаемость маловесных плодов в странах с низким и средним уровнем дохода в шесть раз выше, чем в высокоразвитых странах. Данный показатель, вероятно, еще выше, учитывая тот факт, что больше половины детей рождаются в домашних условиях без учета рождений и только 13 % получают квалифицированную медицинскую помощь в первые сутки после рождения [2]. Среди таких стран лидирующее место занимают страны Азиатского континента, располагаясь в порядке убывания: Бангладеш, Ин-

дия, Пакистан, Шри-Ланка, Вьетнам, Камбоджа, Филиппины, Индонезия и Малайзия, Таиланд и Китайская Народная Республика, второе и третье место – страны африканского и латиноамериканского континентов [56]. В России же частота доношенных новорожденных с ЗРП варьирует в пределах 5–17 %, у недоношенных колеблется в более широких пределах – 15–22 % в общей популяции [3]. На сегодняшний день ЗРП является одной из ведущих причин внутриутробной смерти плода и занимает второе место среди причин смерти новорожденных [5, 31, 50, 58]. Новорожденные с ЗРП ассоциированы с рядом патологических состояний, которые снижают их индекс общего здоровья от рождения и на протяжении всей жизни [42, 56].

Известно, что регуляция роста и развития плода представляет собой сложный механизм слаженного взаимодействия между материнским организмом, плацентой и плодом [34]. На протяжении всех этапов антенатального периода плацента выполняет функцию фундамента для физиологически протекающей беременности, до-

Долгова Н.С. – аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом ДПО, e-mail: dolgovans@yandex.ru

Яворская С.Д. – д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии с курсом ДПО, e-mail: L2001@bk.ru

Игитова М.Б. – д.м.н., проф. кафедры акушерства и гинекологии с курсом ДПО, e-mail: igitova-2ai@mail.ru

ставляя кислород и питательные вещества развивающемуся эмбриону и плоду, а также регулятор роста плода, вырабатывая инсулиноподобный фактор роста и глюкокортикоиды. В свою очередь плод выступает в качестве эндокринного триггера поступления питательных веществ [1]. Наряду с патологическими изменениями в системе «мать – плацента – плод» многие молекулярные процессы вносят весомый вклад в формирование ЗРП и ассоциированных с ним заболеваний [34].

Теломеры, представляющие собой расположенные на концах хромосом нуклеопротеиновые структуры, отвечают за жизнеспособность клетки [11, 12]. Короткие теломеры блокируют клеточный цикл, стимулируют апоптоз и способствуют геномной нестабильности. При достижении критически короткой длины теломеры запускает механизм старения тканей [11]. *Окислительный стресс* является одним из факторов, влияющих на укорочение длины теломер [12]. В условиях плацентарной гипоксии плод с ЗРП, активируя синтез активных форм кислорода, подвергается окислительному стрессу [25]. Этот факт стал интересен для изучения длины теломер в плацентах плодов с ЗРП; обнаружено, что длина теломер в трофобластах плаценты беременных с ЗРП меньше, чем при физиологически протекающей беременности [12, 64]. Нарушение гомеостаза теломер может вносить весомый вклад в патофизиологию ЗРП и ассоциировано с внутриутробным программированием заболеваний во взрослой жизни [12]. Как упоминалось ранее, маточно-плацентарная дисфункция является ключевым аспектом в формировании ЗРП, ключевым фактором внутриматочной гипоксии и окислительного стресса плода [26, 63]. Новорожденные с ЗРП подвержены свободнорадикальному окислительному повреждению, потому что их ферментативные и неферментативные противоокислительные защитные системы нарушены. Для исключения вредного воздействия активных форм кислорода клетки вооружены эффективной защитной системой (антиоксидантной), включающей такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, гемоксигеназа, и низкомолекулярные антиоксиданты (глутатион, металлотioneин) [47]. В исследовании A. Ferencz et al. показано, что в пуповинной крови доношенных новорожденных с ЗРП снижена экспрессия гена гемоксигеназы и повышена экспрессия генов металлотioneина; авторы предполагают, что уровень экспрессии данных генов служит маркером для определения фенотипа ЗРП [25]. Доказано, что окислительный стресс способствует формированию эндотелиальной дисфункции в артериях хориона плода с ЗРП [55]. В пуповинной крови определяется повышенная

концентрация продуктов свободнорадикального окисления, а именно малонового диальдегида и окисленных липопротеинов низкой плотности, связанная с уменьшением веса и размера тела новорожденного [40]. Это можно объяснить вызванным окислительным стрессом нарушением транспорта нейтральных плацентарных аминокислот, что подавляет усвоение необходимых веществ, способствующих адекватному развитию плода [9].

Эндоглин – протеин, играющий важную роль в ангиогенезе, поддержании тонуса сосудов с помощью эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). Механизм действия эндоглина включает ингибирование сигнализации трансформирующего фактора роста (TGF- β) в эндотелиальных клетках, что препятствует активации eNOS и приводит к снижению синтеза NO, представляющего собой важный регулятор доставки кислорода к плоду [25]. Повышенный уровень растворимого эндоглина (sEng) приводит к эндотелиальной дисфункции и развитию ЗРП [57]. В исследованиях I. Szentpeteri et al. определена сверхэкспрессия генов эндоглина в плаценте ЗРП, приводящая к сосудистой дисфункции и хронической гипоксии плода [59]. В проспективном многоцентровом когортном исследовании T. Raia-Barjat et al. сравнивали плазменные уровни ангиогенных факторов sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1, растворимая fms-подобная тирозинкиназа 1) и sEng в сроки 20, 24, 28, 32, 36 недель в качестве предикторов развития преэклампсии и ЗРП у беременных с высоким риском гестационных осложнений [51]. Результаты исследования показали более высокое содержание sFlt-1 и sEng в плазме крови беременных с ЗРП в 28, 32, 36 недель, чем женщин с физиологически протекающей беременностью. Аналогичные результаты наблюдались у беременных с преэклампсией.

Фактор роста плаценты (PIGF, placental growth factor), вырабатываемый плацентой, обладает ангиогенными и провоспалительными свойствами, играет важную роль в ангиогенезе плаценты, в регуляции инвазии трофобласта в материнские спиральные артерии, модулирует активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor), ассоциирован с формированием ЗРП, однако точные механизмы его действия не установлены и требуют дополнительного изучения [23, 32, 38]. Есть данные, что повышенная концентрация sFlt-1 и низкий уровень PIGF в плацентарной ткани ассоциированы с нарушением ангиогенеза, аномальной плацентацией и формированием ЗРП [52, 53]. J.G. Joo et al. проанализировали зависимость между полом плода и экспрессией PIGF в 101 плаценте, полу-

ченной после родов от беременностей, осложнившихся ЗРП, и 140 плацентах при физиологически протекающей беременности. Существенной разницы между содержанием мРНК гена *PIGF* в плацентах при ЗРП и без него не установлено, также как и гендерных различий, однако в тяжелых случаях ЗРП определено значительное снижение экспрессии *PIGF*, указывающее на глубокий дефект ангиогенеза [32]. В исследовании I. Cetin et al. оценивалась эффективность применения теста *PIGF* у беременных с ЗРП. Результаты оценивались по трем категориям содержания *PIGF* в плазме крови: очень низкое (менее 12 пг/мл), низкое (12-100 пг/мл) и нормальное (более 100 пг/мл). Большая часть беременностей, осложненных ЗРП с очень низким уровнем *PIGF*, родоразрешены в сроке до 34 недель, а беременностей с нормальным уровнем *PIGF* – после 37 недель. Авторы утверждают, что плазменные уровни *PIGF* могут прогнозировать неблагоприятные исходы беременностей, которые могут быть вторичными по отношению к плацентарной недостаточности [20].

VEGF-A представляет собой важный регуляторный белок, участвующий в васкулогенезе и ангиогенезе [28]. В исследовании I. Szentpeteri et al. была определена сверхэкспрессия гена *VEGF-A* в 101 плаценте при ЗРП в сравнении с 140 плацентами при физиологически протекающей беременности, что авторы объясняют компенсаторным механизмом в ответ на гипоксию [60]. D. Borras et al. проведено измерение содержания ангиогенных факторов роста sFlt-1, свободного *VEGF* (f-*VEGF*) и коэффициента f-*VEGF*/sFlt-1 в сыворотке крови матери во время беременности и в пуповинной крови в момент рождения. В исследовании были включены одноплодные беременности, осложненные ЗРП. Обнаружено, что материнские плазменные уровни sFlt-1, f-*VEGF* достоверно выше, а коэффициент f-*VEGF*/sFlt-1 – значительно ниже при беременности, осложненной ЗРП, по сравнению с контрольной группой, в то время как в пуповинной крови существенных различий не найдено. Авторами сделан вывод о том, что у беременных с ЗРП более антиангиогенная среда [14].

Плацентарная *11β*-гидроксистероиддегидрогеназа 2 (*11β*-*HSD2*, placental *11β*-hydroxysteroid dehydrogenase 2) участвует в формировании плацентарного барьера, защищая плод от воздействия материнского кортизола [61, 65]. В 101 плаценте при беременности, осложненной ЗРП, после 33 недель определен значительно более низкий уровень экспрессии *11β*-*HSD2*, чем в 140 плацентах при физиологически протекающей беременности [16].

Гены, содержащие гомеобокс (*homeobox*), кодируют семейство транскрипционных факторов, играющих важную роль в эмбриональном периоде развития плода, в частности, в формировании кровеносных и лимфатических сосудов [43, 45]. Этот факт стал интересен для изучения роли генов, содержащих гомеобокс, в развитии плаценты человека и формировании ЗРП. В человеческой плаценте у новорожденных с идиопатической ЗРП определено снижение экспрессии генов *HLX1* и *ESX1L*, что приводит к угнетению пролиферации, миграции и инвазии, и увеличение экспрессии генов *DLX3*, *DLX4* и *TGIF-1*, что способствует усилению дифференцировки и апоптоза. Вариабельность экспрессии генов, содержащих гомеобокс, приводит к плацентарной дисфункции и развитию ЗРП [43, 44].

Инсулиноподобный фактор роста (*ИФР-1*, *ИФР-2*), анаболический гормон с различными биологическими эффектами, играет важную роль в пролиферации, защите митохондрий, жизнеспособности клеток, росте и развитии тканей, в эмбриологических и постнатальных состояниях, которые необходимы для нормального роста и дифференцировки плода и плаценты [41]. В исследовании Lee et al. определен низкий уровень глюкозы, инсулина, *ИФР-1*, *ИФР-2* в пуповинной крови у новорожденных с ЗРП, в плаценте беременных с ЗРП – повышенная экспрессия *ИФР-2* и снижение экспрессии *ИФР-1* [35]. Аналогичные результаты получены В. Borzsonyi et al., выявивших увеличение содержания *ИФР-2* в плаценте, что отражает ее физиологическую роль в оптимизации распределения энергии, а также более низкие уровни инсулина и глюкозы в пуповинной крови новорожденных с ЗРП [15]. Известно, что полиморфизмы генов *IGF2*, гомозиготного полиморфизма аллеля G *IGF2*-AraI ассоциированы с риском развития ожирения; полиморфизм A/G *IGF2*-AraI положительно коррелирует с риском развития патологии почек, ожирения и сахарного диабета 2 типа во взрослой жизни [67]. В трансверсальном исследовании у новорожденных с ЗРП был определен более высокий уровень *IGF2* в сыворотке крови при наличии генотипа A/G *IGF2*-AraI [30].

SERPINA3 (*serpin peptidase inhibitor clade A member 3*) известный как A1-антихимотрипсин, представляет собой белок острой фазы воспаления. В исследовании S.T. Chelbi et al. проведено измерение концентрации мРНК *SERPINA3* в плацентах при физиологически протекающей беременности и при беременности, осложненной изолированной преэклампсией или ЗРП, а также при сочетании этих двух осложнений. Показано, что при изолированном ЗРП содержание мРНК

SERPINA3 в плаценте увеличено в семь раз [22]. Белки семейства *куллинов (cullin)* являются неотъемлемым компонентом в раннем развитии эмбриона, на сегодняшний день выделяют восемь изоформ (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A, CUL4B, CUL5, CUL7, CUL9). В исследовании G. Gascoin-Lachambre et al. отражена роль мутации генов *CUL4B* и *CUL7* в развитии плацентарной недостаточности и ЗРП, авторы показали увеличение экспрессии генов *CUL1*, *CUL4A*, *CUL4B* и *CUL7* в плаценте при ЗРП [27]. Процессы апоптоза контролируются генами с *про-* (*Bax*) и *антиапоптотическими* (*Bcl-2*) биологическими эффектами [4]; при ЗРП в плаценте обнаружено снижение экспрессии гена *Bcl-2*, отвечающего за усиление апоптоза [17].

Эпидермальный фактор роста (EGF, epidermal growth factor) отвечает за рост плаценты и изменение ее функции в течение внутриутробного развития плода [19]. В исследовании A. Rab et al. установлен более низкий уровень экспрессии EGF в плаценте при ЗРП, чем при физиологически протекающей беременности, что отчасти объясняет меньший размер плаценты и плацентарную дисфункцию при ЗРП [48].

Лептин представляет собой пептидный гормон, оказывающий ряд биологических эффектов, ключевыми из которых являются регуляция работы нейроэндокринной системы матери и плода, энергетического баланса, инвазии трофобласта в спиральные артерии эндометрия и роста плода [1, 6, 24]. Начиная с 18 недель беременности в фетальной крови определяется более низкий уровень лептина по отношению к материнскому. Существует теория невязанного двухкомпонентного фетоплацентарного регулирования концентрации лептина, объясняющая отсутствие интегрального соотношения уровня лептина в пуповинной и материнской крови [1]. В исследовании M. Arslan et al. установлено снижение содержания фетального лептина в группе ЗРП по сравнению с группой контроля, определена статистически значимая корреляция между уровнем фетального лептина и массой плода [10]. Фактор внутриутробной гипоксии стимулирует синтез лептина клетками плацентарного трофобласта. У новорожденных с ЗРП за счет высокой связывающей способности с рецепторами к лептину отмечается снижение его биологически активной концентрации в пуповинной крови, что может привести к несбалансированному регулированию питания. Лептин выступает в качестве триггера синтеза трансформирующего фактора роста β (TGF- β , transforming growth factor β) посредством активации пути JAK-STAT в перитонеальных мезотелиальных клетках человека [36].

TGF- β играет важную роль в регуляции роста клеток трофобласта, контролируя пролиферацию, дифференцировку, апоптоз [18, 29]. Модулируя экспрессию N-ацилсфингозинамидагидролазы 1 (ASAH1, N-acylsphingosine amidohydrolase 1) и сфингозинкиназы типов 1 и 2 (SphK1/2, sphingosine kinase 1/2), TGF- β участвует в метаболизме сфинголипидов. Сфинголипиды, важные и уникальные структуры клеточных мембран человека, регулируют апоптоз на уровне транскрипции, участвуют в делении клетки. Измененная экспрессия ферментов ASAH1 и SphK1 в плаценте приводит к накоплению сфингозина, что способствует аномальному ангиогенезу, увеличению гибели клеток трофобласта и развитию ЗРП [21]. Роль aberrантной сигнализации TGF- β в нарушении метаболизма сфинголипидов в плаценте при ЗРП показана Chauvin et al. [21]. Установив увеличение концентрации сфингозина и снижение содержания церамида в плаценте при ЗРП по сравнению с физиологически протекающей беременностью, авторы утверждают, что повышенный уровень сфингозина вторичен по отношению к усилению распада церамида за счет возрастания экспрессии ASAH1 в результате увеличения TGF-сигнализации через путь ALK5/SMAD2. Более того, при нарушении TGF-опосредованной регуляции через ALK1/SMAD1 наблюдается снижение экспрессии SphK1, что способствует накоплению сфингозина в плаценте при ЗРП. В исследовании, проведенном на модели крыс с ЗРП, отражена роль нарушенной передачи сигнала TGF- β в развитии заболеваний легких [21]. Усиление синтеза TGF- β стимулирует экспрессию транскрипционных факторов GATA-6 и TTF-1 в альвеолярном эпителии, формируя воспаление и фиброз легкого у новорожденного [66]. Активация сигнальных путей TGF- β /BMP и IL-6/STAT-3 способствует увеличению сопротивления дыхательных путей, что в дальнейшем ассоциировано с развитием бронхиальной астмы [7]. ALK5 представляет собой рецептор типа II семейства TGF- β , участвует в сигнализации TGF- β . Дефект ALK5 в матке у мышей ассоциирован с нарушениями имплантации бластоцисты и развития плаценты [46].

Постнатальные аспекты ЗРП также многочисленны, условно их можно разделить на краткосрочные и долгосрочные. К краткосрочным осложнениям ЗРП относят перинатальную асфиксию, респираторный дистресс-синдром, меконийную аспирацию, ранние неонатальные судороги, легочное кровотечение, меконийную непроходимость, некротизирующий энтероколит, гематологические и метаболические нарушения,

нарушения терморегуляции [39]. Новорожденные с ЗРП представляют группу риска по развитию неврологических нарушений и нейрокогнитивной дисфункции. На модели крыс с ЗРП показано, что уменьшение экспрессии генов PPAR γ , Setd8, H4K20me, генов компонентов (Wnt3a, β -катенин) и мишени (Axin-2) сигнального пути Wnt в гиппокампе молодых крыс приводит к психомоторным и нейрокогнитивным нарушениям [33]. Долгосрочные последствия ЗРП включают сердечно-сосудистые заболевания, артериальную гипертензию, ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, нарушение функции почек, заболевания бронхолегочной системы, в том числе бронхиальную астму, остеопороз, детский церебральный паралич и нейропсихологические нарушения [13, 39]. В исследовании J. Ye et al. на модели крыс отражена роль повышенной экспрессии ингибитора цитокиновой сигнализации 3 (SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3) в развитии инсулинорезистентности при ЗРП [68]. На модели плодов овец с ЗРП выявлено нарушение опосредованной фактором роста гепатоцитов (hgf) связи островковых эндотелиоцитов и бета-клеток поджелудочной железы, приводящее к повреждению последних, нарушению секреции инсулина и формированию сахарного диабета 2 типа [54].

Таким образом, очевидно, что ЗРП является серьезным осложнением гестационного периода, которое приводит к ante-, intra- и постнатальной заболеваемости и смертности, оказывает значимое влияние на качество и продолжительность жизни человека в последующие годы. В настоящее время установлены генетические и молекулярные предикторы формирования ЗРП. Однако высокоспецифичных и доступных для клинической практики инструментов прогнозирования, ранней антенатальной диагностики формирования ЗРП, адекватной оценки степени повреждения центральной нервной системы новорожденного с ЗРП в настоящее время не существует, тогда как их наличие способствовало бы своевременному формированию групп риска по развитию данного осложнения беременности, созданию алгоритмов прегравидарной подготовки и антенатального мониторинга с целью более рационального выбора срока и способа родоразрешения, актуализации ведения новорожденного с ЗРП в постнатальном периоде.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова А.А., Гутникова Л.В., Деревянчук Е.Г. Геномные и постгеномные маркеры развития плаценты и плода. Ростов-на-Дону: ЮФУ, 2011. 48–70.
2. Всемирная организация здравоохранения. Новорожденные: снижение смертности. Информационный бюллетень № 333. Январь 2016 г.
3. Замалева Р.С., Мальцева Л.И., Черепанова Н.А., Фризина А.В., Лазарева В.К., Юнатов Е.Ю., Коган Я.Э., Фаттахова Ф.А. Состояние проблемы лечения и прогнозирования задержки развития плода // *Практ. медицина*. 2016. (1). 41–44.
4. Льюин Б., Кассимерис Л., Линганна В.П., Плоннер Д. Клетки. М.: БИНОМ, 2011. 951 с.
5. Ремнёва О.В., Буркова Т.В. Социальные и акушерские факторы риска гибели плода в срочных родах // *Репродуктивный потенциал России: версии и контрверсии: сб. тез. X Общерос. семинара, Сочи, 9–12 сентября 2017 г. М., 2017. 19–20.*
6. Чабанова Н.Б., Матаев С.И., Василькова Т.Н., Трошина И.А. Метаболические нарушения при адипоцитокиновом дисбалансе и гестационные осложнения // *Ожирение и метаболизм*. 2017. 14. (1). 9–16.
7. Alcazar M.A., Dinger K., Rother E., Ostreicher I., Vohlen C., Plank C., Dotsch J. Prevention of early postnatal hyperalimentation protects against activation of transforming growth factor- β /bone morphogenetic protein and interleukin-6 signaling in rat lungs after intrauterine growth restriction // *J. Nutr.* 2014. 144. (12). 1943–1951.
8. Alcazar M.A., Morty R.E., Lenzian L., Vohlen C., Ostreicher I., Plank C., Schneider H., Dötsch J. Inhibition of tgf- β signaling and decreased apoptosis in IUGR-associated lung disease in rats // *PLoS One*. 2011. 6. (10). e26371.
9. Araujo J.R., Correia-Branco A., Pereira A.C., Pinho M.J., Keating E., Martel F. Oxidative stress decreases uptake of neutral amino acids in a human placental cell line (BeWo cells) // *Reprod Toxicol.* 2013. 40. 76–81.
10. Arslan M., Yazici G., Erdem A., Erdem M., Ozturk Arslan E., Himmetoglu O. Endothelin 1 and leptin in the pathophysiology of intrauterine growth restriction // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2004. 84. (2). 120–126.
11. Biron-Shental T., Sukenik-Halevy R., Sharon Y., Goldberg-Bittman L., Kidron D., Fejgin M.D., Amiel A. Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010. 202. (4). 381. e1–e7.
12. Biron-Shental T., Sukenik-Halevy R., Sharon Y., Laish I., Fejgin M.D., Amiel A. Telomere shortening in intra uterine growth restriction placentas // *Early Hum. Dev.* 2014. 90. (9). 465–469.
13. Bjarnegard N., Morsing E., Cinthio M., Lanne T., Brodzki J. Cardiovascular function in

- adulthood following intrauterine growth restriction with abnormal fetal blood flow // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2013. 41. (2). 177–184.
14. *Borras D., Perales-Puchalt A., Ruiz Sacedon N., Perales A.* Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction // *J. Obstet. Gynecol.* 2014. 34. 218–220.
15. *Borzsonyi B., Demendi C., Nagy Z., Toth K., Csanad M., Pajor A., Rig J.Jr., Joo J.G.* Gene expression patterns of insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor 2 and insulin-like growth factor binding protein 3 in human placenta from pregnancies with intrauterine growth restriction // *J. Perinat. Med.* 2011. 39. (6). 701–707.
16. *Borzsonyi B., Demendi C., Pajor A., Rigo J.Jr., Marosi K., Agota A., Nagy Z.B., Joo J.G.* Gene expression patterns of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 enzyme in human placenta from intrauterine growth restriction: the role of impaired fetomaternal glucocorticoid metabolism // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2012. 161. (1). 12–17.
17. *Borzsonyi B., Demendi C., Rigo J., Szentpeteri I., Rab A., Joo J.G.* The regulation of apoptosis in intrauterine growth restriction: a study of Bcl-2 and Bax gene expression in human placenta // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2013. 26. (4). 347–350.
18. *Caniggia I., Winter J.L.* Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and preeclamptic pregnancies a review // *Placenta.* 2002. 23. 47–57.
19. *Casalini P., Iorio M.V., Galmozzi E., Menard S.* Role of HER receptors family in development and differentiation // *J. Cell Physiol.* 2004. 200. (3). 343–350.
20. *Cetin I., Mazzocco M.I., Giardini V., Cardelicchio M., Calabrese S., Algeri P., Martinelli A., Todyrenchuk L., Vergani P.* PlGF in a clinical setting of pregnancies at risk of preeclampsia and/or intrauterine growth restriction // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2017. 30. (2). 144–149.
21. *Chauvin S., Yinon Y., Xu J., Ermini L., Sallais J., Tagliaferro A., Todros T., Post M., Caniggia I.* Aberrant TGF β signalling contributes to dysregulation of sphingolipid metabolism in intrauterine growth restriction // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. 100. 986–996.
22. *Chelbi S.T., Wilson M.L., Veillard A.-C., Ingles S.A., Zhang J., Mondon F., Gascoin-Lachambre G., Doridot L., Mignot T.M., Rebouret R., Carbonne B., Concordet J.P., Barbaux S., Vaiman D.* Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases // *Hum. Mol. Genet.* 2012. 21. (9). 1968–78.
23. *Cowans N.J., Stamatopoulou A., Matwejew E., von Kaisenberg C.S., Spencer K.* First-trimester placental growth factor as a marker for hypertensive disorders and SGA // *Prenat. Diagn.* 2010. 30. 565–570.
24. *Diamond F.B. Jr., Eichler D.C.* Leptin and the adipocyte endocrine system // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2002. 39. (4-5). 499–525.
25. *Ferencz A., Orvos H., Hermes E.* Major differences in the levels of redox status and antioxidant defence markers in the erythrocytes of pre- and full-term neonates with intrauterine growth restriction // *Reprod. Toxicol.* 2015. 53. 10–14.
26. *Ferreira J.C., Choufani S., Kingdom J., Weksberg R.* Epigenetic programming and fetal growth restrictions // *Fetal Matern. Med. Rev.* 2010. 21. (3). 204–224.
27. *Gascoin-Lachambre G., Buffat C., Rebouret R., Chelbi S.T., Rigourd V., Mondon F., Mignot T.M., Legras E., Simeoni U., Vaiman D., Barbaux S.* Cullins in human intra-uterine growth restriction: expressional and epigenetic alterations // *Placenta.* 2010. 31. (2). 151–157.
28. *Gourvas V., Dalpa E., Konstantinidou A., Vrachnis N., Spandidos D.A., Sifakis S.* Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction (review) // *Mol. Med. Rep.* 2012. 6. 23–27.
29. *Harradine K.A., Akhurst R.J.* Mutations of TGF β signaling molecules in human disease // *Ann. Med.* 2006. 38. (6). 403–414.
30. *Haşmaşanu M.G., Baizat M., Procopciuc L.M., Blaga L., Valeanu M.A., Drugan T.C., Zaharie G.C., Bolboaca S.D.* Serum levels and ApaI polymorphism of insulin-like growth factor 2 on intrauterine growth restriction infants // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2018. 31. (11). 1470–1476.
31. *Heshmat S.H.* Intrauterine growth restriction – A review article // *Anatomy Physiol. Biochem. Int. J.* 2017. 1. (5). 555–572.
32. *Joo J.G., Rigo J.Jr., Börzsönyi B., Demendi C., Kornya L.* Placental gene expression of the placental growth factor (PlGF) in intrauterine growth restriction // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2017. 30. (12). 1471–1475.
33. *Ke X., Xing B., Yu B., Yu X., Majnik A., Cohen S., Lane R., Joss-Moore L.* IUGR disrupts the PPAR γ -Setd8-H4K20me¹ and Wnt signaling pathways in the juvenile rat hippocampus // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2014. 38. 59–67.
34. *Rao Krishna R., Vishnu Bhat B.* Molecular mechanisms of intrauterine growth restriction // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2018. 31. (19). 2634–2640.
35. *Lee M.H., Jeon Y.J., Lee S.M., Park M.H., Jung S.C., Kim Y.J.* Placental gene expression is related to glucose metabolism and fetal cord blood levels of insulin and insulin-like growth factors in intrauterine growth restriction // *Early Hum. Dev.* 2010. 86. (1). 45–50.

36. Leung J.C., Chan L.Y., Tang S.C., Chu K.M., Lai K.N. Leptin induces TGF- β synthesis through functional leptin receptor expressed by human peritoneal mesothelial cell // *Kidney Int.* 2006. 69. (11). 2078–2086.
37. Lewis J.B., Mejia C., Jordan C., Monson T.D., Bodine J.S., Dunaway T.M., Egbert K.M., Lewis A.L., Wright T.J., Ogden K.C., Broberg D.S., Hall P.D., Nelson S.M., Hirschi K.M., Reynolds P.R., Arroyo J.A. Inhibition of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) protects from secondhand smoke (SHS) induced intrauterine growth restriction IUGR in mice // *Cell Tissue Res.* 2017. 370. (3). 513–521.
38. Li S.-W., Ling Y., Jin S., Lin Y.F., Chen Z.J., Hu C.X., Wang M.H., Yao M.Z. Expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 and placental growth factor in fetal growth restriction cases and intervention effect of tetramethylpyrazine // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2014. 7. 663–667.
39. Longo S., Bollani L., Decembrino L., di Comite A., Angelini M., Stronati M. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR) // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2013. 26. (3). 222–225.
40. Maisonneuve E., Delvin E., Ouellet A., Morin L., Dube J., Boucoiran I., Moutquin J.M., Fournon J.C., Klam S., Levy E., Leduc L. Oxidative conditions prevail in severe IUGR with vascular disease and Doppler anomalies // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2014. 15. 1–5.
41. Martín-Estal I., de la Garza R.G., Castilla-Cortázar I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2016. 170. 1–35.
42. Murki S., Sharma D. Intrauterine growth retardation – a review article // *J. Neonatal Biol.* 2014. 3. 315.
43. Murthi P. Review: placental homeobox genes and their role in regulating human fetal growth // *Placenta.* 2014. 35. 46–50.
44. Murthi P., Rajaraman G., Brennecke S.P., Kalionis B. The role of placental homeobox genes in human fetal growth restriction // *J. Pregnancy.* 2011. 2011. 11.
45. Pathirage N.A., Cocquebert M., Sadovsky Y., Abumaree M., Manuelpillai U., Borg A., Keogh R.J., Brennecke S.P., Evain-Brion D., Fournier T., Kalionis B., Murthi P. Homeobox gene transforming growth factor β -induced factor-1 (TGIF-1) is a regulator of villous trophoblast differentiation and its expression is increased in human idiopathic fetal growth restriction // *Mol. Hum. Reprod.* 2013. 19. (10). 665–675.
46. Peng J., Monsivais D., You R., Zhong H., Pangas S.A., Matzuk M.M. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. 112. (36). 5098–5107.
47. Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G., Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in fetal and neonatal diseases // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2012. 25. 2575–2578.
48. Rab A., Szentpeteri I., Kornya L., Borzsonyi B., Demendi C., Joo J.G. Placental gene expression patterns of epidermal growth factor in intrauterine growth restriction // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2013. 170. (1). 96–99.
49. Radon-Pokracka M., Huras H., Jach R. Intrauterine growth restriction-diagnosis and treatment // *Przegl. Lek.* 2015. 72. (7). 376–382.
50. Radulescu L., Ferechide D., Popa F. The importance of fetal gender in intrauterine growth restriction // *J. Med. Life.* 2013. 6. (1). 38–39.
51. Raia-Barjat T., Prieux C., Gris J.C., Chappelle C., Laporte S., Chauleur C. Angiogenic factors for prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction onset in high-risk women: AngioPred study // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2017. 1–10. doi 10.1080/14767058.2017.1378325
52. Romero R., Erez O., Espinoza J., Fu W., Todem D., Kusanovic J.P., Gotsch F., Edwin S., Nien J.K., Chaiworapongsa T., Mittal P., Mazaki-Tovi S., Than N.G., Gomez R., Hassan S.S. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2008. 21. (5). 279–287.
53. Romero R., Nien J.K., Espinoza J., Todem D., Fu W., Chung H., Kusanovic J.P., Gotsch F., Erez O., Mazaki-Tovi S., Gomez R., Edwin S., Chaiworapongsa T., Levine R.J., Karumanchi S.A. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and antiangiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2008. 21. (1). 9–23.
54. Rozance P.J., Anderson M., Martinez M., Fahy A., Macko A.R., Kailey J., Seedorf G.J., Abman S.H., Hay W.W. Jr., Limesand S.W. Placental insufficiency decreases pancreatic vascularity and disrupts hepatocyte growth factor signaling in the pancreatic islet endothelial cell in fetal sheep // *Diabetes.* 2015. 64. (2). 555–564.
55. Schneider D., Hernandez C., Farias M., Uauy R., Krause B.J., Casanello P. Oxidative stress as common trait of endothelial dysfunction in chorionic arteries from fetuses with IUGR and LGA // *Placenta.* 2015. 36. 552–558.
56. Sharma D., Shastri S., Sharma P. Intrauterine growth restriction: Antenatal and postnatal aspects // *Clin. Med. Insights: Pediatrics.* 2016. 10. 67–83.
57. Stepan H., Krämer T., Faber R. Maternal plasma concentrations of soluble endoglin in pregnancies with

- intrauterine growth restriction // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2007. 92. 2831–2834.
58. *Suhag A., Berghella V.* Intrauterine growth restriction (IUGR): etiology and diagnosis // Curr. Obstet. Gynecol. Rep. 2013. 2. 102–111.
59. *Szentpeteri I., Rab A., Kornya L., Kovacs P., Brubel R., Joo J.G.* Placental gene expression patterns of endoglin (CD105) in intrauterine growth restriction // J. Matern. Fetal Neonatal Med. 2014. 27. (4). 350–354.
60. *Szentpeteri I., Rab A., Kornya L., Kovacs P., Joo J.G.* Gene expression patterns of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in human placenta from pregnancies with intrauterine growth restriction // J. Matern. Fetal Neonatal Med. 2013. 26. 984–989
61. *Wachter R., Masarik L., Burzle M., Mallik A., von Mandach U.* Differential expression and activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human placenta and fetal membranes from pregnancies with intrauterine growth restriction // Fetal Diagn Ther. 2009. 25. 328–335.
62. *Wixey J.A., Chand K.K., Colditz P.B., Bjorkman S.T.* Neuroinflammation in intrauterine growth restriction // Placenta. 2017. 54. 117–124.
63. *Wu F., Tian F.-J., Lin Y., Xu W.-M.* Oxidative stress: placenta function and dysfunction // Am. J. Reprod. Immunol. 2016. 76. 258–271.
64. *Toutain J., Prochazkova-Carlotti M., Cappel-len D., Jarne A., Chevret E., Ferre J., Idrissi Y., Pelluard F., Carles D., Maugey-Laulon B., Lacombe D., Horovitz J., Merlio J.P., Saura R.* Reduced placental telomere length during pregnancies complicated by intrauterine growth restriction // PLoS One. 2013. 8. (1). e54013.
65. *Tzschoppe A., Struwe E., Blessing H., Fahlbusch F., Liebhaber G., Dörr H.G., Rauh M., Rascher W., Goecke T.W., Schild R.L., Schleussner E., Scheler C., Hübler A., Dahlem P., Dötsch J.* Placental 11beta-HSD2 gene expression at birth is inversely correlated with growth velocity in the first year of life after intrauterine growth restriction // Pediatr. Res. 2009. 65. (6). 647–53.
66. *Vahatalo R., Asikainen T.M., Karikoski R., Kinnula V.L., White C.W., Andersson S., Heikinheimo M., Myllarniemi M.* Expression of transcription factor GATA-6 in alveolar epithelial cells is linked to neonatal lung disease // Neonatology. 2010. 9. 9. (3). 231–240.
67. *Vattam K.K., Ali Khan I., Movva S., Mukkavali K.K., Upendram P., Poornima S., Rao P., Hasan Q.* IGF2 ApaI A/G polymorphism evaluated in ESRD individuals as a biomarker to identify patients with new onset diabetes mellitus after renal transplant in Asian Indians // Open J. Nephrol. 2013. 3. 104–108.
68. *Ye J., Zheng R., Wang Q., Liao L., Ying Y., Lu H., Cianflone K., Ning Q., Luo X.* Down regulating SOCS3 with siRNA ameliorates insulin signaling and glucose metabolism in hepatocytes of IUGR rats with catch-up growth // Pediatr. Res. 2012. 72. (6). 550–559.

INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION: MOLECULAR ASPECTS OF FORMATION, PROGNOSIS FOR THE FUTURE (REVIEW)

**Nadezhda Sergeevna DOLGOVA, Svetlana Dmitrievna YAVORSKAYA,
Marina Borisovna IGI TOVA**

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

Intrauterine growth restriction (IGR) is one of the leading causes of perinatal morbidity and mortality. The main mechanism underlying the delay in fetal growth is chronic placental dysfunction, in the form of a violation of adequate supply of oxygen and nutrients to the fetus, which leads to disruption of its growth and development. The delay in fetal growth is associated with a number of metabolic, cardiovascular, neurological disorders, respiratory diseases in early infancy and adulthood, requires long-term follow-up care and corrective therapy throughout the whole subsequent life. At present, a great interest is the study of molecular mechanisms for the formation of IGR, prenatal and postnatal complications of fetal growth retardation. The list of genetic causes of IGR grows with the development of molecular biology. In the review, we tried to cover the genetic, metabolic and endocrine factors responsible for the development of IGR. The in-depth study of the basic molecular mechanisms that form the IGR will allow expanding the range of preventive measures, diagnostic capabilities of early detection and timely correction of IGR, which will allow this group of patients to reduce perinatal morbidity, mortality and the risk of short-term and long-term consequences.

Key words: intrauterine growth restriction, molecular mechanisms, cardiovascular diseases, neurological disorders, newborns, metabolic syndrome.

*Dolgova N.S. – post-graduate student of the department of obstetrics and gynecology with the course of FVE,
e-mail: dolgovans@yandex.ru*

*Yavorskaya S.D. – doctor of medical sciences, associate professor, professor the department of obstetrics
and gynecology with the course of FVE, e-mail: L2001@bk.ru*

*Igitova M.B. – doctor of medical sciences, professor of the department of obstetrics and gynecology with the FVE,
e-mail: igitova-2ai@mail.ru*

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ АЛКИЛ-ГЛИЦЕРИНОВ В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ОЖИРЕНИЕМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Татьяна Павловна НОВГОРОДЦЕВА¹, Оксана Юрьевна КЫТИКОВА¹,
Татьяна Александровна ГВОЗДЕНКО¹, Марина Владимировна АНТОНЮК^{1,2}

¹ Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения
690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73-г

² Дальневосточный федеральный университет
690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

В профилактике и лечении бронхиальной астмы актуальны направления научных исследований, нацеленные на изучение механизмов развития и оптимизацию терапевтических подходов к трудно контролируемым фенотипам заболевания. Таким является фенотип бронхиальной астмы, ассоциированной с ожирением. Центральная функция в физиологии и патологии легких, как и в этиопатогенезе ожирения, отводится липидам, играющим важнейшую роль в поддержании энергетического баланса клетки и осуществлении внутриклеточной и межклеточной сигнализации. Детализация роли метаболитов алкил-глицериновой структуры в механизмах формирования фенотипа бронхиальной астмы в сочетании с ожирением представляет собой актуальное направление современных исследований. При анализе работ по данной проблеме выделена и обоснована стратегия терапии бронхиальной астмы, ассоциированной с ожирением, базирующаяся на общих механизмах метаболических и сигнальных нарушений при данных заболеваниях. В последние годы, в связи с открытием взаимосвязи нарушений в биосинтезе диацильных и алк(ен)ил-ацильных фосфолипидов с заболеваниями органов дыхания и ожирением, наблюдается возрастающий интерес к их изучению в качестве перспективных терапевтических мишеней. Введение противовоспалительных природных соединений, к которым относятся алкил-глицерины, содержащиеся в морских гидробионтах, позволит модифицировать внутриклеточные сигнальные пути, отвечающие за воспалительную активацию клеток при бронхиальной астме, ассоциированной с ожирением.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ожирение, воспаление, природные алкил-глицерины.

Бронхиальная астма (БА) является одним из широко распространенных заболеваний, имеющих тенденцию к неуклонно прогрессирующему увеличению числа больных; ВОЗ оценивает ее как «нарастающую проблему» [1]. В настоящее время БА страдает до 18 % населения разных стран мира [1]. Высокая распространенность данной патологии сопряжена с необходимостью разработки программ для снижения глобального бремени БА [41]. Несмотря на тенденцию последнего десятилетия к снижению числа обращений больных за неотложной помощью, частоты госпитализаций и показателей летальности,

контроль симптомов заболевания не достигается более чем у половины пациентов с БА [4]. Одной из причин отсутствия контроля БА, по данным результатов исследований, проведенных под эгидой международной инициативы респираторной группы (IpCRg – International primary Respiratory group), является наличие сопутствующей патологии, в частности ожирения [35]. В последнее десятилетие ожирение приобретает характер мировой пандемии, приковывая пристальное внимание научно-исследовательских коллективов и представляя собой одну из актуальных проблем мира [23].

Новгородцева Т.П. – д.б.н., проф., зам. директора по научной работе, главный научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6058-201X>

Кытикова О.Ю. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5018-0271>

Гвозденко Т.А. – д.м.н., проф. РАН, главный научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, ORCID [0000-0002-6413-9840](https://orcid.org/0000-0002-6413-9840)

Антонюк М.В. – д.м.н., проф., зав. лабораторией восстановительного лечения; проф. школы биомедицины, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2492-3198>; тел/факс (423) 2788-201

В профилактике и лечении БА актуальными являются исследования, направленные на изучение механизмов развития и оптимизацию терапевтических подходов для трудно контролируемых фенотипов БА, к которым относится фенотип БА, ассоциированной с ожирением [20]. Несмотря на значительную вариабельность рассматриваемых и обоснованных в настоящее время механизмов патогенетического действия ожирения на течение БА, метаболические аспекты взаимосвязи данных заболеваний и возможности влияния на их патологический метаболический профиль нуждаются в дополнительном изучении и детализации [39]. Только согласованные междисциплинарные усилия могут привести к выяснению фундаментальных биохимических, патофизиологических и молекулярных основ данных заболеваний, демонстрируя научно-исследовательским коллективам путь для профилактики и эффективных терапевтических вмешательств.

Центральная функция в физиологии и патологии легких, как и в этиопатогенезе ожирения, отводится липидам и нарушениям липорегуляторных процессов [5, 44]. Липиды представляют собой большую и структурно разнообразную группу в составе биомолекул, играющую важнейшую роль в поддержании энергетического баланса клетки и осуществлении внутриклеточной и межклеточной сигнализации [31]. Липиды являются основным компонентом легочного сурфактанта, и перераспределение в нем молекулярных видов фосфолипидов (ФЛ) взаимосвязано с патогенезом бронхолегочной патологии, в частности БА, муковисцидоза и острого респираторного дистресс-синдрома [17]. Несомненно и всесторонне обоснована важная роль нарушений липидного метаболизма в патофизиологии ожирения [33]. Липидные медиаторы воспаления (эйкозаноиды и лейкотриены), которые являются метаболитами арахидоновой кислоты, входящей в состав ФЛ клеточных мембран, участвуют в развитии системного воспаления, которому отводится важная патофизиологическая роль как в формировании БА, так и в развитии ожирения [12].

Эйкозаноиды – конечные продукты ферментативного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), носителями которых являются ФЛ – обязательные структурные компоненты клеточных биомембран, задействованные в важнейших регуляторных механизмах клетки. ФЛ по структурным признакам подразделяются на диацильные, алкил-ацильные и алкенил-ацильные (плазмалогены) субклассы. Метаболизм липидов в организме, большинство из которых полифункционально, определяет особую актуальность изучения непосредственного участия индиви-

дуальных липидных классов в формировании ответа организма на развитие воспалительного процесса [42]. В значительной мере данный ответ определяется соотношением диацильных и алкил (алкенил)-ацильных субклассов ФЛ [3]. В связи с открытием взаимосвязи нарушений в биосинтезе диацильных и алкил (алкенил)-ацильных ФЛ с заболеваниями органов дыхания и ожирением в последние годы наблюдается неуклонно возрастающий интерес к их изучению в качестве возможных и перспективных терапевтических мишеней [3].

В исследовании В. Zemski и соавт. установлено, что бронхиальный эпителий человека значительно обогащен диацильными ФЛ и может быть источником эйкозаноидов, производство которых инициируется высвобождением арахидоновой кислоты из мембранных ФЛ кальций-зависимой цитозольной фосфолипазой А2 [46]. 15-липоксигеназа, которая вовлечена в патогенез БА, является ферментом, который также использует арахидоновую кислоту в качестве субстрата [36]. Инициация воспаления на ранних стадиях БА опосредована преимущественным участием окисленных производных арахидоновой кислоты, в то время как окисленные производные докозагексаеновой кислоты (ДГК), доминирующей во 2-м положении плазмалогенных форм, блокируют действие провоспалительных медиаторов арахидоновой кислоты [13]. В свою очередь, дефицит алк(ен)ил-ацильных ФЛ тесно ассоциирован с бронхолегочной патологией [9]. Таким образом, поддержание баланса диацильных и алк(ен)ил-ацильных ФЛ в организме человека в настоящее время может рассматриваться как важный фактор в профилактике и лечении БА, ассоциированной с ожирением.

Предшественниками в биосинтезе ФЛ выступают алкил-глицерины (АГ) – липиды с простой эфирной связью. Природные АГ являются биологически активными соединениями и широко представлены в различных организмах, являясь основным структурным элементом клеток их самых древних представителей – археобактерий [26]. Это обусловлено устойчивостью АГ в кислой и щелочной среде, а также к окислению кислородом. Большинство из природных липидов с простой эфирной связью в положении остатка глицерина sn-1 содержат алкильную (*O*-алкил-) и алкенильную (*O*-алк-1-енил-) связи [2]. Кроме того, большая часть полярных липидов с простой эфирной связью в положении остатка глицерина sn-2 имеют ПНЖК, в основном ДГК. Алкильные и алкенильные липиды обозначаются терминами «плазманильные» и «плазмелильные» липиды соответственно, 1-*O*-(1*Z*-алкенил)-2-ацил-

глицерофосфолипиды – как плазменил-ФЛ или плазмалогены [18, 27].

Липиды мембран чрезвычайно разнообразны по составу, который определяется видом организма и типом клетки. Несмотря на известную центральную роль липидов в патофизиологии легких, вопросы выявления уникального распределения ФЛ в клетках легких, участвующих в их защите, находятся в стадии активного изучения. Легкое человека состоит из 40 различных типов клеток, каждый из которых характеризуется разнообразием ФЛ, что обусловлено вариациями в полярной подгруппе (холин, этаноламин, серин, инозитол и глицерин) в положении глицеринового остатка sn-3 и многочисленными комбинациями жирных ацильных компонентов в положении sn-1 и sn-2 остатка глицерина. По данным С.А. Pickens и соавт., с ожирением тесно связан 51 вид липидов плазмы крови. Кроме того, авторами были идентифицированы несколько видов липидов, связанных с ожирением, которые отсутствовали в известных базах данных липидов [34]. Эти результаты дают новое представление о патофизиологии ожирения, открывая потенциальные пути для таргетного терапевтического воздействия.

Тщательная характеристика липидома больных с БА и ожирением может иметь решающее значение для понимания функции, развития и исхода данных заболеваний [46]. Актуальность изучения липидов с простой эфирной связью обусловлена изменением их содержания при патологии, в сравнении с уровнем липидов у здоровых лиц. По сравнению со сложноэфирными глицерофосфолипидами, липиды с простой эфирной связью менее распространены. Присутствие плазмалогенов в мембранах клеток тканей млекопитающих определяет свойства биомембран и специфичность мембранных рецепторов [19]. В дополнение к основной, структурной роли в клеточных биомембранах, плазмалогены участвуют в дифференцировке клеток и осуществлении внутриклеточной сигнализации соответственно в реализации физиологических и когнитивных функций организма [43]. Плазмалогены действуют как эндогенные антиоксиданты за счет наличия винильной связи в алкенильном радикале. В частности, имеются данные А. Broniec и соавт., позволяющие предположить, что плазмалогены могут защитить мембранные липиды от окисления синглетным кислородом [10]. Недавнее исследование этого же научного коллектива позволяет предположить, что антиоксидантное действие плазмалогенов реализуется как внутримолекулярно, так и межмолекулярно и не зависит от положения остатка глицерина sn-1 и sn-2 или конформации их мембран [11].

Плазмалогены составляют около 18 % от общего количества ФЛ в мембранах клеток, наиболее распространенными из них являются плазмалогены фосфатидилэтаноламинов (5–22 %) и фосфатидилхолинов (0,8–22 %). Тем не менее уровни этих плазмалогенов различаются среди различных клеток или тканей, составляя более 50 % в сердце и скелетных мышцах, почках, головном мозге и эритроцитах [28]. В исследовании Т. Rog и А. Koivuniemi установлено, что клеточные мембраны, состоящие преимущественно из плазмалогенов, имели меньшую толщину в молекулярно-динамическом моделировании, в частности, в сравнении с пальмитоил-олеил-фосфатидилхолином [38]. К плазмалогенным формам относят фактор активации тромбоцитов, который является универсальным сигнальным посредником, эндогенно образующимся в клетках млекопитающих и принимающим непосредственное участие в различных физиологических процессах человека. Он участвует в процессах активации тромбоцитов при БА, аллергии, ишемии и вовлечен во все провоспалительные и регуляторные реакции в организме млекопитающих. АГ обладают высокой метаболической активностью [14]. Липиды с простой эфирной связью оказывают иммуностимулирующее действие, реализуемое посредством активации макрофагов, проявляют антибактериальную и противогрибковую активность, антиангиогенный эффект, ингибируют рост опухолевых клеток [29].

Изменение уровня плазмалогенов наблюдается как при ожирении, так и БА. В исследовании Y. Yamazaki показано, что у больных с метаболическим синдромом наблюдалось снижение доли насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в липидах сыворотки крови, содержание которых было положительно связано с концентрацией холестерина липопротеинов высокой плотности и плазмалогенов, но обратно – с уровнем триглицеридов и холестерина липопротеинов низкой плотности [40]. В исследовании К.Н. Pietiläinen и соавт. обнаружено уменьшение содержания липидов с простой эфирной связью при ожирении [33]. Данной группой ученых продемонстрировано, что уровень плазмалогенов, содержащих арахидоновую кислоту в положении остатка глицерина sn-2, в мембранах адипоцитов близнецов с ожирением меньше, чем у метаболически здоровых близнецов. Наоборот, содержание плазмалогенов увеличивается у тренированных людей и лиц, придерживающихся диетического питания [24]. В то же время установлено, что уровень плазмалогенов повышается в печени крыс, получающих высокожировую диету [15], что, по мнению ряда исследователей,

может свидетельствовать об активации защитных механизмов, направленных на нивелирование проявлений окислительного стресса [8]. Содержание плазмалогенов также существенно снижается у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом [37]. Недавние исследования J.E. Jang и соавт. показали защитную роль плазмалогенов в развитии данной патологии посредством взаимодействия с ядерными рецепторами, активируемыми пероксисомными пролифераторами (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs), которые играют важную роль в регуляции клеточной дифференцировки [21].

Дефицит плазмалогенов ассоциирован с бронхолегочной патологией (БА, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)), нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера), демиелинизирующими заболеваниями центральной нервной системы (рассеянный склероз), геномной патологией (синдром Дауна) и расстройствами аутистического спектра [9]. Плазмалогены, главным образом плазменил-ФЛ, входящие в состав сурфактанта (около 3 %), защищают легкие от агрессивного воздействия активных форм кислорода [18, 19]. В исследовании К.М. Wynalda и соавт. продемонстрировано, что дефицит плазмалогенов опосредует токсическое действие атмосферного озона и курения на легкие [45].

С одной стороны, длинноцепочечные жирные кислоты могут поставлять материалы для биосинтеза плазмалогенов, с другой стороны, повышенные содержания насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в плазме может быть связано со снижением функции пероксисом [40]. Именно дисфункцией пероксисом, в которых происходят начальные этапы биосинтеза данных ФЛ, может быть обусловлен дефицит в организме человека липидов с простой эфирной связью, в частности, плазмалогенов [7]. Нарушения функционирования пероксисом играют важную роль не только в этиопатогенезе пероксисомных болезней, но и в развитии ожирения [25], что может быть привлекательной терапевтической мишенью в терапии БА, ассоциированной с ожирением. Недавние исследования показали клинико-патологическую значимость взаимодействий между липидами и эндотелиальными клетками [30]. Плазмалогены, как и сфингомиелин, составляющий около 10 % ФЛ, играют важную роль в реакции эндотелиальных клеток на развитие воспалительного процесса, и их дисфункция является важным патофизиологическим механизмом развития различных заболеваний, в частности, бронхолегочной патологии. В исследовании F.S. Ahmed и соавт. показано, что высокий уровень сфингомиелина

указывает на более быстрое ежегодное прогрессирование легочной эмфиземы [6].

Таким образом, детализация роли метаболитов алкил-глицериновой структуры в механизмах формирования фенотипа БА в сочетании с ожирением является крайне актуальным направлением современных научных исследований. Учитывая общие механизмы метаболических и сигнальных нарушений при БА и ожирении, терапевтическая стратегия лечения больных с БА, сочетанной с ожирением, может быть направлена на модификацию внутриклеточных сигнальных путей, отвечающих за воспалительную активацию клеток.

Если применение ФЛ сопровождается выраженными терапевтическими эффектами при отсутствии побочных эффектов, то применение плазмалогенов практически не изучено [22]. В настоящее время существует ряд синтетических и полусинтетических препаратов в качестве предшественников плазмалогенов, имеющих в составе алкильный фрагмент в положении sn-1 и ДГК в положении sn-2 молекулы глицерина. Известны и природные алкил-глицерины, содержащиеся в морских гидробионтах, которые являются биологически активными соединениями. АГ найдены у многих морских организмов, но лишь жир печени хрящевых рыб (акулы, скаты) служит основным источником природных АГ. Однако не у всех видов акул, а только у глубоководных акул и видов, активно мигрирующих по глубине, АГ, наряду со скваленом, являются основными липидами печеночного жира. Морские моллюски, популярный продукт питания во многих странах, богаты плазменил-ФЛ. В настоящее время появились работы, в которых именно диета, в состав которой входят морепродукты, является наиболее приемлемым источником плазмалогенов для человека [13, 16]. В то же время биологически активные добавки, разрабатываемые при использовании внутренних органов гидробионтов, рекомендуются к применению только в качестве источников ПНЖК, без учета присутствия в них липидов с алкил-группой, что сужает известный спектр их биологического действия. Отмечается и отсутствие на рынке препаратов с высокоочищенными АГ. По данным E.V. Ermolenko и соавт., наиболее перспективным источником АГ являются липиды пищеварительной железы кальмара *Berryteuthis magister*, которая содержит наибольшее их количество, преимущественно химилового спирта (73,5 % от суммы АГ) [16]. Этими же авторами показано, что введение в диету экспериментальных крыс АГ и n-3 ПНЖК позволило увеличить содержание плазмалогенов и ДГК в липидах печени животных, что позволяет авторам рекомендовать использование данных липидов

в плазмалоген-замещающей терапии человека. Дополнительные исследования, направленные на изучение механизмов действия липидов из морских гидробионтов, содержащих 1-О-алкил-диацилглицерины или концентраты АГ, позволит существенно расширить область их терапевтического применения. Изменяя структуру мембран за счет увеличения количества плазмалогенов, можно изменить набор рецепторов на поверхности мембранных структур и модифицировать межклеточные взаимодействия при системном воспалении при БА и ожирении.

Более 80 % плазмалогенов из диеты всасываются в кишечнике, приводя к увеличению концентрации плазмалогенов в плазме крови. Так, при алиментарном поступлении 1-О-алкил-2,3-диацил-глицеринов и ФЛ с простой эфирной связью в пищеварительном тракте происходит их гидролиз и образование АГ и свободных жирных кислот. Далее, в печени АГ трансформируются в плазмалогены и с липопротеинами транспортируются в различные органы и ткани организма, в том числе в легкие. Применение АГ более чем в 20 раз повышает устойчивость клеток эндотелия бронхов человека к гипоксии [47]. Еще одним из механизмов влияния диетических АГ на основные медиаторы воспалительных процессов при ожирении и БА является изменение концентрации Ca^{2+} , участвующего в поддержании мембранного потенциала покоя гладкомышечных клеток. Повышение концентрации Ca^{2+} приводит к сокращению клетки, а уменьшение – к расслаблению гладкомышечной мускулатуры. В работе F. Pedrono и соавт. продемонстрировано, что диетические добавки АГ к культуре клеток блокируют поступление ионов Ca^{2+} , что важно в терапии БА [32]. Регулируя количество АГ и состав ПНЖК в диете, можно не только повысить уровень плазмалогенов и ингибировать поступление ионов Ca^{2+} в клетку, но и снизить уровень триглицеридов и холестерина в сыворотке крови больных.

Таким образом, детализация роли метаболитов алкил-глицериновой структуры в механизмах формирования фенотипа БА в сочетании с ожирением является актуальным направлением современных исследований. Стратегия терапии БА, ассоциированной с ожирением, может базироваться на общих механизмах метаболических и сигнальных нарушений при данных заболеваниях. В связи с открытием взаимосвязи нарушений в биосинтезе диацильных и алк(ен)ил-ацильных фосфолипидов с заболеваниями органов дыхания и ожирением наблюдается возрастающий интерес к их изучению в качестве перспективных терапевтических мишеней. Введение противовоспалительных природных соединений, к которым

относятся алкил-глицериновые эфиры, содержащиеся в морских гидробионтах, позволит модифицировать внутриклеточные сигнальные пути, отвечающие за воспалительную активацию клеток при БА, ассоциированной с ожирением. Дополнительные исследования в данном направлении позволят оптимизировать контроль ассоциированной с ожирением БА на этапе восстановительного лечения с использованием природных АГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2014 г.) / ред. А.С. Белевский. М.: Российское респираторное общество, 2015.
2. Данилова А.Л., Шульгина Л.В., Рыбченко А.А., Шабанов Г.А., Латышев Н.А., Касьянов С.П. Влияние природных 1-О-алкил-глицеринов на защитный статус организма у пожилых людей // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исслед. 2016. (12). 1194–1198.
3. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Жукова Н.В., Лобанова Н.Г., Антонюк М.В. Метаболические превращения полиненасыщенных жирных кислот при хронических воспалительных заболеваниях органов дыхания // Междунар. журн. прикл. и фундамент. исслед. 2015. (11). 201–206.
4. Кытикова О.Ю., Гвозденко Т.А., Антонюк М.В. Современные аспекты распространенности хронических бронхолегочных заболеваний // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2017. (64). 94–100.
5. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Кнышова В.В., Жукова Н.В., Бивалькевич Н.В. Состав жирных кислот мембран эритроцитов у пациентов с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. (48). 33–38.
6. Ahmed F.S. Plasma sphingomyelin and longitudinal change in percent emphysema on CT. The MESA lung study // Biomarkers. 2014. 19. (3). 207–13.
7. Argyriou C., D'Agostino M.D., Braverman N. Peroxisome biogenesis disorders // Transl. Sci. Rare Dis. 2016. 1. (2). 111–144.
8. Barr J., Caballeria J., Martinez-Arranz I. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression // J. Proteome Res. 2012. 11. 2521–2532.
9. Braverman N.E., Moser A.B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease // Biochim. Biophys. Acta. 2012. 1822. (9). 1442–52.
10. Broniec A., Klosinski R., Pawlak A. Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems // Free Radic. Biol. Med. 2011. 50. 892–898.

11. Broniec A., Żądło A., Pawlak A. Interaction of plasmenylcholine with free radicals in selected model systems // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. 106. 368–378.
12. Dean J.M., Lodhi I.J. Structural and functional roles of ether lipids // *Protein Cell.* 2018. 9. (2). 196–206.
13. Denisenko Y.K., Lobanova E.G., Novgorodtseva T.P., Gvozdenko T.A., Nazarenko A.V. The role of arachidonic acid metabolites (endocannabinoids and eicosanoids) in the immune processes: A review // *Int. J. Chem. Biomed. Sci.* 2015. 1. (3). 70–78.
14. Dorninger F., Forss-Petter S., Berger J. From peroxisomal disorders to common neurodegenerative diseases – the role of ether phospholipids in the nervous system // *FEBS Lett.* 2017. 591. (18). 2761–2788.
15. Eisinger K., Krautbauer S., Hebel T. Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes // *Exp. Mol. Pathol.* 2014. 97. 37–43.
16. Ermolenko E.V., Latyshev N.A., Sultanov R.M., Kasyanov S.P. Technological approach of 1-*O*-alkyl-*sn*-glycerols separation from *Berryteuthis magister* squid liver oil // *J. Food Sci. Technol.* 2016. 53. 1722–1726.
17. Grainge C.L., Davies D.E. Epithelial injury and repair in airways diseases // *Chest.* 2013. 144. 1906–1912.
18. Honsho M., Abe Y., Fujiki Y. Dysregulation of Plasmalogen Homeostasis Impairs Cholesterol Biosynthesis // *J. Biol. Chem.* 2015. 290. (48). 28822–28833.
19. Honsho M., Fujiki Y. Plasmalogen homeostasis – regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals // *FEBS Lett.* 2017. 591. (18). 2720–2729.
20. Huang F., Del-Río-Navarro B.E., Torres-Alcántara S., Pérez-Ontiveros J.A., Ruiz-Bedolla E., Saucedo-Ramírez O.J., Villafañá S., Sánchez Muñoz F., Bravo G., Hong E. Adipokines, asymmetrical dimethylarginine, and pulmonary function in adolescents with asthma and obesity // *J. Asthma.* 2017. 54. (2). 153–161.
21. Jang J.E., Park H.-S., Yoo H.J. Protective role of endogenous plasmalogens against hepatic steatosis and steatohepatitis // *Hepatology.* 2017. 66. (2). 416–431.
22. Kullenberg D., Taylor L.A., Schneider M., Massing U. Health effects of dietary phospholipids // *Lipids Health Dis.* 2012. 11. 3.
23. Kyle T.K., Dhurandhar E.J., Allison D.B. Regarding obesity as a disease: Evolving policies and their implications // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2016. 45. (3). 511–520.
24. Lankinen M., Schwab U., Kolehmainen M. A healthy nordic diet alters the plasma lipidomic profile in adults with features of metabolic syndrome in a multicenter randomized dietary intervention // *J. Nutr.* 2016. 146. 662–672.
25. Li X., Baumgart E., Dong G.X., Morrell J.C., Jimenez-Sanchez G., Valle D. PEX11alpha is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated peroxisome proliferation // *Mol. Cell Biol.* 2002. 22. 8226–8240.
26. Magnusson C.D., Haraldsson G.G. Ether lipids // *Chem. Phys. Lipids.* 2011. 164. 315–340.
27. Mangold H., Paltauf F. Ether lipids: biochemical and biomedical aspects. N.Y.: Academic Press, 1983. 456.
28. Moser A.B., Steinberg S.J., Watkins P.A., Moser H.W., Ramaswamy K., Siegmund K.D., Lee D.R., Ely J.J., Ryder O.A., Hacia J.G. Human and great ape red blood cells differ in plasmalogen levels and composition // *Lipids Health Dis.* 2011. 10. 101.
29. Messias M.S.F., Mecatti G.C., Priolli D.G., Carvalho P.O. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer // *Lipids Health Dis.* 2018. 17. 41.
30. Nakamura Y., Shimizu Y., Horibata Y., Tei R., Koike R., Masawa M., Watanabe T., Shiobara T., Arai R., Chibana K., Takemasa A., Sugimoto H., Ishii Y. Changes of plasmalogen phospholipid levels during differentiation of induced pluripotent stem cells 409B2 to endothelial phenotype cells // *Sci. Rep.* 2017. 7. 9377.
31. Novgorodtseva T.P., Denisenko Y.K., Antonnyuk M.V., Knysheva V.V., Zhukova N.V., Gvozdenko T.A. Modification of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases // *Lipids Health Dis.* 2013. 12. 117.
32. Pedrono F., Khan N.A., Legrand A.B. Regulation of calcium signalling by 1-*O*-alkylglycerols in human Jurkat T lymphocytes // *Life Sci.* 2004. 74. 22. 2793–2801.
33. Pietiläinen K.H., Róg T., Seppänen-Laakso T. Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans // *PLoS Biol.* 2011. 9.
34. Pickens C.A., Vazquez A.I., Jones A.D., Fenton J.I. Obesity, adipokines, and C-peptide are associated with distinct plasma phospholipid profiles in adult males, an untargeted lipidomic approach // *Sci. Rep.* 2017. 7. 6335.
35. Pinnock H., Thomas M., Tsiligianni I., Lisspers K., Østrem A., Stållberg B., Yusuf O., Ryan D., Buffels J., Cals J.W., Chavannes N.H., Henrichsen S.H., Langhammer A., Latysheva E., Lionis C., Litt J., van der Molen T., Zwar N., Williams S. The International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Research Needs Statement 2010 // *Prim. Care Respir. J.* 2010. 19. (1). 1–20.
36. Profita M., Sala A., Riccobono L., Paternò A., Mirabella A., Bonanno A., Guerrera D., Pace E., Bonsignore G., Bousquet J. 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000. 105. 711–716.

37. Puri P., Wiest M.M., Cheung O. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis // *Hepatology*. 2009. 50. 1827–1838.
38. Rog T., Koivuniemi A. The biophysical properties of ethanolamine plasmalogens revealed by atomistic molecular dynamics simulations // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. 1858. 97–103.
39. Santamaria F., Montella S., Greco L., Valerio G., Franzese A., Maniscalco M., Fiorentino G., Peroni D., Pietrobelli A., De Stefano S., Sperli F., Boner A.L. Obesity duration is associated to pulmonary function impairment in obese subjects // *Obesity*. 2011. 8. 1623–8.
40. Yamazaki Y. The proportion of nervonic acid in serum lipids is associated with serum plasmalogen levels and metabolic syndrome // *J. Oleo Sci.* 2014. 63. 527–537.
41. Van Schayck O.C. Global strategies for reducing the burden from asthma // *Prim. Care Respir. J.* 2013. 22. (2). 239–243.
42. Van Diepen J.A., Berbee J.F., Havekes L.M., Rensen P.C. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis // *Atherosclerosis*. 2013. 228. 306–315.
43. Wallner S., Schmitz G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species // *Chem. Phys. Lipids*. 2011. 164. 573–589.
44. Wang M., Wang C., Han R.H., Han X. Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine // *Prog. Lipid Res.* 2016. 61. 83–108.
45. Wynalda K.M., Murphy R.C. Low concentration ozone reacts with plasmalogen glycerophosphoethanolamine lipids in lung surfactant // *Chem. Res. Toxicol.* 2010. 23. (1). 108–117.
46. Zemski Berry K.A., Murphy R.C., Kosmider B., Mason R.J. Lipidomic characterization and localization of phospholipids in the human lung // *J. Lipid Res.* 2017. 58. (5). 926–933.
47. Zoeller R.A., Grazia T.J., LaCamera P., Park J., Gaposchkin D.P., Farber, H.W. Increasing plasmalogen levels protects human endothelial cells during hypoxia // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. 283. 671–679.

PROSPECTS FOR THE USE OF NATURAL ALKYL-GLYCEROLS IN TARGETED THERAPY OF BRONCHIAL ASTHMA ASSOCIATED WITH OBESITY (REVIEW)

**Tat'yana Pavlovna NOVGORODTSEVA¹, Oksana Yur'yevna KYTIKOVA¹,
Tat'yana Aleksandrovna GVOZDENKO¹, Marina Vladimirovna ANTONYUK^{1,2}**

¹ *Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology of Respiration –
Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment
690105, Vladivostok, Russkaya str., 73-g*

² *Far Eastern Federal University
690091, Vladivostok, Sukhanov str., 8*

There are relevant areas of research aimed at studying the mechanisms of development and optimization of therapeutic approaches to hard controllable phenotypes of bronchial asthma in the disease prevention and treatment. This is the phenotype of bronchial asthma associated with obesity. The central function in the lungs physiology and pathology as well as in the obesity etiopathogenesis is assigned to lipids, which play a crucial role in maintaining the cell energy balance and the implementation of intracellular and intercellular signalization. Detailization of the role of alkyl-glycerols structure metabolites in the mechanisms of formation of the bronchial asthma phenotype in combination with obesity is an important area of modern research. In the analysis of modern studies on this problem, the strategy of treatment of bronchial asthma associated with obesity based on the General mechanisms of metabolic and signal disorders in these diseases was identified and justified. In recent years, due to the discovery of the relationship of disorders in the biosynthesis of diacyl and alk(en)yl acyl phospholipids with respiratory diseases and obesity, there is a growing interest in their study as promising therapeutic targets. The introduction of anti-inflammatory natural compounds, which include alkyl-glycerols contained in marine hydrobionts, will modify the intracellular signaling pathways responsible for inflammatory cell activation in bronchial asthma associated with obesity.

Key words: bronchial asthma, obesity, inflammation, natural alkyl glycerols.

Novgorodtseva T.P. – doctor of biological sciences, professor, chief researcher of the laboratory of biomedical researches, deputy director for science

Kytikova O. Yu. – candidate of medical sciences, researcher of laboratory of rehabilitative treatment

Gvozdenko T.A. – doctor of medical sciences, professor of RAS, chief researcher of the laboratory of rehabilitative treatment

Antonyuk M.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of rehabilitative treatment

ТРАНСКРАНИАЛЬНАЯ МАГНИТОТЕРАПИЯ В РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Евгения Викторовна СЕВОСТЬЯНОВА¹, Юрий Алексеевич НИКОЛАЕВ^{1,2},
Вера Георгиевна ЛУШЕВА¹, Владимир Яковлевич ПОЛЯКОВ¹

¹ *НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

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

Цель исследования – оценка эффективности транскраниальной магнитотерапии в реабилитации больных артериальной гипертензией (АГ), сочетанной с хроническими цереброваскулярными заболеваниями (ХЦВЗ). **Материал и методы.** Обследовано и пролечено 50 пациентов с АГ, сочетанной с ХЦВЗ, в возрасте от 20 до 75 лет ($62,1 \pm 2,0$ года). Клиническое обследование включало в себя сбор жалоб и анамнеза жизни, клинико-лабораторные и инструментальные методы обследования, оценку показателей качества жизни, связанного со здоровьем (по опроснику SF-36). Все пациенты были рандомизированы на две группы, сопоставимые по возрасту, полу, клинико-функциональным показателям: основную ($n = 24$) и контрольную ($n = 26$). Больные контрольной группы получали базисную медикаментозную терапию в течение двух недель, пациенты основной группы – на фоне базисной медикаментозной терапии транскраниальную магнитотерапию (курс из 10 процедур). Контроль эффективности реабилитации проводили до и после проведенного курса по динамике гемодинамических и клинических параметров, показателей качества жизни. **Результаты.** У больных основной группы, в сравнении с контрольной группой, отмечалась положительная динамика со снижением артериального давления, частоты характерных клинических симптомов и улучшением показателей качества жизни после курса воздействий. Так, пульсовое артериальное давление уменьшилось в основной группе на 24,7 %, в контрольной группе на 18,7 %, частота головокружений – на 45,9 и 23,1 % соответственно ($p < 0,05$). **Заключение.** Показана эффективность транскраниальной магнитотерапии в восстановительном лечении больных АГ, сочетанной с ХЦВЗ, что позволяет рекомендовать этот физиотерапевтический метод для персонифицированной немедикаментозной реабилитации данной категории больных в условиях стационара.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, цереброваскулярные заболевания, транскраниальная магнитотерапия.

Артериальная гипертензия (АГ) остается важнейшей проблемой здравоохранения в связи с ее высокой распространенностью, выраженным влиянием на заболеваемость, трудоспособность и смертность населения [2]. Течение заболевания, вопросы лечения и реабилитации больных АГ значительно осложняются при наличии коморбидной патологии [10]. Важнейшим сочетанием нозологий, относящихся к классу болезней сер-

дечно-сосудистой и нервной систем, является коморбидность АГ и хронических цереброваскулярных заболеваний (ХЦВЗ). ХЦВЗ – это группа заболеваний головного мозга, обусловленных патологическими изменениями церебральных сосудов с нарушением мозгового кровообращения [14]. ХЦВЗ являются одной из основных причин смертности и стойкой утраты трудоспособности больных. Смертность от ХЦВЗ в экономически

Севостьянова Е.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории патогенеза соматических заболеваний отдела медико-экологических исследований, e-mail: luck.nsk@rambler.ru

Николаев Ю.А. – д.м.н., главный научный сотрудник, и.о. заместителя директора по научной и лечебной работе, руководитель лаборатории патогенеза соматических заболеваний отдела медико-экологических исследований, e-mail: nicol@centercet.ru

Лушева В.Г. – врач-физиотерапевт высшей квалификационной категории, руководитель отделения реабилитации клиники

Поляков В.Я. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патогенеза соматических заболеваний отдела медико-экологических исследований, e-mail: vpolyakov15@mail.ru

развитых странах достигает 11–12 %, в России показатели одни из самых высоких в мире и прогнозируются к повышению в связи с увеличением продолжительности жизни и старением населения [5]. Основными патогенетическими звеньями ХЦВЗ при АГ являются нарушение тонуса сосудов, морфологические изменения сосудистой стенки в виде гипертрофии, фиброза, склероза, гиалиноза, нарушение церебральной микроциркуляции, ухудшение реологических свойств крови, замедление скорости кровотока, нарушение регуляции системной и церебральной гемодинамики, окислительный стресс. Все это приводит к недостаточности мозгового кровоснабжения и развитию множественных очагов в головном мозге [5].

Тем не менее до настоящего времени лечение и восстановление больных АГ, сочетанной с ХЦВЗ, не в полной мере эффективно. Несмотря на нормализацию гемодинамических параметров, редко удается добиться полного восстановления нарушенных функций организма, в достаточной мере повысить качество жизни пациента. Важным аспектом данной проблемы является и то, что медикаментозные методы лечения и реабилитации имеют ряд ограничений, связанных с побочным действием лекарств, усугубляющим течение сочетанных заболеваний. Повышается значение немедикаментозных физиотерапевтических методов, позволяющих снизить медикаментозную нагрузку, максимально полно восстановить утраченные функции и повысить качество жизни данной категории больных [4]. Одним из наиболее эффективных немедикаментозных методов лечения и реабилитации при АГ является магнитотерапия. Магнитное поле нормализует вегетативное обеспечение сердечно-сосудистой деятельности, модулирует центральную и периферическую гемодинамику, приводит к миотропной вазодилатации и улучшает микроциркуляцию [1].

Транскраниальная магнитотерапия может рассматриваться как частный случай общей магнитотерапии с присущим ей синхронизирующим воздействием по отношению к различным системам организма через регулирующие структуры мозга, в частности гипоталамус [13]. Кроме того, магнитное поле, примененное по транскраниальной методике, обладает максимальной проникающей способностью и поэтому непосредственно влияет на ткани мозга. Анализ физиотерапевтических методов, используемых в реабилитологии при изолированной АГ и ряде неврологических заболеваний, выявил благоприятные эффекты применения транскраниальной магнитотерапии [7, 11, 16, 18, 19]. Однако особенности и эффек-

тивность применения данного метода в реабилитации больных АГ, сочетанной с ХЦВЗ, в достаточной мере не определены.

Цель исследования – оценка эффективности транскраниальной магнитотерапии в реабилитации больных артериальной гипертензией, сочетанной с хроническими цереброваскулярными заболеваниями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили по разработанному и утвержденному протоколу клинического исследования. На базе клиники ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины осуществили обследование и лечение 50 пациентов, жителей Новосибирска и Новосибирской области, северных регионов с АГ 1-2 степени, 1-2 стадии, сочетанной с ХЦВЗ. Обследованные были в возрасте 20–75 лет ($62,1 \pm 2,0$ года), мужчины ($n = 23$) и женщины ($n = 27$). Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании, которое соответствовало этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека».

Пациентам проводили комплексное клиническое, лабораторное и инструментальное обследование (тонометрия, электрокардиография, общеклинические и биохимические анализы крови и мочи, рентгенография, реоэнцефалография, офтальмоскопия, ультразвуковое исследование), выполняли анализ медико-статистической документации. Все больные заполняли опросник оценки основных клинических симптомов при АГ и ХЦВЗ. К комплексу клинических симптомов, характеризующих АГ, относили головные боли, головокружение, сердцебиение, перебои в работе сердца, боли в прекардиальной области. К клиническим симптомам, характеризующим ХЦВЗ, относили головные боли, головокружение, шум в голове, ухудшение памяти, снижение умственной работоспособности, ухудшение внимания, общую слабость, повышенную утомляемость, эмоциональную лабильность, нарушение сна, неустойчивость при ходьбе. Анализ выраженности каждого из перечисленных клинических симптомов проводили по 10-балльной валидизированной визуальной аналоговой шкале (ВАШ) (от 0 – нет нарушений, до 10 – грубые нарушения).

Оценку показателей качества жизни, связанного со здоровьем, проводили с применением валидизированного опросника MOS-SF-36. Индекс коморбидности определяли с применением валидизированного опросника CIRS.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием лицензионного пакета статистических программ STATISTICA v. 7.0. Проведен однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Для анализа различий между повторными наблюдениями, в случае нормального распределения, использовали t-критерий Стьюдента для парных выборок; если распределение отличалось от нормального – критерий Вилкоксона для парных выборок. Для сравнения частот применяли критерий Вилкоксона и критерий χ^2 . Для сравнительного анализа различий абсолютных значений между двумя группами в случае нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, если распределение отличалось от нормального – критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Методом фиксированной рандомизации сформированы две группы: основная ($n = 24$, средний возраст $59,1 \pm 2,0$ года) и контрольная ($n = 26$, средний возраст $63,0 \pm 1,5$ года). Группы были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела, индексу коморбидности CIRS, клинико-функциональным характеристикам, базисной медикаментозной терапии. Лица контрольной группы получали базисную медикаментозную терапию (ингибиторы АТФ, антагонисты Са, блокаторы рецепторов ангиотензина II, бета-блокаторы, диуретики). Пациенты основной группы на фоне базисной медикаментозной терапии получали транскраниальную магнитотерапию, которую проводили с помощью аппарата «Полимаг-02» («Еламед», Россия) с приставкой «Оголовье», излучатели – ОГИ, 2 ЛИГ. Излучатели размещали: ОГИ – на голову, ЛИГ – на голени. Параметры воздействия были следующими. ОГИ: режим воздействия – реверсивный, время реверса – 2–5 с, тип магнитного поля – реверсивное, индукция – 2 мТл, частота – 100 Гц. ЛИГ: режим воз-

действия – реверсивный, время реверса – 2–5 с, тип магнитного поля – бегущее снизу вверх, индукция – 2 мТл, частота – 100 Гц. Время воздействия – 15–20 мин. Курс магнитотерапии составил 12 процедур.

Проводили сравнительную оценку эффективности терапии до и после проведенного курса лечебно-реабилитационных мероприятий по динамике гемодинамических, клинико-функциональных параметров, показателей качества жизни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ гемодинамических показателей до и после курса лечебно-реабилитационных воздействий выявил статистически значимое снижение систолического, диастолического и пульсового артериального давления (АД) с достижением целевых уровней АД как в основной, так и в контрольной группе, но более выраженное в основной группе (табл. 1). Систолическое АД уменьшилось в основной группе на 17,6 %, в контрольной группе – на 11,4 %, диастолическое АД – на 12,8 и 6,6 %, пульсовое АД – на 24,7 и 18,7 %, частота сердечных сокращений – на 10,5 и 4,8 % соответственно. Таким образом, у больных основной группы после проведения курса реабилитации транскраниальной магнитотерапией на фоне базисной медикаментозной терапии отмечалось более выраженное улучшение гемодинамических показателей, чем у больных в контрольной группе, получавших только базисную медикаментозную терапию.

Проведен анализ основных клинических симптомов, характеризующих наличие и выраженность сочетанных заболеваний: АГ и ХЦВЗ. До начала курса лечебно-реабилитационных воздействий статистически значимые различия частоты встречаемости головных болей, одного из основных клинических симптомов данных сочетанных

Таблица 1

Гемодинамические показатели до и после курса лечебно-реабилитационных воздействий, $M \pm m$

Показатель	Группа	До курса	После курса	p
Систолическое АД, мм рт. ст.	Основная	$153,05 \pm 4,59$	$126,11 \pm 2,41$	0,000004
	Контрольная	$145,0 \pm 2,7$	$128,3 \pm 1,5$	0,000009
Диастолическое АД, мм рт. ст.	Основная	$91,11 \pm 1,59$	$79,44 \pm 0,55$	0,000002
	Контрольная	$86,20 \pm 1,38$	$80,50 \pm 0,88$	0,0006
Пульсовое АД, мм рт. ст.	Основная	$61,94 \pm 3,45$	$46,67 \pm 2,32$	0,000008
	Контрольная	$58,80 \pm 2,06$	$47,80 \pm 1,47$	0,000008
Частота сердечных сокращений, мин	Основная	$76,11 \pm 2,92$	$68,11 \pm 1,01$	0,01
	Контрольная	$69,30 \pm 1,48$	$65,95 \pm 0,96$	0,01

Примечание. p – значимость различий по t-критерию Стьюдента

Таблица 2

Частота встречаемости клинических проявлений (симптомов) АГ и ХЦВЗ до и после курса лечебно-реабилитационных воздействий, n (%)

Показатель	Группа	До курса	После курса	p
Головные боли	Основная	14 (58,3)	5 (20,8)	0,007
	Контрольная	13 (50)	12 (46,1)	0,68
Головокружение	Основная	16 (66,7)	5 (20,8)	0,007
	Контрольная	17 (65,4)	11 (42,3)	0,02
Шум в голове	Основная	5 (20,8)	3 (12,5)	0,10
	Контрольная	12 (46,2)	7 (26,9)	0,04
Ухудшение памяти	Основная	7 (29,2)	3 (12,5)	0,06
	Контрольная	11 (42,3)	8 (30,8)	0,22
Снижение умственной работоспособности	Основная	5 (20,8)	3 (12,5)	0,10
	Контрольная	12 (46,1)	8 (30,8)	0,06
Ухудшение внимания	Основная	5 (20,8)	3 (12,5)	0,10
	Контрольная	11 (42,3)	9 (34,6)	–
Общая слабость, утомляемость	Основная	11 (45,8)	4 (16,7)	0,04
	Контрольная	14 (53,8)	10 (38,5)	0,06
Эмоциональная лабильность	Основная	5 (20,8)	2 (8,3)	0,10
	Контрольная	6 (23,1)	6 (23,1)	–
Нарушение сна	Основная	6 (25)	4 (16,7)	0,20
	Контрольная	7 (26,9)	7 (26,9)	–
Неустойчивость при ходьбе	Основная	3 (12,5)	2 (8,3)	0,26
	Контрольная	9 (34,6)	8 (30,8)	0,26

Примечание. p – значимость различий по критерию Вилкоксона.

заболеваний, у больных основной и контрольной группы отсутствовали (табл. 2). После курса воздействий в основной группе выявлено статистически значимое снижение частоты встречаемости головных болей на 37,5 % (см. табл. 2). В контрольной группе изменений не обнаружено, и после курса лечебно-реабилитационных воздействий по данному показателю группы статистически значимо различались. До начала курса статистически значимые различия частоты встречаемости головокружений, важного клинического симптома при сочетании АГ и ХЦВЗ, у больных основной и контрольной группы отсутствовали (см. табл. 2); после проведенного курса она статистически значимо снизилась в основной группе на 45,9 %, в контрольной группе на 23,1 %. Частота встречаемости общей слабости, повышенной утомляемости после проведенного курса статистически значимо снизилась в основной группе на 29,1 %, в контрольной группе не изменилась. Таким образом, сравнительный анализ частоты встречаемости основных клинических симптомов сочетанных заболеваний до и после курса лечебно-реабилитационных воздействий выявил более выраженную, статистически

значимую положительную динамику в основной группе в сравнении с контрольной.

Оценка качества жизни, связанного со здоровьем, является общепринятым в международной практике высокоинформативным, чувствительным и экономичным методом оценки состояния здоровья человека. Сравнительный анализ показателей качества жизни, проведенный до и после курса, выявил различия в динамике показателей в основной и контрольной группах (табл. 3). После курса лечебно-реабилитационных воздействий в основной группе отмечалось статистически значимое повышение показателей по шкалам: физического функционирования – на 21,5 %; общего здоровья – на 54,9 %, жизненной активности – на 8,2 %. В контрольной группе эти показатели статистически значимо не изменились. Интегральный показатель физического компонента здоровья повысился после курса в основной группе на 26,2 %. в контрольной группе – на 21,8 %. Интегральный показатель психического компонента здоровья повысился после курса в основной группе на 14,7 %, в контрольной группе этот показатель статистически значимо не изменился.

Таблица 3

Динамика показателей качества жизни, связанного со здоровьем (по опроснику SF-36) до и после курса лечебно-реабилитационных воздействий, $M \pm t$

Показатель	Группа	До курса	После курса	<i>p</i>
Физическое функционирование, балл	Основная	58,7 ± 4,5	71,3 ± 4,1	0,01
	Контрольная	70,0 ± 5,5	71,2 ± 5,2	0,48
Ролевое функционирование, балл	Основная	43,7 ± 9,5	62,5 ± 10,7	0,10
	Контрольная	28,1 ± 9,9	50,0 ± 10,7	0,02
Интенсивность боли, балл	Основная	38,5 ± 1,1	41,0 ± 1,8	0,06
	Контрольная	54,1 ± 6,7	69,0 ± 6,0	0,02
Общее состояние здоровья, балл	Основная	36,6 ± 2,8	56,7 ± 5,1	0,04
	Контрольная	55,1 ± 4,6	62,3 ± 4,0	0,07
Жизненная активность, балл	Основная	45,0 ± 2,4	48,7 ± 3,3	0,01
	Контрольная	52,5 ± 3,1	56,8 ± 3,9	0,26
Социальное функционирование, балл	Основная	58,3 ± 9,4	66,7 ± 7,1	0,06
	Контрольная	60,9 ± 4,9	70,3 ± 5,1	0,02
Ролевое эмоционально обусловленное функционирование, балл	Основная	58,3 ± 11,2	83,3 ± 7,4	0,06
	Контрольная	33,3 ± 10,0	44,4 ± 9,4	0,06
Психическое здоровье, балл	Основная	61,3 ± 6,4	61,3 ± 5,7	–
	Контрольная	51,0 ± 3,6	60,0 ± 3,3	0,11
Физический компонент здоровья, балл	Основная	45,8 ± 1,9	57,8 ± 4,5	0,01
	Контрольная	51,8 ± 5,1	63,1 ± 5,8	0,004
Психический компонент здоровья, балл	Основная	58,3 ± 5,2	66,9 ± 2,4	0,02
	Контрольная	49,1 ± 4,2	59,2 ± 4,3	0,09
Качество жизни, балл	Основная	52,0 ± 3,1	62,3 ± 2,9	0,02
	Контрольная	50,4 ± 4,3	61,2 ± 4,9	0,01

Примечание. *p* – значимость различий по критерию Вилкоксона.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании установлен значимый гипотензивный эффект транскраниальной магнитотерапии у больных АГ, сочетанной с ХЦВЗ, сопровождающийся урежением частоты сердечных сокращений, что согласуется и с работами других исследователей, в которых показано, что магнитное поле в бегущем варианте при транскраниальной методике использования улучшает микроциркуляцию и проявляет гипотензивную активность [6, 7]. Выявленный гипотензивный эффект комплексного применения транскраниальной магнитотерапии может быть реализован через различные механизмы, описанные в литературе: центральный симпатолитический эффект, седативное действие [7], влияние на депрессорную зону сосудодвигательного центра продолговатого мозга [8], влияние на нейроэндокринную сеть со снижением выработки кортизола [15], вегетостабилизирующее действие с нормализующим влиянием на симпатическую и парасимпатическую нервную систему [7, 9, 12, 18, 20], уменьшение адренергической сосудистой гипер-

реактивности [7], прямое вазодилатирующее действие, снижение общего периферического сопротивления сосудов [7].

В данном исследовании обнаружено также улучшение клинических показателей в результате применения транскраниальной магнитотерапии, указывающие на уменьшение цефалгического, церебрастенического, вестибулярного, атаксического синдромов, улучшение когнитивной и координаторной функций. Выявленные благоприятные клинические эффекты применения транскраниальной магнитотерапии при АГ, осложненной ХЦВЗ, могут быть обусловлены присущими данному методу нейрофизиологическими эффектами, изложенными в литературе. Так, в предыдущих исследованиях установлено, что импульсное магнитное поле оказывает модулирующее влияние на активность нейронов, обладает регенерирующим нейропластическим действием в отношении нервной ткани [3, 17]. Однако ранее не проводилось изучение влияния данного метода реабилитации на показатели качества жизни таких больных, что было проанализировано в данной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, комплекс полученных данных указывает на эффективность применения транскраниальной магнитотерапии в реабилитации больных АГ, сочетанной с ХЦВЗ, направленной на основные патогенетические звенья данной патологии, и позволяет рекомендовать этот физиотерапевтический метод лечения для персонифицированной немедикаментозной реабилитации данной категории больных в условиях стационара.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамович С.Г., Куликов А.Г., Долбилкин А.Ю.* Общая магнитотерапия при артериальной гипертензии // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2014. (5). 50–55.
2. *Бойцов С.А., Баланова Ю.А., Шальнова С.А. и др.* Артериальная гипертензия среди лиц 25–64 лет: распространенность, осведомленность, лечение и контроль. По материалам исследования ЭССЕ // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. 2014. 13. (4). 4–14.
3. *Болотова Н.В., Райгородская Н.Ю., Храмов В.В.* Возможности магнитотерапии при лечении больных ожирением с использованием аппаратного комплекса «АМО-АТОС» – «ОГОЛОВЬЕ» // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. 2006. (2). 24–27.
4. *Гурленя А.М., Багель Г.Е., Смычек В.Б.* Физиотерапия в неврологии. М.: Мед. литература, 2016. 304 с.
5. *Дадашева М.Н., Подрезова Л.А., Шучалин О.Г., Вишнякова Т.И., Рашидова Э.Ш., Смирнова Л.А., Агафонов Б.В., Шевцова Н.Н.* Алгоритм терапии дисциркуляторной энцефалопатии у больных с артериальной гипертензией в общей врачебной практике // Рус. мед. журн. 2009. 17. (20). 1320–1324.
6. *Лукиянов В.Ф., Головачева Т.В.* Особенности влияния динамической магнитотерапии на микроциркуляцию при артериальной гипертензии // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. 2008. (2). 17–19.
7. *Нагорнев С.Н., Фролков В.К., Кулиш А.В., Гуревич К.Г., Пузырева Г.А., Самсонова О.С.* Механизм реализации гипотензивного действия транскраниальной магнитотерапии в комплексном лечении больных артериальной гипертензией // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». 2017. (1). 5–11.
8. *Орехова Э.М., Кончугова Т.В., Кульчицкая Д.Б., Корчажкина Н.Б., Егорова Л.А., Чуич Н.Г.* Современные подходы к применению трансцеребральной магнитотерапии при артериальной гипертензии // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. 2016. (3). 53–55.
9. *Райгородский Ю.М., Пономаренко Г.Н., Болотова Н.В., Череващенко Л.А.* Транскраниальная физиотерапия при синдроме хронической усталости // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2015. (3). 19–22.
10. *Севостьянова Е.В., Николаев Ю.А., Богданкевич Н.В., Лушева В.Г., Маркова Е.Н., Долгова Н.А.* Немедикаментозная реабилитация больных хронической обструктивной болезнью легких с артериальной гипертензией // Терапевт. арх. 2016. 88. (8). 19–24.
11. *Сидякина И.В., Добрушина О.Р., Лядов К.В., Шаповаленко Т.В., Ромашич О.В.* Доказательная медицина в нейрореабилитации: инновационные технологии (обзор) // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. 2015. (3). 53–56.
12. *Староверов А.Т., Жуков О.Б., Райгородский Ю.М.* Эффективность транскраниальной магнитотерапии в комплексном лечении алкогольного абстинентного синдрома // Журн. неврологии и психиатрии. 2008. (9). 57–61.
13. *Улащик В.С.* Теоретические и практические аспекты общей магнитотерапии // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. 2001. (5). 3–7.
14. *Шавловская О.А.* Нейропротективная терапия цереброваскулярных заболеваний в амбулаторно-поликлинических условиях // Мед. совет. 2013. (2). 70–77.
15. *Baeken C., de Raedt R., Leyman L., Schietecatte J., Kaufman L., Poppe K., Vanderhasselt M.-A., Anckaert E., Bossuyt A.* The impact of one HF-rTMS session on mood and salivary cortisol in treatment resistant unipolar melancholic depressed patients // J. Affect. Disord. 2009. 113. 100–108.
16. *Barwood C.H.S., Murdoch B.E.* rTMS as a treatment for neurogenic communication and swallowing disorders // Acta Neurol. Scand. 2013. 127. 77–91.
17. *Bueno V.F., Brunoni A.R., Boggio P.S., Bensenor I.M., Fregni F.* Mood and cognitive effects of transcranial direct current stimulation in post-stroke // Am. J. Phys. Med. Rehabil. 2009. 88 (5). 404–409.
18. *Cogiமானian F., Brunoni A.R., Boggio P.S., Fregni F., Ciocca M., Priori A.* Non-invasive brain stimulation for the management of arterial hypertension // Med. Hypotheses. 2010. 74. (2). 332–336.
19. *Hsu W.-Y., Cheng C.-H., Liao K.-K., Lee I.H., Lin Y.Y.* Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor functions in patients with stroke: a meta-analysis // Stroke. 2012. 43. 1849–1857.
20. *Udupa K., Sathyaprabha T.N., Thirthalli J., Kishore K.R., Raju T.R., Gangadhar B.N.* Modulation of cardiac autonomic functions in patients with major depression treated with repetitive transcranial magnetic stimulation // J. Affect. Disord. 2007. 104. 231–236.

TRANSCRANIAL MAGNETOTHERAPY IN THE REHABILITATION OF PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION COMBINED WITH CHRONIC CEREBROVASCULAR PATHOLOGY

Evgeniya Viktorovna SEVOSTYANOVA¹, Yuriy Alekseevich NIKOLAEV^{1,2},
Vera Georgievna LUSHEVA¹, Vladimir Yakovlevich POLYAKOV¹

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

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

Purpose of the study – to evaluate the effectiveness of transcranial magnetotherapy in the rehabilitation of patients with arterial hypertension (AH) combined with chronic cerebrovascular diseases (CCVD). **Material and methods.** Fifty patients with AH combined with CCVD aged 20 to 75 years, with an average age of 62.1 ± 2.0 years were examined and treated. Clinical examination included: collection of complaints and anamnesis of life, clinical laboratory and instrumental methods of examination, assessment of quality of life related to health (according to the SF-36 questionnaire). All patients were randomized into 2 groups, comparable in age, sex, clinical and functional parameters: experimental ($n = 24$) and control ($n = 26$). Patients of the control group received basic medicinal therapy for 2 weeks. Patients of the experimental group, on the background of basic medicinal therapy, received transcranial magnetotherapy. Course of 10 procedures. The effectiveness of rehabilitation was carried out before and after the course on the dynamics of hemodynamic and clinical parameters; indicators of quality of life. **Results.** In patients of the experimental group, in comparison with the control group, there was a more pronounced positive dynamics with a greater reduction in blood pressure, the frequency of characteristic clinical symptoms; a more pronounced improvement in the quality of life after a course of action. Thus, the mean value of pulse blood pressure decreased in the experimental group by 24.7 %, in the control group by 18.7 %. The frequency of occurrence of vertigo after the course was statistically significantly decreased in the main group by 45.9 %, in the control group by 23.1 %. **Conclusion.** The effectiveness of transcranial magnetotherapy in the rehabilitative treatment of patients with AH combined with CCVD is shown, which makes it possible to recommend this physiotherapeutic method for personified non-medicinal rehabilitation of this category of patients in a hospital.

Key words: arterial hypertension, cerebrovascular diseases, transcranial magnetotherapy.

Sevostyanova E.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of the pathogenesis of somatic diseases, e-mail: luck.nsk@rambler.ru

Nikolaev Yu.A. – doctor of medical sciences, chief scientific researcher, acting deputy director for scientific and medical work, head of the laboratory of the pathogenesis of somatic diseases, e-mail: nicol@centercem.ru

Lusheva V.G. – doctor physiotherapist of the highest qualification category, head of the rehabilitation department

Polyakov V.Ya. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory of the pathogenesis of somatic diseases, e-mail: vpolyakov15@mail.ru

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АБДОМИНАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ У МУЖЧИН ОТКРЫТОЙ ГОРОДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Марина Михайловна КАЮМОВА¹, Екатерина Ивановна ГАКОВА¹,
Татьяна Юрьевна ГОРБУНОВА¹, Михаил Юрьевич АКИМОВ²

¹ Тюменский кардиологический научный центр,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия
625026, г. Тюмень, ул. Мельникайте, 111

² Тюменский индустриальный университет
625000, г. Тюмень, ул. Володарского, 38

Всемирная организация здравоохранения признала избыточную массу тела новой неинфекционной «эпидемией XXI века». К началу века практически во всех странах мира был зарегистрирован рост распространенности избыточной массы тела, при этом более 400 млн взрослого населения страдало ожирением, и предполагается дальнейшее увеличение его распространенности. **Целью исследования** явилось определение процентильного распределения в популяции (уровней) и распространенности абдоминального ожирения по разным критериям оценки у мужчин трудоспособного возраста открытой популяции среднеурбанизированного сибирского города. **Материал и методы.** Одномоментное эпидемиологическое исследование проведено на репрезентативной выборке, сформированной из избирательных списков лиц мужского пола 25–64 лет одного из административных округов г. Тюмени. Для анализа абдоминального ожирения использованы критерии метаболического синдрома Международной федерации диабета (IDF) 2005 г., Национальной образовательной программы США по холестерину (NCEP ATP III) 2004 г., Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) 2009 г. **Результаты и их обсуждение.** По уровням абдоминального типа ожирения в тюменской популяции имел место направленный возрастной тренд с достоверным увеличением окружности талии в каждой последующей возрастной группе. Стандартизованный показатель распространенности абдоминального ожирения в мужской популяции 25–64 лет г. Тюмени составил 42,6 % по критериям IDF, 17,9 % по критериям NCEP ATP III, 38,8 % по критериям ВНОК. По всем критериям установлена положительная связь с возрастом в младших и старших возрастных категориях. Результаты настоящего исследования могут служить научной базой и отправной точкой для формирования комплексных профилактических программ среди мужчин трудоспособного возраста в г. Тюмени и других урбанизированных российских городах.

Ключевые слова: абдоминальное ожирение, эпидемиологическое исследование, мужская популяция.

Всемирная организация здравоохранения признала избыточную массу тела новой неинфекционной «эпидемией XXI века». К началу века практически во всех странах мира был зарегистрирован рост ее распространенности, при этом более 400 млн взрослого населения страдало ожирением, и предполагается дальнейшее увеличение его распространенности. Численность людей, страдающих ожирением, прогрессивно увеличивается каждые 10 лет на 10 % [16]. Для развития сердечно-сосудистых заболеваний большое значение имеет характер распределения

жировой ткани. Наиболее опасным является абдоминальный тип ожирения с избыточной локализацией жировой ткани в области живота, отражающей висцеральное накопление жира. Одним из важных аргументов в пользу необходимости изучения абдоминального ожирения (АО) при сердечно-сосудистой патологии служит его атерогенный потенциал. Висцеральные адипоциты имеют высокую плотность β -адренорецепторов, рецепторов к кортикостероидам, андрогенам и обладают низкой плотностью α_2 -адренорецепторов и рецепторов к инсулину, что определяет высо-

Каюмова М.М. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории эпидемиологии и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, e-mail: m_kayutova@mail.ru

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

Горбунова Т.Ю. – к.м.н., врач-кардиолог, e-mail: gorbunova@cardio.tmn.ru

Акимов М.Ю. – к.т.н., доцент кафедры ЭАТ, 38, e-mail: akimov1307@mail.ru

кую чувствительность висцеральной жировой ткани к липолитическому действию катехоламинов и низкую – к антилиполитическому действию инсулина [6, 15].

Ожирение характеризуется полигенной предрасположенностью, которая сама по себе довольно редко вызывает проявление заболевания, если не присутствуют определенные внешние факторы, связанные с современной жизнью. В настоящее время в литературе вопрос о том, какие из факторов особенно важны для развития ожирения, является дискуссионным, причем интересы исследователей сосредоточены на психосоциальном и пищевом факторах [2, 5, 8]. При ожирении имеет место и структурная адаптация сердечно-сосудистой системы, которая происходит под влиянием продолжительных нагрузок и нейроэндокринных трофических воздействий [12]. Безусловно, индивидуально варьирующиеся взаимодействия этих факторов часто усугубляются такими «неадаптивными» средствами устранения и смягчения эмоционального сдвига, как злоупотребление алкоголем, употребление наркотиков и курение, к чему добавляется связанное со стрессом переживание вместе с недостатком физических упражнений [1, 4, 9].

Целью исследования явилось определение процентильного распределения в популяции (уровней) и распространенности абдоминального ожирения по разным критериям оценки у мужчин трудоспособного возраста открытой популяции среднеурбанизированного сибирского города.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения одномоментного эпидемиологического исследования на открытой городской популяции методом «случайных чисел» была сформирована репрезентативная выборка населения из избирательных списков Центрального административного округа г. Тюмени среди лиц мужского пола в возрасте 25–64 лет. Выборка включала 1000 человек, четыре возрастные категории по десятилетиям жизни (25–34, 35–44, 45–54, 55–64 лет). Отклик на скринирующее обследование (кардиологический скрининг) составил 85,0 %. Факторами включения в популяционную выборку были: мужской пол, возраст 25–64 лет, проживание на территории Центрального административного округа г. Тюмени; данные о беженцах, студентах и заключенных (устанавливалось со слов обследуемого) не включались в аналитический массив. Каждому жителю, включенному в популяционную выборку, было отправлено приглашение принять участие в скрининге. Привлечение населения к участию в скрининге при

отсутствии отклика на первое приглашение осуществлялось отсылкой трех писем-напоминаний с интервалом 7–10 дней или попыткой телефонного либо личного контакта с потенциальными участниками. Протокол исследования получил одобрение локального этического комитета.

Окружность талии (ОТ) измеряли сантиметровой лентой, которую накладывали горизонтально посередине между нижним краем реберной дуги и крестцовым отделом подвздошной кости. Для анализа АО использовали следующие критерии метаболического синдрома. Национальная образовательная программы США по холестерину, рекомендации по лечению взрослых – III (NCEP ATR III) 2004 г.: ОТ > 102 см для мужчин; Международная федерация диабета (IDF) 2005 г.: ОТ ≥ 94 см для мужчин европейской расы; Всероссийское научное общество кардиологов (ВНОК) 2009 г.: ОТ > 94 см для мужчин.

Для проверки статистической значимости различий между группами использовали критерий χ^2 Пирсона, достоверность различий показателей была принята при уровне значимости $p \leq 0,05$. Распределение в популяции количественных показателей определяли с помощью процентильного анализа, который проводили отдельно в возрастных категориях 25–34, 35–44, 45–54, 55–64 лет, а также для объединенного массива 25–64 лет. Различия в динамике оценивали по парному t -критерию и дисперсионному анализу повторных измерений, достоверными считали различия показателей при уровне значимости $p < 0,05$. Для проведения корректного сравнительного анализа с данными других эпидемиологических исследований проведена стандартизация показателей по возрасту с использованием прямого метода стандартизации. При обработке полученных данных для стандартизации показателей использовали возрастную структуру городского населения страны в диапазоне 25–64 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ показал нормальное распределение показателей величины ОТ у мужчин 25–64 лет. Характер распределения ОТ подтверждался результатами теста ($p > 0,05$). Так, была проведена проверка соответствия распределения результатов измерений в каждом опыте эксперимента закону нормального распределения, осуществлявшаяся с помощью анализа стандартизованных показателей асимметрии и эксцесса, значения которых должны находиться в интервале от $-2,0$ до $+2,0$, а также по критериям Пирсона и Колмогорова – Смирнова.

Таблица 1

Выраженность абдоминального типа ожирения в мужской популяции 25–64 лет, ОТ, см

Возраст, лет	ОТ						
	M	m	Процентиль				
			10	25	50	75	90
25–34	87,1	9,9	74	79	87	93	100
35–44	92,5***	9,7	80	86	92	99	106
45–54	95,4**	9,2	85	89	94	102	108
55–64	97,2*	9,2	88	91	97	104	112
25–64	93,4	10,1	80	86	93	101	107
СП	92,0						

Примечание. M – среднее арифметическое значение; m – ошибка среднего. Здесь и в табл. 2 СП – стандартизованный показатель средней величины ОТ; обозначены статистически значимые отличия от величины показателя предыдущей возрастной группы: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$.

Таблица 2

Распространенность абдоминального ожирения в мужской популяции 25–64 лет по критериям NCEP ATR III, ВНОК и IDF, ОТ, см

Критерии	25–34 лет	35–44 лет	45–54 лет	55–64 лет	25–64 лет	СП
NCEP ATR III	7,9***	16,7##	24,5#	27,4*	19,7	17,9
ВНОК	21,4***	37,7###	49,5*#	54,4***	41,7	38,8
IDF	24,8***	40,3##	53,4*##	60,9***	45,9	42,6

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величины показателя общей популяции: # – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$, ### – при $p < 0,001$.

Крайние децили распределения по ОТ составили 80 и 107 см, стандартизованные показатели процентильного распределения – 80,4–105,4 см, стандартизованный показатель средней величины ОТ в мужской популяции 25–64 лет – 92,0 см. Средние значения ОТ были положительно связаны с возрастом. Данные процентильного распределения ОТ у мужчин во всех возрастных группах повторяли динамику средних величин. Величина ОТ достоверно нарастала с возрастом, соответственно увеличиваясь за анализируемый возрастной период в 1,1 раза (табл. 1).

Анализ результатов распространенности АО в возрастном диапазоне по критериям IDF, NCEP ATR и ВНОК показал формирование последовательного возрастного тренда в трех возрастных категориях. Так, по критериям IDF показатель достоверно нарастал с увеличением возраста, начиная с младшей возрастной категории, до пятого десятилетия жизни, и увеличился за весь исследуемый возрастной период 25–64 лет в 2,5 раза (табл. 2). По критериям NCEP ATR III и ВНОК также отмечалось достоверное повышение показателя с увеличением возраста, кратность по возрасту роста показателя в диапазоне 25–64 лет составила соответственно 3,5 и 2,5 (см. табл. 2). С общепопуляционным показателем 25–64 лет

значимые различия по критериям IDF и ВНОК отмечались в трех возрастных категориях: в возрастном десятилетии 25–34 лет распространенность АО была достоверно ниже общепопуляционного показателя, в возрастных десятилетиях 45–54 и 55–64 лет – достоверно выше; по критериям NCEP ATR III существенные различия с общепопуляционным показателем АО отмечались в крайних возрастных группах 25–34 лет и 55–64 лет (см. табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

По уровням абдоминального типа ожирения в тюменской популяции имел место направленный возрастной тренд увеличения ОТ с достоверным ростом величины показателя в каждой последующей возрастной группе. В целом величина ОТ среди мужчин 25–64 лет составила $93,4 \pm 10,1$ см.

Анализ крупных эпидемиологических исследований, в которых изучали распространенность отдельных компонентов метаболического синдрома по критериям NCEP ATR III, показал, что в Италии, Испании, Финляндии, так же как и в Тюмени, преобладали высокие значения распространенности АО [14]. Анализ выборок из четырех регионов РФ показал, что распространен-

ность АО, по разным критериям метаболического синдрома, среди мужчин 25–74 лет была наиболее распространена в Калининграде и Оренбурге, меньше – в Санкт-Петербурге и Курске [10]. Базовое эпидемиологическое исследование в Тюмени проводилось с середины 90-х годов прошлого века. Частота ожирения, которая определялась по индексу массы тела, в тюменской популяции среди мужчин составила 13,1 %, избыточной массы тела – 54,2 % [3]. Популяционные характеристики индекса массы тела среди мужчин Тюмени оказались наиболее высокими сравнительно с результатами других сопоставимых по возрастным категориям эпидемиологических исследований [11]. Подобная ситуация в Тюмени, вероятно, была обусловлена прежде всего атерогенным характером фактического питания, преимущественно среди мужчин, которое, в свою очередь, было связано с другими неконвенционными факторами риска – низкой информированностью населения о гиперхолестеринемии, а также высокой долей лиц старшего возраста, сомневающих в идеях профилактики здоровья и здорового образа жизни [9].

По данным настоящего исследования, распространенность АО у мужчин 25–64 лет по разным критериям МС варьировала от 17,0 до 42,6 %, т.е. оказалась несколько ниже распространенности избыточной массы тела в популяции, но значительно выше частоты выявления ожирения без учета его локализации.

Для развития сердечно-сосудистых заболеваний большое значение имеет характер распределения жировой ткани. Наиболее опасен абдоминальный тип ожирения с избыточной локализацией жировой ткани в области живота, отражающей висцеральное накопление жира [7]. Анализ результатов Парижского 20-летнего проспективного исследования показал, что лишь наличие АО сопровождается значимым увеличением кардиоваскулярного риска, сопоставимым с синдромом в целом [13].

Результаты настоящего исследования могут служить научной базой и отправной точкой для формирования комплексных профилактических программ среди мужчин трудоспособного возраста в Тюмени и других урбанизированных российских городах.

ВЫВОДЫ

1. По уровням центрального (абдоминального) типа ожирения в тюменской популяции имел место направленный возрастной тренд увеличения окружности талии с достоверным ростом величины показателя в каждой последующей возрастной группе.

2. Стандартизованный показатель распространенности абдоминального ожирения в мужской популяции 25–64 лет г. Тюмени составил 42,6 % по критериям IDF, 17,9 % по критериям NCEP ATR, 38,8 % по критериям ВНОК; по всем критериям установлена положительная связь с возрастом в младших и старших возрастных категориях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимова Е.В., Акимов А.М., Гакова Е.И., Каюмова М.М., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Поведенческие факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин различного характера труда // Профилакт. медицина. 2016. (3). 49–53.
2. Акимова Е.В., Акимов М.Ю., Гакова Е.И., Каюмова М.М., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Ассоциации высокого уровня враждебности и ишемической болезни сердца в открытой городской популяции среди мужчин 25–64 лет // Терапевт. арх. 2017. (1). 28–31.
3. Акимова Е.В., Гакова Е.И., Каюмов Р.Х., Загородных Е.Ю., Смазнова О.В., Каюмова М.М., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Избыточная масса тела в городской сибирской популяции – двенадцатилетние тренды // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. 2012. (3). 58–62.
4. Акимов А.М., Гакова Е.И., Акимова А.А., Кузнецов В.А. Физическая активность при наличии и отсутствии ишемической болезни сердца в открытой популяции (гендерные различия) // Сиб. науч. мед. журн. 2018. 38. (1). 77–80.
5. Акимова Е.В., Гакова Е.И., Каюмов Р.Х., Смазнов В.Ю., Каюмова М.М., Загородных Е.Ю., Бессонова М.И., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Некоторые компоненты метаболического синдрома у молодых мужчин открытой популяции Тюмени // Сиб. мед. журн. 2011. 26. (2-1). 140–143.
6. Акимова Е.В., Драчева Л.В., Гакова Е.И., Журавлева Т.Д., Олферьев А.М., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Распространенность дислипидемии в открытой популяции Тюмени // Терапевт. арх. 2004. (1). 38–41.
7. Дедов И.И., Мельниченко Г.А. Ожирение. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 146 с.
8. Каюмова М.М., Акимова Е.В., Гафаров В.В., Каюмов Р.Х., Акимов А.М., Кузнецов В.А. Жизненное истощение: взаимосвязь с распространенностью ишемической болезни сердца // Рос. кардиол. журн. 2014. (8). 68–72.

9. Каюмова М.М., Смазнов В.Ю., Акимова Е.В., Гакова Е.И., Смазнова О.В., Горбунова Т.Ю., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Отношение к профилактике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний в открытой мужской популяции Тюмени // Профилактика. медицина. 2012. (4). 13–16.
10. Ротарь О.П., Либис Р.А., Исаева Е.Н., Ерина А.М., Шавшин Д.А., Могучая Е.В., Колесова Е.П., Бояринова М.А., Морошкина Н.В., Яковлева О.И., Солнцев В.Н., Конради А.О., Шляхто Е.В. Распространенность метаболического синдрома в разных городах РФ // Рос. кардиол. журн. 2012. (2). 55–62.
11. Фишман Б.Б., Куприн П.Е., Григорян А.Г., Кондратьев В.А., Куликова Т.В., Стариков П.В., Полякова Е.В., Баров П.А. Характеристика сочетания избыточной массы тела, ожирения и артериальной гипертензии у населения Северо-Запада России // Профилактика. медицина. 2010. (4). 3–8.
12. Фолков Б. Эмоциональный стресс и его значение для развития сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиология. 2007. (10). 4–11.
13. Empena J.P., Ducimetiere P., Balkau B., Jouven X. Contribution of the metabolic syndrome to sudden death risk in asymptomatic men: the Paris Prospective Study I // Eur. Heart J. 2007. 28. 1149–1154.
14. Lorenzo C., Serrano-Rios M., Martinez-Larrad M.T., Gabriel R., Williams K., Gonzalez-Villalpando C., Stern M.P., Hazuda H.P., Haffner S.M. Was the historic contribution of Spain to the Mexican gene pool partially responsible for the higher prevalence of type 2 diabetes in Mexican population? The Spanish Insulin Resistance Study Group, the San Antonio Heart Study, and the Mexico City Diabetes Study // Diabetes Care. 2001. 24. 2059–2064.
15. Piatti P.M., Monty L.D. Forearm insulin-and non-insulin mediated glucose uptake and muscle metabolism in man: role of free fatty acids and blood glucose levels // Metab. Clin. Exp. 1991. 40. 926–933.
16. Serena L., Chin M.C., Deurenberg-Yap M. Review on epidemic of obesity // Ann. Acad. Med. Singapore. 2009. 38. (1). 57–59.

THE PREVALENCE OF ABDOMINAL OBESITY IN MEN OF AN OPEN URBAN POPULATION

Marina Michaylovna KAYUMOVA¹, Ekaterina Ivanovna GAKOVA¹,
Tatyana Yuryevna GORBUNOVA¹, Mikhail Yuryevich AKIMOV²

¹ Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Science, Tomsk, Russia
625026, Tyumen, Melnikayte str., 111

² Tyumen Industrial University
625000, Tyumen, Volodarskogo str., 38

The World Health Organization recognized the overweight as the new non-infectious “epidemic of the XXI century”. By the beginning of the century, almost all countries in the world reported an increase in the prevalence of overweight, with over 400 million adults suffering from obesity and a further increase in its prevalence. **The aim of the study** was to determine the levels and prevalence of abdominal obesity in accordance with different criteria for assessing the able-bodied age of an open population of a medium-urbanized Siberian city in men. **Material and methods.** A one-time epidemiological study was conducted on a representative sample, formed from the electoral lists of male members aged 25–64 years in one of the administrative districts of Tyumen. For the analysis of the abdominal obesity, the criteria of the metabolic syndrome of International Diabetes Federation (IDF, 2005), National Cholesterol Education Program Expert Panel, Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III, 2004), All-Russian Scientific Society of 2009) were used. **Results and discussion.** There was a directed age trend in the waist circumference with a significant increase in the AW levels in each subsequent age group by the levels of the central (abdominal) type of obesity in the Tyumen population. The standardized prevalence rate of abdominal obesity in the male population of 25–64 years in Tyumen was 42.6 % according to the IDF criteria, 17.9 % according to the NCEP ATP III criteria, 38.8 % according to the criteria of the VNOK, positive criteria were established for all criteria with age in the younger and older age categories. The results of this study can serve as a scientific base and starting point for the formation of comprehensive preventive programs among men of working age in Tyumen and other urbanized Russian cities.

Key words: abdominal obesity, epidemiological study, male population.

Kayumova M.M. – candidate of medical sciences, researcher of the laboratory of epidemiology and prevention of cardiovascular; e-mail: m_kayumova@mail.ru

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

Gorbunova T.Yu. – candidate of medical sciences, e-mail: gorbunova@cardio.tmn.ru

Akimov M.Yu. – candidate of technical sciences, docent of the Department of EAT, e-mail: akimov1307@mail.ru

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ИЗОЛЯТОВ *Klebsiella pneumoniae* В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

Ольга Митрофановна ЕГОРОВА, Елена Петровна ИГНАТЬЕВА, Ирина Юрьевна ИСАЕВА,
Галина Валерьевна ФИЛИПОВА, Татьяна Михайловна КЛИМОВА

Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова
677016 г. Якутск, ул. Ойунского, 27

Цель исследования – оценка чувствительности к антибиотикам изолятов *Klebsiella pneumoniae* в Республике Саха (Якутия) по данным базы AMRmap. **Материал и методы.** Для оценки чувствительности изолятов *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам были использованы данные онлайн-платформы AMRmap за 2010–2016 гг. **Результаты и их обсуждение.** Доля изолятов *K. pneumoniae* от числа всех микроорганизмов, выделенных в 2010–2016 гг. при нозокомиальных инфекциях ($n = 195$), составила 35,7 %, при внебольничных инфекциях ($n = 382$) – 30,1 %. Отмечается высокая устойчивость изолятов к распространенным антибиотикам: аминогликозидам (гентамицин, тобрамицин, нетилмицин) – 50–78 %, хлорамфениколу – 36–43 %, цефалоспорином III–V поколения (цефтазидим, цефотаксим, цефепим, цефтаролин) – 83–100 %, препаратам пенициллинового ряда с ингибитором бета-лактамаз (тикарциллин-клавуланат, амоксициллин-клавуланат) – 83–98 %, монобактамам (азтреонам) – 87–95 %, полусинтетическим пенициллинам широкого спектра действия (ампициллин) – 100 %, сульфаниламидам (триметоприм-сульфаметоксазол) – 53–76 %, фторхинолонам (ципрофлоксацин) – 77 %. На настоящий момент в отношении *K. pneumoniae* могут быть эффективны амикацин (чувствительность 96–100 %), цефтазидим-авибактам (95–97 %), тигециклин (97–100 %), карбапенемы (87–97 %) и, в части случаев, фосфомицин (77 %), пиперациллин-тазобактам (64–71 %). **Заключение.** Таким образом, спектр препаратов для лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, крайне ограничен. Дальнейшее распространение резистентности к карбапенемам создает угрозу неэффективности лечения тяжелых инфекций. В этих условиях необходимы меры по ограничению необоснованного использования карбапенемов. Показатели устойчивости *K. pneumoniae* к антибиотикам необходимо учитывать не только для эффективного лечения пациентов, но и для оптимизации расходов регионального здравоохранения, например, при планировании государственных закупок лекарственных препаратов для стационаров.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, нозокомиальные инфекции, внебольничные инфекции, Республика Саха (Якутия), карбапенемы.

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются возбудителями большого числа различных заболеваний человека. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения включила эту группу бактерий в список микроорганизмов, наиболее устойчивых к антибиотикам. Одним из представителей этого семейства является *Klebsiella pneumoniae*, входящая в состав нормальной желудочно-кишечной микрофлоры людей. В связи с высокой вирулентностью *K. pneumoniae* может вызывать как локализованные, так и распространенные инфекции, такие как тяжелые пневмонии, инфекции мочевых путей, раневые

инфекции, септицемию и другие [7, 8]. Механизмы развития устойчивости *K. pneumoniae* к антибиотикам разнообразны и могут быть связаны с мутацией, горизонтальным переносом мобильных генетических элементов (транспозонов или плазмид), носительством генов карбапенемазы [4, 9, 10]. Эти особенности обуславливают устойчивость микроорганизма ко многим антибактериальным препаратам, в том числе пенициллинам широкого спектра действия, ко-тримоксазолу, фторхинолонам и цефалоспорином. На настоящий момент проблема устойчивости возбудителей инфекций к антибактериальным препаратам

Егорова О.М. – старший преподаватель кафедры фармакологии и фармации, e-mail: omit211@mail.ru

Игнатъева Е.П. – старший преподаватель кафедры фармакологии и фармации,
e-mail: ignateva_elen@inbox.ru

Исаева И.Ю. – старший преподаватель кафедры фармакологии и фармации,
e-mail: isaeva_irina_urivna@mail.ru

Филипова Г.В. – доцент кафедры фармакологии и фармации, e-mail: nureeva@yandex.ru

Климова Т.М. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии и фармации, e-mail: biomedyk@mail.ru

приобрела масштабы глобальной угрозы для человечества [6, 8]. Распространенность антибиотикорезистентности существенно различается в разных странах, в том числе и в регионах одной страны. Данные мониторинга антибиотикостойчивости отдельных микроорганизмов могут служить не только для подбора эффективной антимикробной терапии, но и для оптимизации расходов здравоохранения и определения стратегии борьбы с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Целью исследования была оценка чувствительности к антибиотикам изолятов *Klebsiella pneumoniae* в Республике Саха (Якутия) по данным базы AMRmap.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для анализа использована база данных AMRmap, разработанная Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) и НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета [1, 5]. База данных содержит информацию об антибиотикочувствительности клинических изолятов микроорганизмов, выделенных в рамках многоцентровых исследований в 52 городах РФ за период с 1997 по 2016 г. Использование стандартизованных методов и единых критериев определения чувствительности позволяет проводить сопоставительный анализ и оценивать динамику антибиотикорезистентности в регионах-участниках.

В анализ включены данные по чувствительности изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в Республике Саха (Якутия) за период с 2010 по 2016 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Доля изолятов *K. pneumoniae* от числа всех выделенных в 2010–2016 гг. микроорганизмов составила 34 %. При нозокомиальных инфекциях аналогичный показатель составил 35,7 %, при внебольничных инфекциях – 30,1 %. Наиболее часто *K. pneumoniae* обнаруживалась в биологическом материале от больных с инфекцией дыхательных путей и мочевыводящей системы (табл. 1).

В AMRmap категории чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам определяются в соответствии с рекомендациями EUCAST и российскими клиническими рекомендациями. В зависимости от чувствительности к антибиотикам выделяют три группы микроорганизмов: чувствительные, микроорганизмы с промежуточной чувствительностью, устойчивые микроорганизмы. В табл. 2 представлены результаты оценки чувствительности изолятов *K. pneumoniae* к препаратам из разных групп антибиотиков. Отмечается высокая устойчивость к препаратам из группы аминогликозидов: гентамицину, тобрамицину, нетилмицину. Чувствительность к амикацину сохраняется на достаточном уровне, как при нозокомиальных, так и при внебольничных инфекциях. К хло-

Таблица 1

Частота выделения *K. pneumoniae* при разных локализациях инфекции

Локализация инфекции	2010–2013 гг.		2014–2016 гг.	
	N	n (%)	N	n (%)
Нозокомиальные инфекции				
Все локализации	160	59 (36,9)	271	95 (35,1)
Брюшная полость	8	2 (25)	38	5 (13,2)
Дыхательная система	55	45 (76,4)	136	65 (47,8)
Кожа и мягкие ткани	83	10 (12,1)	55	8 (14,6)
Мочевыводящая система	13	5 (38,5)	39	17 (43,6)
Внебольничные инфекции				
Все локализации	35	14 (40)	111	30 (27)
Брюшная полость	3	1 (33,3)	18	2 (11,1)
Дыхательная система	8	7 (87,5)	29	14 (48,3)
Кожа и мягкие ткани	5	1 (20)	20	5 (25)
Мочевыводящая система	19	5 (26,3)	42	9 (21,4)
Всего				
Все локализации	195	73 (37,4)	382	125 (32,7)

Примечание. N – выделено всего микроорганизмов; n (%) – доля изолятов *K. pneumoniae*.

Таблица 2

Устойчивость изолятов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам, %

Препарат	Нозокомиальные				Внебольничные			
	2010–2013 гг., n = 59		2014–2016 гг., n = 95		2010–2013 гг., n = 14		2014–2016 гг., n = 30	
	R	I	R	I	R	I	R	I
Аминогликозиды								
Амикацин	0	0	3,6	0	0	7,1	0	0
Гентамицин	71,2	0	62,1	0	78,6	7	50	3,3
Нетилмицин	–	–	65,3	12,6	–	–	53,3	13,3
Тобрамицин	79,7	5,1	77,9	4,2	100	0	66,7	3,3
Амфениколы								
Хлорамфеникол	28,8	0	35,8	0	50	0	43,3	0
Глицилциклины								
Тигециклин	1,7	0	3,2	9,5	0	10	0	0
Другие антибиотики								
Фосфомицин	45,8	0	32,6	0	50	0	33,3	0
Карбапенемы								
Дорипенем	–	–	5,3	1,1	–	–	3,3	0
Эртапенем	–	–	8,4	3,2	0	14,3	13,3	6,7
Имипенем	3,4	0	5,3	0	0	0	3,3	0
Меропенем	0	1,7	5,3	1,1	0	0	3,3	6,7
Монобактамы								
Азтреонам	96,6	1,7	94,7	2,1	100	0	86,7	6,7
Пенициллины + ингибитор бета-лактамаз								
Пиперациллин-тазобактам	61	15,3	39,0	27,4	27,1	21,4	46,7	16,7
Тикарциллин-клавуланат	98,3	0	97,9	0	100	0	93,3	0
Амоксициллин-клавуланат	93,2	0	96,8	0	100	0	83,3	0
Полусинтетические пенициллины широкого спектра действия								
Ампициллин	100	0	99	0	100	0	100	0
Сульфаниламиды								
Триметоприм-сульфаметоксазол	88,1	1,7	75,8	1,1	92,9	0	53,3	3,3
Фторхинолоны								
Ципрофлоксацин	79,7	11,9	76,8	12,6	92,9	0	76,7	3,3
Цефалоспорины III поколения								
Цефтазидим	96,6	0	93,7	3,2	100	0	86,7	0
Цефотаксим	98,3	0	97,9	0	100	0	93,3	0
Цефалоспорины III поколения + ингибитор β-лактамаз								
Цефтазидим-авибактам	–	–	5,3	0	–	–	3,3	0
Цефалоспорины IV поколения								
Цефепим	96,6	1,7	94,7	2,1	100	0	83,3	6,7
Цефалоспорины V поколения								
Цефтаролин	98,1	0	96,8	0	100	0	93,3	0

Примечание. n – количество изолятов; I (intermediate) — доля микроорганизмов с промежуточной чувствительностью, %, R (resistant) — доля устойчивых микроорганизмов, %.

рамфениколу резистентны 36–43 % изолятов, к фосфомицину – более 30 %. К тестированным цефалоспорином III–V поколения (цефтазидим, цефотаксим, цефепим, цефтаролин) устойчивы более 94 % больничных и 83 % внебольничных изолятов. Исключение составляет только препарат цефалоспоринов III поколения с ингибитором бета-лактамаз – цефтазидим-авибактам. К группе препаратов пенициллинового ряда с ингибитором бета-лактамаз (тикарциллин-клавуланат, амоксициллин-клавуланат) резистентны 83–98 % изолятов. Монобактамы в виде азтреонама, полусинтетические пенициллины широкого спектра действия в форме ампициллина, сульфаниламиды (триметоприм-сульфаметоксазол), фторхинолоны (ципрофлоксацин) также показали неэффективность в отношении *K. pneumoniae*.

В последние годы в мире наблюдается снижение чувствительности к карбапенемам. По данным AMRmap, в Республике Саха (Якутия) также отмечается наличие изолятов, резистентных к этой группе препаратов. Так, например, в 2014–2016 гг. 5 % больничных изолятов были устойчивы к дорипенему, имипенему и меропенему. К эртапенему были резистентны 8 % больничных и 13 % внебольничных изолятов *K. pneumoniae*.

Таким образом, данные мониторинга антибиотикорезистентности в Республике Саха (Якутия) свидетельствуют о том, что в отношении *K. pneumoniae* на настоящий момент могут быть эффективны амикацин, цефтазидим-авибактам, тигециклин, карбапенемы и, в части случаев, фосфомицин, пиперациллин-тазобактам. Круг возможных антибактериальных препаратов для лечения заболеваний, вызванных *K. pneumoniae*, резко сужен. Дальнейшее распространение резистентности к карбапенемам создает угрозу неэффективности лечения тяжелых инфекций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о том, что *K. pneumoniae* является частым возбудителем как нозокомиальных, так и внебольничных инфекций в Республике Саха (Якутия). При этом выделенные штаммы демонстрируют высокую устойчивость к большинству антибактериальных препаратов, в том числе к цефалоспорином III–V поколений. Имеются изоляты, резистентные к карбапенемам. По данным российского многоцентрового исследования МАРАФОН (2011–2012 гг.), у 91 % изолятов *K. pneumoniae* ($n = 287$) обнаружена продукция β -лактамаз расширенного спектра (ESBL), у 7 % – продукция карбапенемазы. Исследование также показало увеличение доли изолятов, устойчивых к карбапене-

мам, и штаммов, продуцирующих карбапенемазы [2]. В 2015 г., по данным сети эпидемиологического надзора за устойчивостью к противомикробным препаратам в странах Центральной Азии и Восточной Европы (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance – CAESAR), во многих странах Европейского региона наблюдалась высокая частота устойчивости к карбапенемам. Так, например, в Республике Беларусь доля резистентных изолятов составила 58 %, в Греции – 62 %, в Сербии – 39 %, в Италии – 34 %. В Российской Федерации были устойчивы к карбапенемам 7 % выделенных из образцов крови изолятов *K. pneumoniae*. Достаточно низкую частоту резистентности к карбапенемам эксперты связывают с относительно недавним началом использования препаратов этой группы в стране [3]. Еще одной особенностью, характерной для Российской Федерации, является высокая доля изолятов *K. pneumoniae* с множественной устойчивостью (как минимум к препаратам трех групп антибиотиков). Так, по данным исследования CAESAR, доля резистентных одновременно к фторхинолонам, цефалоспорином III поколения и аминогликозидам изолятов составляла 84 % [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, спектр препаратов для лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, крайне ограничен. Результаты российских многоцентровых исследований свидетельствуют об увеличении доли изолятов *K. pneumoniae*, устойчивых к карбапенемам (в том числе и штаммов, продуцирующих карбапенемазы), и о широкой распространенности ассоциированной устойчивости. В этих условиях необходимы меры по ограничению необоснованного использования карбапенемов.

Показатели устойчивости *K. pneumoniae* к антибиотикам необходимо учитывать не только для эффективного лечения пациентов, но и для оптимизации расходов регионального здравоохранения, например, при планировании государственных закупок лекарственных препаратов для стационаров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. 2017. 19. (2). 84–90.
2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. 2014. 16. (4). 254–265.
3. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе. 2016. ВОЗ. Режим доступа: <http://www.euro.who.int/ru/publications/abstracts/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2016> (accessed July 20, 2018).
4. Albiger B., Glasner C., Struelens M., Grundmann H., Monnet D., the European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries // Euro Surveill. 2015. 20. (45). pii 30062.
5. AMRmap. [Online]. 2018. Available at: <http://map.antibiotic.ru/> (accessed July 20, 2018).
6. Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014. World Health Organization. 2014. [Online]. April, 2014 Available at: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (accessed July 20, 2018).
7. Chung P.Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation // FEMS Microbiol. Lett. 2016. 363. (20). 1–6.
8. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016–2017. World Health Organization. 2017. Available at: <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report/en/> (accessed July 20, 2018).
9. Kidd T.J., Mills G., Sá-Pessoa J., Dumigan A., Frank Ch.G., Insua J.L., Ingram R., Hobley L., Bengoechea J.A. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence // EMBO Mol. Med. 2017. 9. (4). 430–447.
10. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance // FEMS Microbiol. Rev. 2017. 41. (3). 252–275.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Klebsiella pneumoniae* ISOLATES IN REPUBLIC OF SAKHA (YAKUTIA)

Olga Mitrofanovna EGOROVA, Elena Petrovna IGNATEVA, Irina Yurevna ISAEVA,
Galina Valerevna FILIPPOVA, Tatyana Mikhaylovna KLIMOVA

Medical Institute of North-Eastern Federal University n.a. M.K. Ammosov
677016, Yakutsk, Oyunskogo str., 27

The aim of the study was to evaluate the susceptibility to antibiotics of *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Republic of Sakha (Yakutia), according to the AMRmap database. **Material and methods.** Data of online platform AMRmap in 2010–2016 have been used for evaluation of the sensitivity of *K. pneumoniae* isolates to antibiotics. **Results and discussion.** *K. pneumoniae* isolates comprised 35,7 % of all bacterial nosocomial isolates ($n = 195$) and 30,1 % of community-acquired isolates ($n = 382$) respectively. Most of the isolates were insusceptible to common antibiotics: aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, netilmicin) – 50–78 %; chloramphenicol – 36–43 %, cephalosporins III–V generation (ceftazidime, cefotaxime, zepelin, ceftarolin) – 83–100 %, penicillin drugs with inhibitor of beta-lactamases (ticarcillin-clavulanate, amoxicillin-clavulanate) – 83–98 % monobactams (aztreonam) – 87–95 %, semi-synthetic penicillins of broad spectrum of action (ampicillin) – 100 %, sulfonamides (trimethoprim-sulfamethoxazole) – 53–76 %, fluoroquinolones (ciprofloxacin) – 77 %. At present the next preparations can be effective against *K. pneumoniae*: amikacin (sensitivity 96–100 %), ceftazidime-avibactam (95–97 %), tigecycline (97–100 %), carbapenems (87–97 %), in some cases, phosphomycin (77 %) and piperacillin-tazobactam (64–71 %). **Conclusion.** The spectrum of drugs for the treatment of infections caused by *K. pneumoniae* is extremely limited. The further spread of resistance to carbapenems poses a threat of ineffectiveness in the treatment of severe infections. In these conditions, measures are needed to limit the unjustified use of carbapenems. The indicators of resistance of *K. pneumoniae* to antibiotics should be taken into account not only for the effective treatment of patients, but also for optimizing the costs of regional health care, for example when planning procurement of medicines for hospitals

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, nosocomial infections, community-acquired infection, Republic of Sakha (Yakutia), carbapenems.

Egorova O.M. – senior lecturer of the department of pharmacology and pharmacy, e-mail: omit211@mail.ru
Ignatieva E.P. – senior lecturer of the department of pharmacology and pharmacy, e-mail: ignateva_elenainbox.ru
Isaeva I.Yu. – senior lecturer of the department of pharmacology and pharmacy, e-mail: isaeva_irina_urivna@mail.ru
Filippova G.V. – associate professor of the department of pharmacology and pharmacy, e-mail: nureeva@yandex.ru
Klimova T.M. – candidate of medical sciences, associate professor at the department of pharmacology and pharmacy, e-mail: biomeddykt@mail.ru

ЗАВИСИМОСТЬ РЕАКТИВНОСТИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ НА ФИЗИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ ОТ УРОВНЯ САЛИВАРНОГО КОРТИЗОЛА У ДЕТЕЙ

Сергей Сергеевич СИДОРОВ¹, Елена Анатольевна ЧАНЧАЕВА¹, Роман Иделевич АЙЗМАН²

¹ Горно-Алтайский государственный университет
649000, г. Горно-Алтайск, ул. Ленкина, 1

² Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Виллойская, 28

Цель исследования – оценить показатели реактивности сердечно-сосудистой системы детей 7–8 лет г. Горно-Алтайска при проведении функциональной пробы Мартинэ – Кушелевского в зависимости от уровня слюварного кортизола. **Материал и методы.** Объектом исследования явились учащиеся первого класса 7–8 лет школ № 7, 8 и 12 г. Горно-Алтайска (78 детей, в том числе 33 мальчика и 45 девочек). Определяли уровень слюварного кортизола и показатели центральной гемодинамики (частоту сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление, систолический и минутный объем крови) при выполнении функциональной пробы Мартинэ – Кушелевского. На основании динамики восстановления ЧСС и артериального давления определяли тип реакции сердечно-сосудистой системы, показатель качества реакции и эффективности кровообращения. Проводили корреляционный анализ показателей реактивности сердечно-сосудистой системы и уровня слюварного кортизола. **Результаты и их обсуждение.** Уровень кортизола у обследованных детей не выходил за пределы референтных значений. Нормотонический тип реакции сердечно-сосудистой системы на физическую нагрузку отмечался у 54 % детей (42 из 78), у остальных выявлены атипичные типы реакции: астенический 38 % (30 из 78), дистонический 6 % (5 из 78) и ступенчатый у 1 % (1 из 78). Значения показателя качества реакции обследованных детей свидетельствовали о том, что реакция сердечно-сосудистой системы на физическую нагрузку у 61 % детей осуществлялась за счет незначительного увеличения пульсового давления и существенного повышения ЧСС, что отражало низкую эффективность системы кровообращения. Восстановление ЧСС после физической нагрузки у обследованных детей происходило на 3-й минуте, однако режим восстановления носил декрементный характер, являющийся признаком неустойчивого состояния сердечно-сосудистой системы. Между уровнем слюварного кортизола обследованных детей и их показателями ЧСС как после физической нагрузки, так и в период восстановления выявлена положительная корреляция средней степени ($p < 0,05$). Следовательно, у детей со сравнительно высоким содержанием свободного кортизола в слюне сердечно-сосудистая система отличается большей реактивностью на физическую нагрузку. **Заключение.** Почти у половины обследованных детей 7–8 лет первого класса общеобразовательных организаций г. Горно-Алтайска выявлен атипичный тип реакции сердечно-сосудистой системы на стандартную физическую нагрузку, декрементный характер восстановления ЧСС, свидетельствующие о низкой эффективности системы кровообращения. Выявлена положительная корреляционная связь между уровнем слюварного кортизола и реактивностью сердечно-сосудистой системы на физическую нагрузку.

Ключевые слова: младший школьный возраст, проба Мартинэ – Кушелевского, слюварный кортизол, сердечно-сосудистая система.

Физическая активность – необходимое условие формирования, сохранения и укрепления здоровья подрастающего поколения [1]. Анализ уровня физического развития современной учащейся молодежи показал, что дети имеют в основном средний и низкий уровень физической подготовленности [5]. Систематические мышеч-

ные тренировки способствуют развитию у детей функциональных резервов сердечно-сосудистой системы, что выражается в ее адекватной реакции на физические и интеллектуальные нагрузки и быстром восстановлении показателей [3]. Многие исследователи отмечают, что в современной системе образования первостепенным является

Сидоров С.С. – ассистент кафедры физического воспитания и спорта, физиологии и безопасности жизнедеятельности, e-mail: sidorovss10@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9201-5805

Чанчаева Е.А. – д.б.н., доцент, проф. кафедры физического воспитания и спорта, физиологии и безопасности жизнедеятельности, e-mail: chan.73@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-5281-1145

Айзман Р.И. – д.б.н., проф. кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности, e-mail: aizman.roman@yandex.ru; http://orcid.org/0000-0002-7776-4768

получение знаний и формирование учебных навыков, при этом двигательный компонент физической активности, необходимый для детского организма, ограничен за счет увеличения статической нагрузки [10]. Начало школьного обучения детей, сопровождающееся значительным сокращением суточной двигательной активности, эмоциональной и интеллектуальной нагрузкой, является потенциальным риском развития функциональных отклонений [10].

При оценке физического развития детей, согласно современным рекомендациям, необходимо применение региональных нормативов, разработанных с учетом особенностей региона. В настоящее время сведений об особенностях физического развития детей младшего школьного возраста, проживающих в Республике Алтай, недостаточно.

Цель данного исследования заключалась в оценке показателей сердечно-сосудистой системы детей 7–8 лет первых классов г. Горно-Алтайска при выполнении функциональной пробы Мартинэ – Кушелевского с учетом уровня саливарного кортизола.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в октябре–ноябре 2016 г. на базе общеобразовательных школ № 7, 8 и 12 г. Горно-Алтайска Республики Алтай. Были использованы метод поперечных срезов и случайный подбор выборок. В исследуемую группу вошли дети, возраст которых на момент обследования составил от 6 лет 6 месяцев до 8 лет 5 месяцев 29 дней согласно рекомендациям Ставицкой и Арона. Измерения функциональных показателей сердечно-сосудистой системы (ССС) у обучающихся первых классов выполняли в первой половине дня. Всего обследовано 78 практически здоровых детей, в том числе 33 мальчика и 45 девочек. Обязательным условием для проведения исследования было письменное согласие родителей.

Определение уровня кортизола в слюне позволяет измерить содержание его свободной формы, в отличие от диагностики этого гормона в крови, где он находится в связанном с белками состоянии [8]. Оценка концентрации кортизола в слюне считается оптимальной для исследования уровня стрессированности детей [12–14, 16, 17]. Содержание саливарного кортизола определяли электрохемилуминесцентным (ЭХЛ) методом на автоматическом анализаторе Cobas e601 фирмы Хоффманн Ля Рош (диагностический набор Cortisol кат. № 11875116 122). Образцы слюны детей собирали в 23:00 родители испытуемых в

домашних условиях с помощью системы Salivette Sarstedt. В течение 30 минут до сбора слюны соблюдались рекомендованные условия (не есть, не чистить зубы и не употреблять напитки, кроме простой воды); после сбора слюны пробирку помещали в холодильник и хранили при температуре от -4 до -6 °С. В лабораторных условиях пробирки центрифугировали в течение 2–3 минут при 1000 оборотов в минуту, полученные образцы слюны помещали на ЭХЛ анализ. Всего было взято 30 проб (по 15 проб у девочек и мальчиков). На основании полученных результатов был проведен корреляционный анализ между содержанием саливарного кортизола и показателями сердечно-сосудистой системы при выполнении физической нагрузки.

В качестве физической нагрузки использовали пробу Мартинэ – Кушелевского (20 приседаний за 30 с). Перед нагрузкой у школьников после 5-минутного отдыха в положении сидя трижды измеряли артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) с одноминутными перерывами. Далее испытуемые выполняли 20 глубоких приседаний за 30 с с выносом рук перед собой (после каждого подъема руки опускались в исходное положение). После выполнения нагрузки в положении сидя у испытуемых определяли ЧСС за первые 10 секунд, затем за период между 15-й и 45-й секундами измеряли АД и с 50-й по 60-ю секунду вновь определяли ЧСС. Далее на 2-й, 3-й, 4-й и 5-й минуте проводили измерения в такой же последовательности.

Расчетным методом определяли:

– пульсовое давление: $ПД = САД - ДАД$, где САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление;

– систолический объем крови по Старт: $СОК = 40 + 0,5 \times ПД - 0,6 \times ДАД + 3,2 \times В$, где В – возраст;

– минутный объем крови: $МОК = СОК \times ЧСС / 1000$;

– показатель эффективности кровообращения: $ПЭК = (САД_2 / ЧСС_2) \times 100$, где САД₂ – САД после нагрузки, ЧСС₂ – ЧСС после нагрузки;

– показатель качества реакции на физическую нагрузку: $ПКР = (ПД_2 - ПД_1) / (P_2 - P_1)$, где ПД₁ – ПД до нагрузки, ПД₂ – ПД после нагрузки, P₁ – ЧСС до нагрузки, P₂ – ЧСС после нагрузки.

На основании динамики изменения ЧСС и АД определяли тип реакции ССС на физическую нагрузку по Летунову: нормотонический, гипертонический, дистонический, гипотонический (астенический) и ступенчатый. К *нормотоническому* типу относили детей, у которых после физической нагрузки происходило умеренное увеличение ЧСС (на 30–50 %), САД (на 10–35 мм рт. ст.),

ПД и снижение диастолического давления (на 4–10 мм рт. ст.), полное восстановление показателей наблюдалось на 2–3-й минуте; к гипотоническому (астеническому) типу относили детей с увеличением ЧСС более чем на 50 % от фонового уровня, незначительным повышением САД, неизменным или незначительным увеличением ДАД, снижением ПД, медленным восстановлением (до 5–10 мин); к гипертоническому типу – значительное учащение ЧСС, резкое повышение САД, ДАД, медленное восстановление; к дистоническому – резкое увеличение ЧСС, САД, ДАД, в период восстановления резкое снижение ДАД, медленное восстановление; к ступенчатому – в период восстановления увеличение САД на 2–3-й мин, при этом САД выше, чем на 1-й минуте, наблюдается медленное восстановление ЧСС и АД. ЧСС измеряли пульсоксиметром УХ300 (Армед), АД – механическим тонометром LD-80 по Короткову.

Для переменных с нормальным распределением указывали среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Для величин, распределение которых отличалось от нормального, указывали медианное значение и межквартильный диапазон (Me (25 %; 75 %)). Проверку нормальности распределения данных выполняли с помощью гистограмм путем расчета коэффициента асимметрии и куртозиса по тесту Шапиро – Уилка. При допущении нормального распределения данных значимость различий оценивали с помощью t -теста Стьюдента для независимых выборок. Для данных, распределение которых отличалось от нормального, использовали тест Манна – Уитни. Для оценки зависимости между переменными вычисляли коэффициент корреляции Спирмена (r_s) в качестве непараметрического критерия. При анализе значимости различий категориальных признаков использовали критерий χ^2 Пирсона. Достоверными ($p \leq 0,05$) считали различия при уровне значимости ≥ 95 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень кортизола у обследованных детей не выходил за пределы референтных значений (табл. 1), у девочек данный показатель несколько выше, чем у мальчиков. Нормотонический тип реакции ССС отмечали более чем у половины детей, у остальных выявлены атипичные типы реакции, при этом тип реакции не зависел от пола (см. табл. 1). На основании значений ПКР можно предположить, что адаптация ССС к физической нагрузке обследованных детей независимо от пола осуществлялась за счет незначительного увеличения ПД и чрезмерного увеличения ЧСС. Так, ПД в первые 10 с после нагрузки возрастало лишь на 29 % (табл. 2), а ЧСС – на 44 % (табл. 2, рисунок). Снижение ПЭК происходило в связи со значительным увеличением ЧСС по отношению к САД, что свидетельствовало о неблагоприятной адаптации ССС к нагрузке. Так, у 61 % (48 из 78) детей отмечены значения ПЭК ниже оптимального уровня. При проведении нагрузочной пробы выявлены значимые изменения СОК у мальчиков и девочек ($p = 0,05$) (см. табл. 2). В частности, после нагрузки прирост СОК по отношению к состоянию покоя у мальчиков составил 7 %, у девочек 3 %, что совпадает с увеличением медианных значений ПД у мальчиков на 43 %, у девочек на 29 %.

В целом восстановление ЧСС после нагрузки у обследованных детей происходило уже на 3-й минуте. Однако режим восстановления данного показателя носил не аperiодический, а декрементный характер (см. рисунок), что свидетельствует о неустойчивом состоянии ССС. У большей части детей восстановление САД происходило на 3–4-й, а ДАД – на 2–3-й минуте.

Корреляционный анализ (табл. 3) позволил выявить прямо пропорциональную зависимость между уровнем слюварного кортизола обследованных детей и их показателями ЧСС как после

Таблица 1

Соотношение типов реакции ССС на физическую нагрузку и показатели уровня слюварного кортизола у детей первого класса г. Горно-Алтайска

Группа	Тип реакции ССС, % (n)				Содержание кортизола в слюне, нмоль/л (референтный интервал 0,5–9,4 нмоль/л)
	Нормотонический	Астенический	Дистонический	Ступенчатый	
Общая	54 (42)	38 (30)	6 (5)	1 (1)	1,5 [0,5; 3,4]
Девочки	53 (24)	33 (15)	11 (5)	2 (1)	3,3 [0,7; 4,5]
Мальчики	55 (18)	45 (15)	–	–	0,7 [0,5; 2,2]
В зависимости от пола: $\chi^2 = 5,13$; $d.f. = 3$; $p = 0,16$					

Примечание. Численность групп см. в разделе «Материал и методы».

Таблица 2

Основные показатели ССС у детей первого класса г. Горно-Алтайска при проведении пробы Мартинэ – Кушелевского

Показатель	Общая популяция, n = 78		Мальчики, n = 33		Девочки, n = 45	
	СП	Н	СП	Н	СП	Н
ПД, мм рт. ст.	35 [30; 40]	45 [40; 50]	37 ± 8	50 [40; 55]	35 [30; 40]	45 [40; 45]
СОК, мл	47,2 ± 5,3	49,5 ± 4,5	47,2 ± 5,4	50,5 ± 4,9	47,3 ± 5,2	48,9 [46,4; 49,6]*
МОК, л	4,25 ± 0,74	6,44 ± 0,86	4,2 ± 0,75	6,58 ± 0,88	4,29 ± 0,73	6,32 ± 0,84
ЧСС в покое, уд./мин	88 ± 9,3		89 ± 9,1		87 ± 9,4	
САД в покое, мм рт. ст.	95 [90; 100]		100 [95; 100]		95 [90; 100]	
ДАД в покое, мм рт. ст.	60 [55; 65]		60 [55; 65]		60 [55; 65]	
ПКР, мм рт. ст./уд./мин	0,22 [0,13; 0,34]		0,24 [0,17; 0,37]		0,17 [0,11; 0,32]	
ПЭК, у.е.	86 [78; 94]		88 [81; 92]		83 [76; 96]	
САД, мм рт. ст. (восстановительный период)	0 м 30 с	110 [100; 115]	105 [100; 115]	105 [100; 115]	105 [103; 110]	105 [103; 110]
	1 м 30 с	103 [95; 110]	100 [95; 105]	100 [95; 105]	100 [95; 103]	100 [95; 103]
	2 м 30 с	100 [95; 105]	100 [95; 105]	100 [95; 105]	95 [90; 100]	95 [90; 100]
	3 м 30 с	95 [90; 100]	95 [90; 100]	95 [90; 100]	93 [90; 95]	93 [90; 95]
	4 м 30 с	95 [90; 100]	95 [90; 100]	95 [90; 100]	90 [90; 95]	90 [90; 95]
ДАД, мм рт. ст. (восстановительный период)	0 м 30 с	60 [60; 65]	60 [60; 65]	60 [60; 65]	60 [50; 60]	60 [50; 60]
	1 м 30 с	60 [55; 65]	60 [55; 65]	60 [55; 65]	58 [50; 60]	58 [50; 60]
	2 м 30 с	60 [55; 65]	60 [55; 65]	60 [55; 65]	55 [55; 60]	55 [55; 60]
	3 м 30 с	60 [55; 65]	60 [55; 65]	60 [55; 65]	58 [55; 60]	58 [55; 60]
	4 м 30 с	60 [55; 65]	60 [55; 65]	60 [55; 65]	58 [55; 60]	58 [55; 60]

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя мальчиков статистически значимо при $p < 0,05$; СП – значения в состоянии покоя; Н – значения после нагрузки.

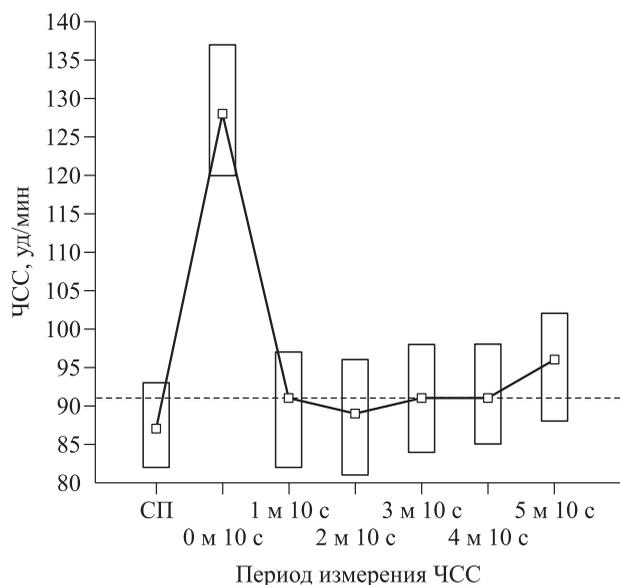


Рис. Динамика показателей ЧСС у детей первого класса г. Горно-Алтайска (Ме (25%; 75 %)). СП – состояние покоя; f_0 (пунктир) – верхняя граница состояния покоя

Таблица 3

Корреляция между показателями ЧСС после физической нагрузки и уровнем слюварного кортизола у детей первого класса г. Горно-Алтайска

Время после физической нагрузки	ЧСС, % от исходного значения		Абсолютные значения ЧСС	
	r	p	r	p
1 мин 59 с	0,46	< 0,05		
4 мин 59 с	0,69	< 0,01	0,44	< 0,05
5 мин 10 с	0,58	< 0,02	0,44	< 0,05

физической нагрузки, так и в период восстановления. Следовательно, у детей с высоким содержанием свободного кортизола в слюне ССС отличается большей реактивностью на физическую нагрузку. Вероятно, таким детям необходимо увеличение доли суточной двигательной активности.

Таким образом, исследование, проведенное нами на этапе начала школьного обучения детей Горно-Алтайска, позволило выявить лишь у 54 % детей нормотонический тип реакции ССС на стандартную физическую нагрузку, значительное увеличение ЧСС относительно показателей САД и ПД, декрементный характер восстановления ЧСС после нагрузки, что характерно для низкой эффективности функционального ответа ССС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования совпадают с данными литературы о недостаточной функциональной подготовленности детей младшего школьного возраста к занятиям физической культурой. Так, по полученным результатам, только у 54 % детей 7–8 лет г. Горно-Алтайска выявлен нормотонический тип реакции ССС на физическую нагрузку. У детей г. Сургута индекс физической подготовленности составил 62 % [9], среди школьников г. Комсомольск-на-Амуре неудовлетворительную физическую подготовленность имеют около 40 % детей [5], дети г. Архангельска имеют в основном средний и низкий уровень физической подготовленности [4].

У детей, ведущих малоподвижный образ жизни, ССС характеризовалась большей реактивностью на физические и интеллектуальные нагрузки, которая с возрастом лишь увеличивалась, в отличие от школьников, у которых занятия спортом способствовали менее выраженному проявлению реакций и быстрому восстановлению [3]. По всей видимости, у обследованных нами детей отмечался дефицит двигательной активности. Хронический дефицит двигательной активности современных школьников является одной из главных причин низкого уровня физической подготовленности и нарушений физического развития [7].

Установлена прямая зависимость между успешностью в обучении детей младшего школьного возраста и активностью симпатического отдела вегетативной нервной системы в регуляции сердечной деятельности [2]. В частности, анализ состояния ССС детей первого года обучения г. Челябинска показал увеличение на 20 % количества детей с симпатикотонией к концу учебного года [11].

Поскольку системные реакции организма детей на физические нагрузки и психологические стрессоры аналогичны [6, 15], то для детей, у которых выявлены повышенные реактивность ССС на стандартную нагрузку и уровень саливарного кортизола, образовательный процесс, сопровождающийся эмоциональным и интеллектуальным напряжением, будет лишь усугублять неудовлетворительное состояние организма. Поэтому таким детям крайне необходимо увеличить объем физической активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди обследованных детей первого класса общеобразовательных учреждений № 7, 8 и 12 г. Горно-Алтайска у 46 % выявлен атипичный тип реакции ССС на стандартную физическую нагрузку, декрементный характер восстановления ЧСС, что свидетельствует о недостаточной эффективности и неустойчивости функций ССС. У детей с более высоким уровнем саливарного кортизола обнаружено более значительное увеличение ЧСС после физической нагрузки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Родители всех детей или их законные представители проинформированы об особенностях проводимых диагностических манипуляций согласно этическим требованиям. Для проведения исследования и обработки персональных данных детей получено письменное согласие родителей, одобрение администрации школы. Исследования проводили в соответствии с международными морально-этическими нормами и положениями Хельсинкской декларации (июнь 1964 г., с изменениями 2013 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзман Р.И., Лысова Н.Ф., Завьялова Я.Л. Возрастная анатомия, физиология и гигиена: учеб. пособие. М.: КноРус, 2017. 403 с.
2. Варич Л.А., Сорокина Ю.В. Особенности психофизиологической адаптации учащихся младшего школьного возраста // Вестн. Кемер. ГУ. 2017. (2). 117–122.

3. Вахитов И.Х., Камалиева Л.Р. Изменения показателей ударного объема крови детей младшего школьного возраста во время устных ответов на теоретических уроках // Физиол. человека. 2014. 40. (3). 133–136.
4. Волокитина Т.В., Лукманова Н.Б., Сафонова О.А. Характеристика физического состояния детей 7–9 лет с разным уровнем физической подготовленности (лонгитюдное исследование) // Вестн. Помор. ун-та. 2011. (1). 38–44.
5. Инглик Т.Н., Чернявская Н.М., Айбазова Л.Б. Изучение уровня физической подготовленности школьников начальных классов // Соврем. пробл. науки и образования. 2016. (6). 340.
6. Криволапчук И.А., Чернова М.Б. Функциональное состояние детей 6–8 лет при напряженных тестовых нагрузках различного типа // Журн. высш. нерв. деятельности. 2017. 67. (2). 165–179.
7. Кучма В.Р., Ткачук Е.А., Ефимова Н.В. Гигиеническая оценка интенсификации учебной деятельности детей в современных условиях // Вопр. шк. и универ. медицины и здоровья. 2015. (1). 4–11.
8. Пинелис В.Г., Арсеньева Е.Н., Сенилова Я.Е., Скоблина Н.А., Поляков С.Д. Содержание кортизола в слюне у здоровых детей // Вопр. диагностики в педиатрии. 2009. 1. (1). 49–52.
9. Синяевский Н.И., Китайкина Н.А. Мониторинг физической подготовленности и здоровья школьников среднего Приобья // Успехи соврем. естествознания. 2009. (3). 62–63.
10. Филиппова Т.А., Верба А.С. Физическое развитие и состояние здоровья детей на рубеже дошкольного и младшего школьного возраста // Нов. исслед. 2013. (4). 145–158.
11. Шибков А.А. Особенности физического развития детей 7–8 лет, проживающих в различных районах промышленного мегаполиса // Вестн. мед. ин-та «РЕАВИЗ». 2017. 28. (4). 140–144.
12. Bosch J.A. The use of saliva markers in psychobiology: mechanisms and methods // Monogr. Oral Sci. 2014. 24. 99–108.
13. Hellhammer D.H., Wüst S., Kudielka B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research // Psychoneuroendocrinology. 2009. 34. (2). 163–171.
14. Hunter A.L., Minnis H., Wilson P. Altered stress responses in children exposed to early adversity: A systematic review of salivary cortisol studies // Stress. 2011. 14. 614–626.
15. Lambiase M.J., Barry H.M., Roemmich J.N. Effect of a simulated active commute to school on cardiovascular stress reactivity // Med. Sci. Sports Exerc. 2010. 42. (8). 1609–1616.
16. Marques A.H., Silverman M.N., Sternberg E.M. Evaluation of stress systems by applying noninvasive methodologies: measurements of neuroimmune biomarkers in the sweat, heart rate variability and salivary cortisol // Neuroimmunomodulation. 2010. 17. (3). 205–208.
17. Obayashi K. Salivary mental stress proteins // Clin. Chim. Acta. 2013. 425. 196–201.

CARDIOVASCULAR SYSTEM REACTIVITY TO PHYSICAL ACTIVITY DEPENDENCE ON THE CORTISOL SALIVARY CONTENT AT CHILDREN

Sergey Sergeevich SIDOROV¹, Elena Anatolyevna CHANCHAEVA¹, Roman Idelevich AYZMAN²

¹ Gorno-Altaysk State University
649000, Gorno-Altaysk, Lenkin str., 1

² Novosibirsk State Pedagogical University
630126, Novosibirsk, Vilyuiskaya str., 28

Aim of the study – to estimate the indicators of the central haemodynamics of children of the first class in Gorno-Altaysk when conducting one-stage functional Martinet – Kushelevsky's test depending on the level of salivary cortisol. **Material and methods.** An object of the research was the students of the first class of schools No. 7, 8 and 12 of Gorno-Altaysk (78 children, including 33 boys and 45 girls in the age of 7–8 years). Content of salivary cortisol and indicators of the central haemodynamics were determined when performing one-stage functional Martinet – Kushelevsky's test (heart rate, arterial blood pressure, systolic and minute blood volume). The type of cardiovascular system reaction, the reaction quality indicator and blood circulation efficiency were defined on the basis of restoration dynamics of heart rate and arterial pressure. Correlation analysis of cardiovascular system indicators and level of salivary cortisol was carried out. **Results and discussion.** Cortisol level at the examined children didn't go beyond reference values. The normotonical type of cardiovascular system reaction to physical activity was noted at 54 % of children (42 of 78), atypical types of reaction were revealed at the others: asthenic at 38 % (30 of 78), dystonic at 6 % (5 of 78) and step-type at 1 % (1 of 78). The indicator values of reaction quality of examined children demonstrate that cardiovascular system adaptation to physical activity at children is carried out due to insignificant increase in pulse pressure and excessive increase in heart rate. The performance indicator of low circulation values are caused by significant increase in heart rate in relation to the systolic pressure (the rate of circulation value is lower than optimum level at 61 % of children). Restoration of heart rate after loading at the examined children took place for the 3rd minute however the mode of this indicator restoration is of decremental character being a sign of cardiovascular system unstable condition. The positive correlation of average degree between the salivary cortisol level and HR indicators of both after physical activity and during restoration is revealed ($p < 0,05$). Therefore, the cardiovascular system of children with rather high rates of free cortisol in saliva is notable for the bigger reactivity to physical activity. **Conclusion.** The atypical type of cardiovascular systems reaction to standard physical activity and the decremental nature of HR restoration is revealed at 46 % examined children of the first class of general education institutions No. 7, 8 and 12 of Gorno-Altaysk. The significant increase in HR after physical activity is revealed at children with higher level of salivary cortisol.

Key words: younger school age, Martinet – Kushelevsky's test, salivary cortisol, cardiovascular system.

Sidorov S.S. – assistant, department of physical education and sports, physiology and life safety

Chanchaeva E.A. – doctor of biological sciences, professor department of physical education and sports, physiology and life safety

Ayzman R.I. – doctor of biological sciences, professor department of anatomy, physiology and life safety

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ БОЛЕЗНЕЙ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ У РАБОТНИКОВ «ШУМОВЫХ» ПРОФЕССИЙ, ЗАНЯТЫХ ДОБЫЧЕЙ ПОЛЕЗНЫХ ИСКОПАЕМЫХ, И ИХ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБУСЛОВЛЕННОСТЬ

Эльмира Радиковна ШАЙХЛИСЛАМОВА, Альфия Динисламовна ВОЛГАРЕВА,
Марина Прокопьевна ОБУХОВА, Галина Гининовна ГИМРАНОВА,
Лилия Казымовна КАРИМОВА, Эльвира Тимерьяновна ВАЛЕЕВА

Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора
450106, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94

Цель исследования – оценка профессиональной обусловленности заболеваний системы кровообращения у работников «шумовых» профессий, занятых добычей полезных ископаемых. **Материал и методы.** Изучены условия труда, состояние здоровья 1481 работника ведущих профессий, занятых добычей сырой нефти и рудных полезных ископаемых, с оценкой функционального состояния сердечно-сосудистой системы с помощью электрокардиографии (ЭКГ), исследования сосудов глазного дна, системной микрогемодинамики и гемомикроциркуляции бульбарной конъюнктивы. **Результаты и их обсуждение.** На обследованных оказывает влияние комплекс факторов производственной среды и трудового процесса, среди которых приоритетная роль принадлежит производственному шуму. Болезни системы кровообращения у работников основной группы выявлены в 2 раза чаще, чем в группе сравнения. Частота артериальной гипертензии увеличивается с возрастом и стажем работы: достоверный рост наблюдается у лиц со стажем работы 11–15 лет и более 15 лет по сравнению со стажевыми группами 6–10 лет и менее 5 лет. Изменения со стороны деятельности сердца при ЭКГ обследовании выявлены у 54,2 и 42,9 % работников, занятых добычей руд и нефти соответственно. Цереброваскулярные заболевания у большинства работников диагностировались на фоне артериальной гипертензии и атеросклеротического процесса, о чем свидетельствовали изменения сосудов глазного дна. Таким образом, повышенная распространенность и возрастание частоты артериальной гипертензии при увеличении стажа работы не исключает возможного влияния вредных условий труда на ее формирование. Определяющая роль условий труда для артериальной гипертензии установлена у операторов по капитальному и подземному ремонту скважин, проходчиков, машинистов погрузочно-доставочных машин, агрегатов и экскаваторов, что является основанием для разработки системы мероприятий по обеспечению безопасных условий труда и профилактики болезней системы кровообращения.

Ключевые слова: условия труда, добыча полезных ископаемых, производственный шум, болезни системы кровообращения, артериальная гипертензия, цереброваскулярные заболевания.

Во всем мире, в том числе в Российской Федерации, распространение болезней системы кровообращения (БСК) принимает характер пандемии [3, 15, 28]. Основная доля в суммарной распространенности БСК приходится на болезни, характеризующиеся повышенным кровяным давлением, по которым первичная и общая заболеваемость выросла с 2002 по 2014 г. почти в два раза. Доля остальных видов БСК значительно меньше, но показатели заболеваемости ишеми-

ческой болезнью сердца и цереброваскулярными болезнями также возросли в 1,3–1,9 раза [17]. В течение многих лет БСК являются ведущей причиной смертности, которая составляет около 57 % от всех случаев смертей в мире [26] и, согласно прогнозам экспертов, возрастет с 18,1 млн в 2010 г. до 24,2 млн в 2030 г. В структуре причин смерти от БСК существенное место занимают сосудистые заболевания головного мозга [3, 20, 22], и при отсутствии эффективных глобальных мер

Шайхлисламова Э.Р. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: shajkh.ehlmira@yandex.ru

Волгарева А.Д. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: ad-volgareva@yandex.ru

Обухова М.П. – к.м.н., врач-офтальмолог, e-mail: ovotpo@yandex.ru

Гимранова Г.Г. – д.м.н., заместитель директора по научной и организационно-методической работе, e-mail: gala.gim@mail.ru

Каримова Л.К. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник, e-mail: iao_karimova@rambler.ru

Валева Э.Т. – д.м.н., зав. отделом охраны здоровья работающих, e-mail: oozr@mail.ru

по борьбе с данной эпидемией к 2025 г. прогнозируется рост смертности от инсульта до 6,7 млн, а к 2030 г. – до 7,8 млн [14, 23].

Общепризнано, что эпидемия БСК во многом связана с образом жизни и появлением вследствие этого физиологических факторов риска. Существенную роль в создавшемся положении играют и неблагоприятные условия труда, которые являются источниками постоянной опасности нарушения здоровья работников различных профессий [8]. Особенно это актуально для работников, занятых добычей полезных ископаемых, труд большинства из которых сопровождается многофакторным воздействием вредных и опасных производственных факторов различной природы и интенсивности, что повышает риск развития общесоматических заболеваний, в том числе БСК [2, 6, 10].

Результаты многочисленных гигиенических исследований [7, 11, 12, 25] показывают, что к приоритетным вредным факторам, неблагоприятно воздействующим на организм работающих в этой отрасли, относится производственный шум, воздействию которого по данным Роспотребнадзора в настоящее время подвергается каждый пятый работающий.

Следует отметить, что трудовые процессы, связанные с воздействием шума, нередко требуют напряжения определенных групп мышц, нервно-эмоционального перенапряжения, а также могут сочетаться с действием вибрации, токсических веществ, неблагоприятного микроклимата и др. Все это является отягощающими факторами, влияющими на сроки развития и клиническую картину заболеваний. При этом степень выраженности изменений в значительной мере зависит от интенсивности и длительности воздействия вредных производственных факторов в течение рабочего дня и от стажа работы [16, 21].

Установлены причинно-следственные связи между неспецифическим действием интенсивного производственного шума, а также вибрации, тяжести и напряженности трудового процесса и изменениями в сердечно-сосудистой системе, увеличением риска формирования артериальной гипертензии (АГ) и cerebrovasкулярных заболеваний (ЦВЗ) у работников различных отраслей экономики [1, 4, 9, 13, 24, 27, 29, 30]. Дальнейшее изучение экстраауральных проявлений шумового воздействия у работников, трудовая деятельность которых протекает в условиях повышенной шумовой нагрузки в сочетании с другими факторами (вибрация, физическое и нервно-эмоциональное перенапряжение), является важным условием научного обоснования и проведения профилактических мероприятий при БСК. При этом в качестве

ранних донозологических критериев неблагоприятного воздействия вредных производственных факторов на сердечно-сосудистую систему могут быть использованы показатели состояния сосудов глазного дна и биомикроскопии конъюнктивы глаза.

Цель работы – изучение распространенности кардио- и cerebrovasкулярных заболеваний и оценка риска их развития среди работников ведущих профессий «шумовых» производств на примере предприятий по добыче полезных ископаемых Республики Башкортостан.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Условия труда работников основных профессиональных групп, занятых добычей полезных ископаемых (сырой нефти и рудных ископаемых), оценены по данным гигиенических исследований на основании «Гигиенических критериев оценки и классификации условий труда по показателям вредности и опасности факторов производственной среды, тяжести и напряженности трудового процесса» [18].

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

Состояние здоровья работников изучалось в рамках периодического медицинского осмотра в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ от 12.04.2011 № 302н, проведенного сотрудниками Уфимского НИИ медицины труда и экологии человека. Контингент обследованных сформирован из числа рабочих-мужчин со стажем работы по профессии в условиях воздействия вредных производственных факторов, в том числе шума, не менее 10 лет: бурильщики эксплуатационного бурения скважин, операторы по капитальному и подземному ремонту скважин (КРС, ПРС), операторы по добыче нефти и газа (ДНГ), машинисты агрегатов по обслуживанию оборудования, занятые добычей нефти (801 человек), и проходчики, крепильщики, машинисты экскаваторов, машинисты погрузочно-доставочных машин (ПДМ), занятые добычей руд (680 человек). Средний возраст обследованных составил $45,4 \pm 0,8$ года, средний стаж – $18,9 \pm 0,8$ года. В группу сравнения включены 375 работников, занятых профессиональной деятельностью без воздействия интенсивного производственного шума. По возрасту и стажу работы отдельные профессиональные группы не различались.

Оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы проведена по данным ЭКГ в 12 отведениях с использованием электро-

кардиографа Fukuda FX-3010 («Fukuda Denshi Co.», Япония). Состояние сосудов глазного дна и системной микрогемодинамики исследовано с помощью щелевой лампы ЦЛ-56 в бескрасном свете при увеличении в 60 раз. При этом у лиц с диагностированными ЦВЗ особое внимание обращено на состояние сосудов сетчатки, являющихся прямым продолжением церебральных сосудов. Гемомикроциркуляция бульбарной конъюнктивы изучена у 120 работников добычи нефти и у 95 работников добычи руды, близких по возрасту (от 40 до 55 лет) и стажу работы (более 10 лет). Качественная и количественная оценка морфофункционального состояния микрососудов конъюнктивы с подсчетом общей суммы баллов (конъюнктивальный индекс и парциальные индексы внутрисосудистых и сосудистых изменений) осуществлялась по методу В.С. Волкова с соавт. [5]. Степень профессиональной обусловленности АГ и ЦВЗ определяли на основании расчета относительного риска (RR, ед.) и этиологической доли (EF, %) по формуле Miettinen [19].

Непрерывные переменные представлены в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ($M \pm m$). Для оценки различий количественных данных использовали критерий Стьюдента, для номинальных данных – критерий χ^2 . Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гигиеническими исследованиями установлено, что комплекс вредных факторов для работников основных профессий, занятых добычей

полезных ископаемых, практически одинаков и включает производственный шум, вибрацию, воздействие вредных веществ, тяжесть и напряженность труда. Все обследованные в процессе профессиональной деятельности подвергались воздействию интенсивного производственного шума, превышающего предельно допустимые уровни. При выполнении различных технологических операций эквивалентный уровень звука на рабочих местах работников, занятых добычей нефти, достигает 86–97 дБА, занятых добычей руд – превышают предельно допустимый уровень на 18–23 дБА. Гигиеническая оценка факторов производственной среды и трудового процесса показала, что условия труда работников, занятых добычей полезных ископаемых, по шумовому фактору относятся к 3-му классу 1–3 степени вредности, общая оценка условий труда по степени вредности и опасности позволила отнести их к 3-му классу 2–4 степени (табл. 1).

По результатам периодических медицинских осмотров БСК, в основном представленные АГ и ЦВЗ, у работников основной группы выявлены в 2 раза чаще, чем в группе сравнения ($p < 0,001$), при этом артериальная гипертензия (АД выше 140/90 мм рт. ст.) составляла основную долю у работников, занятых как добычей нефти, так и рудных ископаемых, и в большей степени была обусловлена начальными неосложненными формами – гипертонической болезнью (ГБ) I стадии ($22,6 \pm 1,5$ и $14,4 \pm 1,3$ % соответственно). Распространенность АГ в основных группах рабочих была выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Наиболее часто АГ диагностирована в профессиональных группах бурильщиков (41,2 %), операторов по КРС, ПРС (39,4 %), ма-

Таблица 1

Классы условий труда по производственному шуму на рабочих местах работников, занятых добычей полезных ископаемых

Фактор производственной среды	Профессия							
	Добыча сырой нефти				Добыча рудных полезных ископаемых			
	Бурильщик эксплуатационного бурения скважин	Оператор по КРС, ПРС	Оператор по ДНГ	Машинист агрегатов	Проходчик	Крепильщик	Машинист ЦДМ	Машинист экскаватора
Производственный шум: эквивалентный уровень звука, превышение на дБА	6–17	4–5	3–4	10–12	6–23	1–2	6–14	1–2
Класс условий труда	3.2–3.3	3.1	3.1	3.2–3.3	3.3	3.1	3.2	3.1
Общая оценка условий труда	3.3–3.4	3.2–3.3	3.1	3.2–3.3	3.3–3.4	3.2	3.2	3.2

Таблица 2

Распространенность ГБ среди работников, занятых добычей полезных ископаемых, %

	Профессия	ГБ I стадия	ГБ II стадия	Итого
Добыча сырой нефти	Бурильщики эксплуатационного бурения скважин ($n = 277$)	$22,4 \pm 2,5^*$	$18,8 \pm 2,3^{**}$	$41,2 \pm 3,0^{**}$
	Операторы по КРС, ПРС ($n = 137$)	$28,5 \pm 3,9^{**}$	$10,9 \pm 2,7$	$39,4 \pm 4,2^{**}$
	Операторы по ДНГ ($n = 162$)	$17,9 \pm 3,0$	$6,2 \pm 1,9$	$24,1 \pm 3,4$
	Машинисты агрегатов ($n = 225$)	$22,7 \pm 2,8^*$	$13,3 \pm 2,3^*$	$36,0 \pm 3,2^{**}$
	Всего, основные профессии ($n = 801$)	$22,6 \pm 1,5^*$	$13,4 \pm 1,2$	$36,0 \pm 1,7^{**}$
	Группа сравнения ($n = 133$)	$11,3 \pm 2,7$	$5,3 \pm 1,9$	$16,5 \pm 3,2$
Добыча рудных ископаемых	Крепильщики ($n = 167$)	$13,2 \pm 2,6^*$	$5,4 \pm 1,7$	$18,6 \pm 3,0$
	Проходчики ($n = 161$)	$18,6 \pm 3,1^{**}$	$5,6 \pm 1,8$	$24,2 \pm 3,4^{**}$
	Машинисты ПДМ ($n = 289$)	$12,1 \pm 1,9$	$2,8 \pm 1,0$	$14,9 \pm 2,1$
	Машинисты экскаватора ($n = 63$)	$17,5 \pm 4,8^*$	$15,9 \pm 4,6^{**}$	$33,3 \pm 5,9^{**}$
	Всего, основные профессии ($n = 680$)	$14,4 \pm 1,3^*$	$5,3 \pm 0,9$	$19,7 \pm 1,5^*$
	Группа сравнения ($n = 242$)	$7,4 \pm 1,7$	$4,5 \pm 1,3$	$12,0 \pm 2,1$

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

шинистов агрегатов (36,0 %), операторов по ДНГ (24,1 %), машинистов экскаваторов (33,3 %), проходчиков (24,2 %) и крепильщиков (18,6 %). Следует отметить более низкую распространенность АГ среди работников, занятых добычей руд, по сравнению с работниками, занятыми добычей нефти, объясняемую профессиональным отбором как на этапе приема на работу, так и при проведении медицинских осмотров (табл. 2)

Характерными для обследованных были жалобы на головные боли (36,9 %), головокружения несистемного характера (16,5 %) и периодический субъективный шум (22,5 %). Частота АГ с возрастом увеличивается во всех профессиональных группах: в возрасте 20–29 лет – $11,4 \pm 2,5$ %, 30–39 лет – $17,5 \pm 1,8$ %, 40–49 лет – $30,2 \pm 1,9$ %, старше 50 лет – $62,7 \pm 3,2$ % ($p < 0,01$). Установлено, что во всех профессиональных группах наблюдается достоверный рост встречаемости ГБ I стадии у лиц со стажем работы 11–15 лет и более 15 лет по сравнению со стажевыми группами 6–10 лет и менее 5 лет. Частота ГБ II стадии статистически значимо увеличена в группе бурильщиков, машинистов агрегатов и машинистов экскаваторов в тех же стажевых группах.

ЭКГ обследование выявило изменения со стороны деятельности сердца у $54,2 \pm 1,9$ % работников, занятых добычей руд и у $42,9 \pm 1,7$ % работников, занятых добычей нефти. При этом среди работников обеих групп наиболее часто регистрировались изменения конечной части желудочкового комплекса QRS ($24,4 \pm 1,6$ и $22,3 \pm 1,5$ % соответственно) и гипертрофия миокарда левого желудочка ($10,6 \pm 1,2$ и $11,8 \pm 1,1$ % соответствен-

но). Нарушения процессов реполяризации выявлены в 7,3–9,5 % случаев. Изменения на ЭКГ достоверно чаще установлены у бурильщиков (15,9 %), операторов по КРС, ПРС (13,9%), машинистов агрегатов (12,9 %) и машинистов экскаваторов (12,7 %), чем у лиц из группы сравнения (6,0 %). Нарушения ритма по типу синусовой аритмии, наджелудочковой и желудочковой экстрасистолии достоверно чаще зарегистрированы среди крепильщиков (8,4 %), проходчиков (8,1 %) и машинистов экскаваторов (7,9 %) по сравнению с машинистами ПДМ (2,8 %, $p < 0,05$). Установлено статистически значимое учащение ЭКГ патологии у стажированных рабочих: при стаже более 10 лет ЭКГ-изменения регистрируются в 4 раза чаще (66,5 %) относительно лиц, работающих менее 5 лет (16,2 %).

Цереброваскулярные заболевания у работников, занятых добычей нефти и рудных ископаемых, выявлены в $9,6 \pm 1,0$ и $13,7 \pm 1,3$ % случаев соответственно и были представлены начальными проявлениями недостаточности мозгового кровообращения, причем у большинства работников данные заболевания диагностировались на фоне АГ и атеросклеротического процесса, о чем свидетельствовали изменения сосудов глазного дна. При исследовании глазного дна у обследованных выявлены изменения гипертонического и атеросклеротического характера. Гипертонические изменения у работников молодого возраста, имевших неосложненные формы ГБ, носили преимущественно тонический характер без видимых поражений стенок сосудов (сужение артерий, расширение вен) и обнаружены в 30,1 %

Таблица 3

Степень профессиональной обусловленности АГ у работников, занятых добычей полезных ископаемых

Профессия	RR, ед.	EF, %	Степень профессиональной обусловленности
Добыча сырой нефти			
Операторы по КРС, ПРС	2,1	52,4	Высокая
Машинисты агрегатов	2,8	64,3	
Бурильщики эксплуатационного бурения скважин	1,6	37,5	Средняя
Операторы по ДНГ	1,3	23,1	Малая
Добыча рудных ископаемых			
Проходчики	2,0	51	Высокая
Машинисты ПДМ	2,7	65	
Машинисты экскаватора	2,8	64	
Крепильщики	1,5	36	Средняя

случаев у работников, занятых добычей рудных ископаемых, и 21,2 % случаев у работников, занятых добычей нефти. Изменения сосудистой стенки атеросклеротического характера в старших возрастных группах, имевших ГБ II стадии и/или ЦВЗ, выявлены у 23,6 % работников добычи нефти и 39,0 % работников добычи руд. Гипертонический ангиосклероз имел место соответственно у 16,1 и 18,1 % обследованных. Количественная оценка ангиопатий сетчатки определила среднее значение коэффициента 0,48 у нефтяников и 0,44 у горнорабочих.

Ангиопатия сетчатки среди горнорабочих не только встречалась чаще, но и имела заметно большую выраженность, что подтверждалось количественными исследованиями микроциркуляции бульбарной конъюнктивы: конъюнктивальный индекс у них составил 15,4 балла, у работников нефтедобычи – 14,2, сосудистые изменения – 10,2 балла, у работников добычи нефти – 9,4 балла, внутрисосудистые изменения – соответственно 5,2 и 4,8 балла. Таким образом, морфофункциональные изменения микроциркуляции полностью соответствовали изменениям в ретинальных сосудах.

Методом расчета относительного риска и этиологической доли неблагоприятных факторов рабочей среды и трудового процесса определена высокая степень профессиональной обусловленности АГ для машинистов агрегатов, операторов по КРС, ПРС, машинистов экскаваторов, ПДМ и проходчиков, средняя степень – для бурильщиков и крепильщиков и малая – для операторов по ДНГ (табл. 3). Для цереброваскулярной патологии у работников, занятых добычей полезных ископаемых, установлена средняя степень профессиональной обусловленности (RR = 1,8,

EF = 45,2% – у работников, занятых добычей нефти; RR = 1,9, EF = 48,6 % – у работников, занятых добычей руд).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе добычи полезных ископаемых на работников оказывает влияние комплекс факторов производственной среды и трудового процесса, среди которых во всех профессиональных группах приоритетная роль принадлежит производственному шуму (класс условий труда 3.1–3.3).

Несмотря на высокие требования, предъявляемые к профессиональному отбору, работники основных профессий, занятых добычей полезных ископаемых, более подвержены артериальной гипертензии, чем лица группы сравнения, уровни факторов рабочей среды и трудового процесса на рабочих местах которых соответствовали допустимому классу (класс 2). Повышенная распространенность артериальной гипертензии среди работников основных профессий и прослеживаемая тенденция увеличения ее частоты со стажем работы по профессии не исключают возможного влияния вредных условий труда на формирование указанной патологии. При этом к числу производственных факторов риска развития артериальной гипертензии, несомненно, относятся шум, вибрация, тяжесть и напряженность труда, а также их сочетанное воздействие.

Относительный риск развития артериальной гипертензии у работников изучаемых профессий колебался от 1,3 до 2,8 ед., этиологическая доля – от 21,3 до 65 %. Определяющая роль условий труда (относительный риск более 2 единиц и этиологическая доля более 50 %) в развитии артериальной гипертензии установлена в профес-

сиональных группах операторов по КРС, ПРС, проходчиков, машинистов ПДМ, агрегатов и экскаваторов.

Полученные результаты являются основанием для разработки и внедрения системы мероприятий по улучшению условий труда и профилактики болезней системы кровообращения для сохранения здоровья работников, занятых добычей полезных ископаемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасова О.Е., Потеряева Е.Л., Верещагина Г.Н. Влияние условий труда на формирование артериальной гипертензии у работающих в условиях высокого профессионального риска // Мед. труда и пром. экологии. 2010. (8). 19–22.
2. Бакиров А.Б., Такаев Р.М., Кондрова Н.С., Шайхлисламова Э.Р. Факторы рабочей среды и трудового процесса на предприятиях цветной металлургии Республики Башкортостан и профессиональное здоровье работников // Мед. труда и пром. экологии. 2011. (7). 4–10.
3. Бокерия Л.А., Ступаков И.Н., Гудкова Р.Г. Успехи и проблемы российской кардиохирургии // Здравоохранение. 2012. (3). 24–33.
4. Волгарева А.Д., Шайхлисламова Э.Р., Обухова М.П., Чудновец Г.М., Газизова Н.Р., Сагадиева Р.Ф. Сосудистые нарушения в формировании производственно-обусловленной патологии органа слуха у горнорабочих // Актуальные вопросы организации контроля и надзора за физическими факторами: сб. тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф., Москва, 25–26 мая 2017 г. М.: Дашко и К, 2017. 71–74.
5. Волков В.С., Высоцкий Н.Н., Троцюк В.В., Мишин В.И. Оценка состояния микроциркуляции методом конъюнктивальной биомикроскопии // Клиническая медицина. 1976. (7). 115–119.
6. Гимранова Г.Г., Бакиров А.Б., Каримова Л.К., Шайхлисламова Э.Р., Волгарева А.Д., Уразаева Э.Р., Галлямова С.А., Фаттахова Л.А., Масыгутова Л.М., Салимгареева Т.М., Бейгул Н.А., Маврина Л.Н., Яхина М.Р. Профессиональные риски нарушения здоровья работников, занятых добычей и переработкой нефти. Уфа: Диалог, 2017. 172 с.
7. Гимранова Г.Г., Бакиров А.Б., Шайхлисламова Э.Р., Каримова Л.К., Волгарева А.Д., Обухова М.П., Бейгул Н.А. Распространенность основных неинфекционных, производственно-обусловленных заболеваний у работников нефтедобывающей отрасли // Мед. труда и экол. человека. 2016. (1). 5–15.
8. Измеров Н.Ф., Бухтияров И.В., Прокопенко Л.В., Измерова Н.И., Кузьмина Л.П. Труд и здоровье. М.: Литтерра, 2014. 416 с.
9. Измеров Н.Ф. Условия труда как фактор риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы // Вестн. РАМН. 2003. (12). 38–41.
10. Каримова Л.К., Серебряков П.В., Шайхлисламова Э.Р., Яцына И.В. Профессиональные риски нарушения здоровья работников, занятых добычей и переработкой полиметаллических руд. Уфа; М.: Принт-2, 2016. 337 с.
11. Кирьяков В.А., Жеглова А.В., Сааркопель Л.М., Сухова А.В. Профессиональная патология нервной системы у горнорабочих. М., 2015. 224 с.
12. Кокоулина А.А., Балашов С.Ю., Загороднов С.Ю., Кошурников Д.Н. Гигиеническая оценка объектов добычи, подготовки и первичной переработки нефти с учетом показателей риска для здоровья // Мед. труда и пром. экологии. 2016. (12). 34–38.
13. Косарев В.В., Бабанов С.А. Профессиональная нейросенсорная тугоухость // Рос. мед. журн. 2012. (31). 1556–1560.
14. Кулебрас А. Инсульт – острое заболевание, которое можно предотвратить // Цереброваскулярная патология и инсульт: мат. II Рос. междунар. конгр. М.: МедиаСфера, 2007. 74–75.
15. Линденбратен А.Л., Ковалева В.В., Роговина А.Г., Самошин О.А. О динамике смертности лиц старше трудоспособного возраста от болезней системы кровообращения в Тверской области в 2005–2010 гг. // Бюл. Нац. НИИ обществ. здоровья РАМН. 2012. (2). 61–64.
16. Панкова В.Б., Федина И.Н., Волгарева А.Д. Профессиональная нейросенсорная тугоухость: диагностика, профилактика, экспертиза трудоспособности. М., 2017. 330 с.
17. Ревич Б.А., Харькова Т.Л. Чем болеют и от чего гибнут россияне трудоспособного возраста // Демоскоп Weekly. 2016. 691–692. URL: <http://demoscope.ru/weekly/2016/0691/demoscope691.pdf>
18. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда: руководство Р. 2.2.2006-05: утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 29.07.2005. М., 2005. 152 с.
19. Руководство по оценке профессионального риска для здоровья работников. Организационно-методические основы, принципы и критерии оценки: Руководство Р. 2.2.1766-03. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004. 24 с.
20. Самородская И.В., Кондрикова Н.В., Казачек Я.В., Барбараш О.Л., Бойцов С.А. Нозологическая структура смертности от болезней системы кровообращения в 2006 и 2013 гг. // Комплекс. пробл. серд.-сосуд. заболеваний. 2015. (4). 67–72.
21. Серебряков П.В., Мелентьев А.В., Демина И.Д. Клинико-диагностическое значение вариабельности сердечного ритма у работников, подвергающихся воздействию шумовибрационного фактора // Мед. труда и пром. экологии. 2010. (7). 1–6.

22. Сон И.М., Леонов С.А., Вайсман Д.Ш. Автоматизированная система регистрации смертности: оценка предотвратимой смертности // Соц. аспекты здоровья населения. 2014. 35. (1). <http://vestnik.mednet.ru/content/view/534/30/lang.ru/>
23. Хачински В. Инсульт на всемирной повестке дня. II Российский Международный Конгресс «Цереброваскулярная патология и инсульт» // Мед. науч.-попул. газета. 2007. (4). 4.
24. Шайхлисламова Э.Р., Волгарева А.Д., Каримова Л.К., Валеева Э.Т., Обухова М.П. Роль производственного шума в формировании профессиональной и общесоматической патологии у горнорабочих // Санитар. врач. 2017. (7). 21–27.
25. Шайхлисламова Э.Р., Каримова Л.К., Валеева Э.Т., Кондрова Н.С., Галимова Р.Р. Профессиональная патология у работников предприятия по добыче и переработке медных руд Республики Башкортостан // Санитар. врач. 2016. (9). 11–15.
26. Эльгаров А., Калмыкова М., Апишева Е., Эльгаров М., Шогенова А. Эпидемиология артериальной гипертензии у работающих женщин // Врач. 2017. (3). 18–22.
27. Attarchi M., Dehghan F., Safakhah F. Effect of exposure to occupational noise and shift working on blood pressure in rubber manufacturing company workers // Ind. Health. 2012. 50. 205–213.
28. Cassar A. Chronic coronary artery disease: diagnosis and management // Mayo Clin. Proc. 2009. 84. (12). 1130–1146.
29. Chang T.Y., Wang V.S., Hwang B.F., Yen H.Y., Lai J.S., Liu C.S., Lin S.Y. Effects of co-exposure to noise and mixture of organic solvents on blood pressure // J. Occup. Health. 2009. 51. 332–339.
30. Vangelova K.K., Deyanov C.E. Blood pressure and serum lipids in industrial workers under intense noise and a hot environment // Rev. Environ. Health. 2007. 22. 303–311.

PREVALENCE OF BLOOD CIRCULATION DISEASES AMONG WORKERS EXPOSED TO OCCUPATIONAL NOISE IN MINERAL EXTRACTION AND THEIR WORK-RELATEDNESS

Elmira Radikovna SHAYKHLISLAMOVA, Alfiya Dinislamovna VOLGAREVA,
Marina Prokopievna OBUKHOVA, Galina Gininovna GIMRANOVA,
Liliya Kazymovna KARIMOVA, Elvira Timeryanovna VALEEVA

*Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology of Rospotrebnadzor
450106, Ufa, Stepan Kuvykin str., 94*

The purpose of the study was to assess work-related diseases of blood circulation among workers occupationally exposed to noise in mineral extraction. **Material and methods.** Working conditions, health status of 1481 workers of leading occupations of oil and ore minerals extraction along with the assessment of cardio-vascular system functional state according to electrocardiography, eye fundus vessels, systemic microhemodynamics and blood microcirculation of bulbar conjunctiva have been studied. **Results and discussion.** Workers of these occupations are exposed to a complex of work environment and work process factors with occupational noise as a priority one. Blood circulation diseases are detected two times more frequently among workers than in the control group. Arterial hypertension frequency increases with age and work experience; a reliable increase is observed among individuals with work experience of 11–15 years and more than 15 years as compared to the group of workers with 6–10-year work experience and less than 5 years. On electrocardiographic examination, changes in the heart have been revealed in 54.2 % of workers engaged in ore extraction and 42.9 % of workers of oil extraction. Cerebrovascular diseases in most workers have been diagnosed along with arterial hypertension and atherosclerotic processes confirmed by changes in the eye fundus vessels. Thus, the elevated prevalence and an increase in arterial hypertension frequency due to work experience do not exclude potential impact of hazardous working conditions on its formation. The significant role of working conditions for arterial hypertension development has been established among operators of overhaul and underground repair of wells, drift miners, machinists of loading and delivery machines, aggregates and excavators. This is the foundation for the development of measures for creating safe working conditions and prevention of blood circulation diseases.

Key words: working conditions, mineral extraction, occupational noise, blood circulation diseases, arterial hypertension, cerebrovascular diseases.

Shaikhislamova E.R. – candidate of medical science, senior researcher, e-mail: shajkh.ehlmira@yandex.ru

Volgareva A.D. – candidate of medical science, senior researcher, e-mail: ad-volgareva@yandex.ru

Obukhova M.P. – candidate of medical science, doctor-ophthalmologist, e-mail: ovompo@yandex.ru

Gimranova G.G. – doctor of medical sciences, deputy director for scientific and organizational and methodical work, gala.gim@mail.ru

Karimova L.K. – doctor of medical sciences, professor; chief researcher, e-mail: iao_karimova@rambler.ru

Valeeva E.T. – doctor of medical sciences, head of the department of workers' health protection, oozr@mail.ru

РЕЗУЛЬТАТЫ ИНВАЗИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ЭПИЛЕПТИЧЕСКИМ ТИПОМ ТЕЧЕНИЯ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Алексей Леонидович КРИВОШАПКИН^{1,2,3}, Кирилл Юрьевич ОРЛОВ^{1,2},
Анна Сергеевна БРУСЯНСКАЯ¹, Глеб Сергеевич СЕРГЕЕВ³,
Алексей Сергеевич ГАЙТАН^{2,3}, Александр Евгеньевич СИМОНОВИЧ²

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина
Минздрава России*

630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

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

³ *Европейский медицинский центр
129090, г. Москва, ул. Щепкина, 35*

Цель исследования – оценить влияние объема выключения мальформации на течение структурной эпилепсии и нейрофизиологические данные. **Материал и методы.** В исследование включена серия из 207 первичных пациентов с артериовенозными мальформациями (АВМ) головного мозга и эпилептическим типом течения. Электроэнцефалографическое исследование до и после оперативного лечения проводилось 81 пациенту, 103 больным было выполнено тотальное выключение АВМ из кровотока, 96 пациентов подверглись парциальной, 8 – субтотальной эмболизации АВМ. Катамнез наблюдения составил не менее одного года после лечения. Проведены изучение течения структурной эпилепсии и нейрофизиологический анализ данных. Эффективность лечения структурной эпилепсии оценивалась по шкалам Engel и ILAE. **Результаты.** В группе с тотально выключенной АВМ I класс по шкале Engel был получен в 74,8 % случаев (77 пациентов), по шкале ILAE – в 58,3 % случаев (60 человек), в группе с парциально эмболизированной АВМ – соответственно в 40,4 % случаев (42 пациента) и в 20,2 % случаев (21 человек), что достоверно хуже (по шкале Engel $F = 5,1$, по шкале ILAE $F = 5,8$, $p < 0,01$). Субтотальная эмболизация позволила получить I класс по шкале Engel в 62,5 % случаев (5 пациентов), отсутствовала статистически значимая разница в сравнении с тотальным и парциальным выключением ($p > 0,05$). По данным нейрофизиологического контроля исследовались любые изменения биоэлектрической активности (БЭА), такие как наличие эпилептической и медленноволновой активности, акцента на полушарие, где локализована АВМ, дезорганизация и диффузные изменения БЭА. В целом в группе тотального выключения АВМ улучшение БЭА отмечалось в 17,1 % случаев, в группе парциальной эмболизации – в 2,5 % случаев ($p = 0,065$). Таким образом, тотальное выключение АВМ из кровотока обеспечивает достоверно лучший контроль над эпилептическими приступами, что сочетается с более частым улучшением БЭА (регресс эпилептической или медленноволновой активности) по данным ЭЭГ.

Ключевые слова: артериовенозная мальформация, структурная эпилепсия, нейрофизиологическое исследование, эпилептические приступы, ЭЭГ.

Кривошапкин А.Л. – д.м.н., проф., чл.-кор. РАН, врач-нейрохирург, главный научный сотрудник, зав. кафедрой нейрохирургии, e-mail: alkr01@yandex.ru

Орлов К.Ю. – к.м.н., врач-нейрохирург, руководитель центра ангионеврологии и нейрохирургии, e-mail: orlov72@mail.ru

Брусаянская А.С. – врач-невролог центра ангионеврологии и нейрохирургии, e-mail: asbr83@mail.ru

Сергеев Г.С. – врач-нейрохирург, e-mail: dr.gssergeev@gmail.com

Гайтан А.С. – к.м.н., врач-нейрохирург, e-mail: lanceter@mail.com

Симонович А.Е. – д.м.н., проф. кафедры нейрохирургии, врач-нейрохирург, e-mail: alsimonovich@yandex.ru

Артериовенозные мальформации (АВМ) являются врожденной аномалией сосудистого русла, характеризующейся формированием конгломерата извитых патологических сосудов без капиллярного русла. Частота распространенности АВМ головного мозга в популяции варьирует от 1,12 до 1,42 случаев на 100 тыс. населения; 38–68 % всех первичных АВМ головного мозга проявляются развитием кровоизлияния, риск повторного разрыва составляет 2,1–4,1 % в год [8]. Кроме того, по данным литературы риск первичного разрыва АВМ в течение 10 и 20 лет составляет 16 и 29 % соответственно, а повторного – 35 и 45 % через 10 и 20 лет соответственно [22]. Торпидный тип течения у пациентов, страдающих АВМ головного мозга с клиникой эпилепсии, встречается, по данным разных авторов, в 20–67 % случаев [4, 7, 8, 13, 14]. Считается, что торпидный тип течения более характерен для АВМ высокой градации по классификации Спецлера – Мартина [8]. Определены параметры АВМ, которые с наибольшей вероятностью могут вызвать развитие эпилепсии: расположение в коре головного мозга, питание из средней мозговой артерии, отсутствие аневризм и наличие варикозов в венозном дренаже [30]. Кроме того, сосудистый клубок обладает раздражающим действием на головной мозг за счет эффекта обкрадывания его структур, вызывая прогрессирование неврологического дефицита [1, 3–6, 11].

Абсолютными показаниями к инвазивному лечению являются разорвавшиеся АВМ, вопрос лечения неразорвавшихся мальформаций до сих пор остается дискуссионным. Некоторые считают, что такие АВМ требуют хирургического вмешательства, по мнению других, таких пациентов надо вести консервативно, третьи говорят о том, что данную когорту пациентов необходимо только наблюдать, так как риск негативных последствий использования любых методов инвазивного лечения превышает риски естественного течения заболевания [7]. Так, международное многоцентровое рандомизированное исследование ARUBA показало, что на протяжении 33 месяцев наблюдения медикаментозное лечение имеет преимущество перед интервенционным (микрохирургия, эндоваскулярная эмболизация, радиохирurgia) для предупреждения смерти от инсульта у больных с неразорвавшимися АВМ [21]. Однако в этом исследовании не анализировали течения заболевания у пациентов с АВМ головного мозга, страдающих эпилептическими припадками. Кроме того, оно было проведено более 5 лет назад. В настоящее время с совершенствованием хирургической методики лечения пациентов значительно снизились риски периоперационных осложнений и летальности. Появляется все больше работ, по-

священных эндоваскулярному методу лечения АВМ головного мозга [9, 12, 14]. По мнению ряда авторов, наличие эпилептических припадков ухудшает прогноз естественного течения АВМ, так как риск их разрыва после эпилептического приступа значительно повышается и составляет 27,5 % [1].

На сегодняшний день для лечения больных с АВМ применяют симптоматическую терапию и наблюдение, эндоваскулярную эмболизацию, микрохирургическое удаление мальформации и радиохирurgia. Все методы инвазивного лечения направлены на тотальное выключение АВМ из кровотока с целью исключения риска кровоизлияния, ликвидации феномена обкрадывания мозга, снижения или регресса неврологического дефицита, а также контроля над эпилептическими приступами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проходило на базе Центра ангионеврологии и нейрохирургии Национального медицинского исследовательского центра имени академика Е.Н. Мешалкина. Исследование одноцентровое, когортное, ретроспективное. С января 2010 г. по июнь 2018 г. прооперировано 582 первичных пациента с АВМ головного мозга, 254 (43,6 %) из которых имели эпилептические приступы. У 47 больных (18,5 %) в анамнезе (до госпитализации в Центр ангионеврологии и нейрохирургии) были эпизоды внутричерепных кровоизлияний, эти пациенты исключены из исследования. Всем вошедшим в исследование первым этапом проводилось эндоваскулярное лечение. При условии отсутствия доступных для эмболизации аферентов выполнялось последующее микрохирургическое удаление АВМ (МХ) либо проводилось стереотаксическое облучение (СРХ).

В настоящем исследовании проведен анализ результатов инвазивного лечения 207 пациентов с АВМ, страдающих эпилептическими приступами, но не имеющих в анамнезе истории внутричерепных кровоизлияний. Все пациенты данной группы имели фармакорезистентное течение эпилепсии с низкой эффективностью противозачемного лечения. В исследование вошло 127 лиц мужского пола и 80 лиц женского пола, среди них было 14 детей (от 6 до 17 лет) и 193 взрослых пациента. Средний возраст пациентов составил 36 лет. Характеристики выбранных пациентов представлены в табл. 1. Кроме того, учитывалась частота эпилептических приступов. Количественная оценка степени выраженности эпилепсии в зависимости от частоты повторения

Таблица 1

Характеристики включенных в исследование пациентов, n (%)

Характеристика	Общее количество пациентов	Тотальная эмболизация	Парциальная эмболизация	МХ	СРХ	p
Количество	207	103	104	26	19	
Мужчины	127 (61,4)	31 (53,4)	72 (69,2)	17 (65,4)	7 (36,8)	0,023
SP A	49 (23,7)	28 (48,3)	8 (7,7)	8 (30,7)	5 (26,2)	< 0,001
SP B	92 (44,4)	24 (41,4)	45 (43,3)	15 (57,9)	8 (42,1)	
SP C	66 (31,9)	6 (10,3)	51 (49,0)	3 (11,4)	6 (31,2)	
Генерализованные приступы	119 (57,5)	39 (67,3)	53 (51,0)	14 (53,8)	13 (68,4)	0,359
Простые фокальные приступы	33 (15,9)	6 (10,3)	21 (20,1)	4 (15,4)	2 (10,5)	
Сложные фокальные приступы	17 (8,3)	5 (8,6)	9 (8,7)	0 (0)	3 (15,8)	
Вторично-генерализованные приступы	16 (7,7)	4 (6,9)	9 (8,7)	3 (11,5)	0 (0)	
Смешанные	22 (10,6)	4 (6,9)	12 (11,5)	5 (19,3)	1 (5,3)	
Лобная доля	52 (25,1)	16 (27,6)	26 (25,0)	6 (23,1)	3 (15,8 %)	< 0,001
Височная доля	38 (18,4)	13 (22,4)	14 (13,5)	6 (23,1)	5 (26,4)	
Затылочная доля	23 (11,1)	8 (13,8)	10 (9,6 %)	3 (11,5)	2 (10,5)	
Теменная доля	43 (20,8)	18 (31,0)	15 (14,4)	8 (30,8)	2 (10,5)	
Более одной доли	51 (24,6)	3 (5,2)	39 (37,5)	3 (11,5)	7 (36,8)	

Примечание. SP – классификация пациентов по градации Спецлера – Мартина (тип А – I–II градация, тип В – III градация, тип С – IV–V градация); p – уровень значимости различий между группами парциальной и тотальной эмболизации.

приступов, разработанная В.В. Голиковой под руководством В.Б. Смычка для детей [2], в настоящее время широко используется в экспертизе нетрудоспособности пациента. Комбинированные приступы представляли собой наличие у пациента и генерализованных, и фокальных приступов и оценивались по частоте обоих видов приступов; распределение пациентов по частоте приступов было следующим: редкие – 73 (35,3 %), средние – 57 (27,5 %), частые – 49 (23,7 %), очень частые – 28 (13,5 %).

Перед началом оперативного лечения и после него 81 пациенту была проведена электроэнцефалография (ЭЭГ). В исследовании запись ЭЭГ проводилась на 19-канальном электроэнцефалографе «Нейро-спектр-3», расположение электродов по стандартной системе «10–20». Данные ЭЭГ подвергались стандартной компьютерной обработке с помощью встроенного программного обеспечения. Нейрофизиологическое исследование после лечения проводилось непосредственно после этапной эмболизации или после тотального выключения АВМ, когда пациент находился в стационаре. По данным нейрофизиологического исследования была проанализирована БЭА по следующим характеристикам: наличие эпилептической активности, медленноволновой активности, акцента на полушарие, где локализована АВМ, дезорганизации БЭА, легких диффузных изменений БЭА и нормальных данных БЭА.

После лечения пациенты находились под наблюдением не менее 12 месяцев. Через 6 месяцев проводилась контрольная церебральная ангиография (при условии тотального выключения АВМ) или этапное лечение (при условии парциальной эмболизации АВМ). По прошествии одного года результаты инвазивного лечения оценивались по шкалам Engel и ILAE на поликлиническом приеме или по телефону.

Статистический анализ данных проводился в группах с парциальным и тотальным выключением АВМ из кровотока при помощи критериев Стьюдента и χ^2 . Был выполнен анализ групп пациентов до хирургического лечения. Группы с тотальным и парциальным выключением оказались неоднородными по градации Спецлера – Мартина и локализации АВМ, однако была отмечена статистическая однородность групп по типу эпилептических приступов (см. табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На момент написания статьи у 103 пациентов достигнуто тотальное выключение АВМ из кровотока. В этой группе использованы следующие методы лечения: эндоваскулярная эмболизация (ЭВЭ) – 58 (56,3 %), ЭВЭ + МХ – 26 (25,3 %), ЭВЭ + СРХ – 19 человек (18,4 %). Данные пациентов с тотальным выключением АВМ в зависимости от метода инвазивного лечения представлены

Таблица 2

Характеристика пациентов с тотальным выключением АВМ, n (%)

Характеристика	ЭВЭ	ЭВЭ + МХ	ЭВЭ + СРХ
Мужчины	31 (53,4)	17 (65,4)	7 (36,8)
SP A	28 (48,3)	8 (30,8)	5 (26,3)
SP B	24 (41,4)	15 (57,7)	8 (42,1)
SP C	6 (10,3)	3 (11,5)	6 (31,6)
Генерализованные приступы	39 (67,3)	14 (53,8)	13 (68,4)
Простые фокальные приступы	6 (10,3)	4 (15,4)	2 (10,5)
Сложные фокальные приступы	5 (8,6)	0 (0)	3 (15,8)
Вторично-генерализованные приступы	4 (6,9)	3 (11,5)	0 (0)
Смешанные	4 (6,9)	5 (19,3)	1 (5,3)
Лобная доля	16 (27,6)	6 (23,1)	4 (21,1)
Височная доля	13 (22,4)	6 (23,1)	4 (21,1)
Затылочная доля	8 (13,8)	3 (11,5)	2 (10,5)
Теменная доля	18 (31,0)	8 (30,8)	2 (10,5)
Более одной доли	3 (5,2)	3 (11,5)	7 (36,8)

в табл. 2. У восьми больных была достигнута субтотальная эмболизация, остальные 96 имели парциальную эмболизацию АВМ. Учитывая, что пациенты с субтотальной эмболизацией являются хирургически незаконченными случаями, они были объединены с группой пациентов с парциальной эмболизацией. Данные по шкале Engel, полученные в группе больных с тотально выключенной АВМ, представлены на рис. 1, а. Установлено, что эти пациенты более чем в 70 % случаев имели полную свободу от приступов; все технологии инвазивного лечения давали хороший результат избавления от припадков, однако не имели статистически значимой разницы по методу вмешательства ($p > 0,05$). По шкале ILAE в данной группе получены схожие результаты (рис. 1, б). Метод выключения АВМ не имел достоверных преимуществ в эффективности освобождения больных от приступов ($p = 0,075$).

Из рис. 2 видно, что в группе с парциально эмболизированной мальформацией 1 класс по шкалам Engel и ILAE получен существенно реже, чем в группе с тотальным выключением АВМ (соответственно $F = 5,1$, $F = 5,8$, $p < 0,01$). Парциальная эмболизация АВМ позволяла улучшить контроль над эпилептическими приступами. Продемонстрирована значимая связь между объемом выключения АВМ и частотой эпилептических приступов ($p < 0,05$) (рис. 3). По результатам оценки данных ЭЭГ (рис. 4), улучшение в группе тотально выключенной АВМ было в 17,1 % случаев, в группе частичного выключения – в 2,5 % ($p = 0,065$). Вероятно, для динамики ЭЭГ имеют значение временные рамки, в связи с чем изменения БЭА не имели выраженной динамики, так как нейрофизиологическое исследование проводилось непосредственно после оперативного вмешательства.



Рис. 1. Результаты по шкалам Engel (а) и ILAE (б) в группах пациентов с тотально выключенной АВМ в зависимости от метода лечения

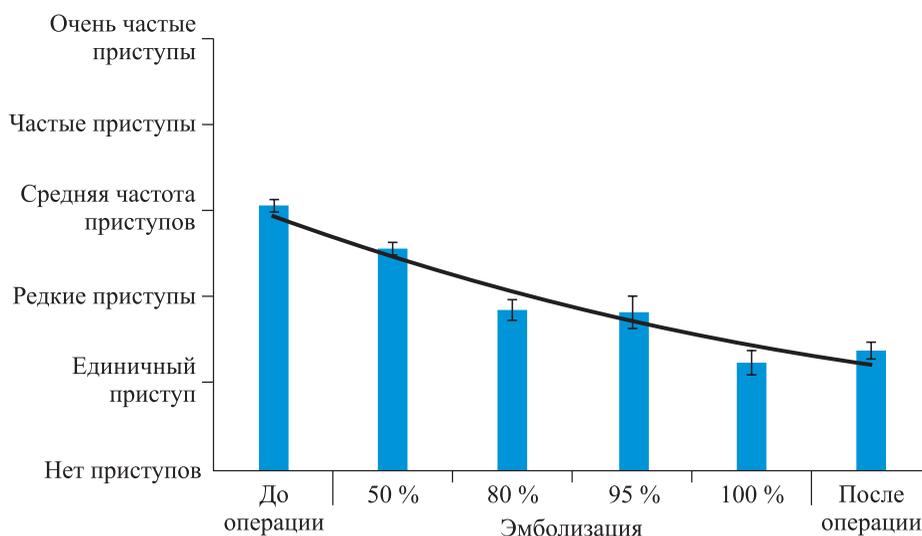


Рис. 2. Результаты по шкалам Engel (а) и ILAE (б) в группах пациентов с парциально и тотально выключенной АВМ

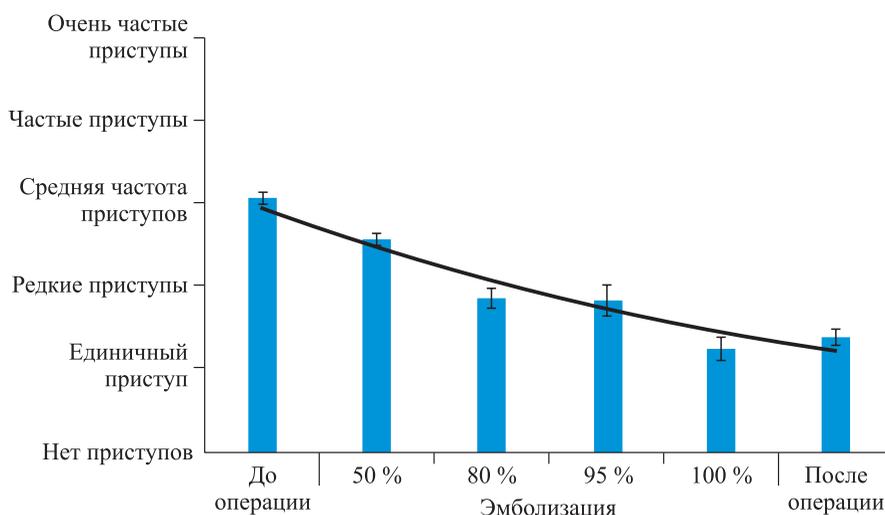


Рис. 3. Среднее значение частоты эпилептических приступов в общей когорте на разных этапах инвазивного лечения в зависимости от объема выключенной АВМ

За период лечения и наблюдения были получены осложнения как после тотального выключения, так и после парциальной эмболизации АВМ. В группе с тотально выключенной АВМ было восемь осложнений (7,8%), из них три ишемических и пять геморрагических. Осложнения возникали после ЭВЭ – два случая (1,9%) и после МХ – шесть случаев (5,8%). Восстановление функций (от 1 до 3 баллов по шкале Рэнкина) было у пяти пациентов. Глубокая инвалидизация (4 балла по

шкале Рэнкина) сохранилась у трех пациентов. В группе с парциально эмболизированной АВМ было получено 11 осложнений (10,6%), из них восемь ишемических и три геморрагических. Разная степень восстановления (от 1 до 3 баллов по шкале Рэнкина) наступила у всех пациентов. Летальность в группе с тотальным выключением АВМ составила 0,9% – погиб один пациент в результате развития массивного внутримозгового кровоизлияния в первые сутки после эмболизации. В группе

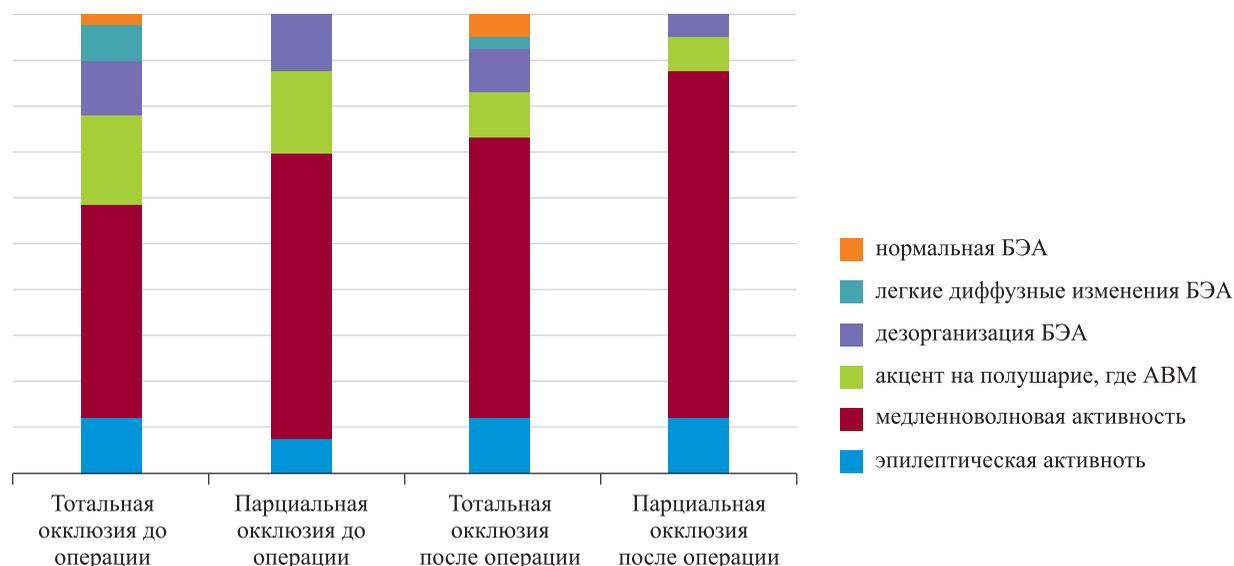


Рис. 4. Динамика БЭА по данным ЭЭГ до и после лечения

частичного выключения АВМ летальных случаев в стационаре не было. В отдаленном периоде два пациента погибли после парциальной эмболизации (вероятная причина – кровоизлияние вследствие разрыва АВМ, по словам родственников). Эпилепсия *de novo* среди 328 пациентов с АВМ головного мозга, не имевших эпилептических приступов до инвазивного лечения, наблюдалась у 25 человек, что составило 7,6 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм развития эпилепсии при АВМ до сих пор не известен. В АВМ нет нейронов, но сосуды обладают раздражающим действием на кору. Риск развития эпилептических приступов при случайно обнаруженных АВМ низкий (8 % в 5 лет) или 1,1 % на человека в год [11]. Если у пациента было кровоизлияние, то риск развития эпилепсии в последующие 5 лет увеличивается до 23 %. А лица, у которых был один эпилептический приступ, имеют риск развития приступов в течение 5 лет в 58 % случаев. У молодых риск выше: в возрасте от 10 до 19 лет он составляет 44 %, в возрасте более 30 лет – 6 % [30].

Анализ литературы показывает, что наиболее эффективным способом тотального выключения АВМ является ее микрохирургическое удаление [6, 10, 16, 31]. Однако не все АВМ головного мозга доступны для такого способа лечения, это касается АВМ высокой градации по классификации Спецлера – Мартина (IV–V). У данной группы больных он связан с высокой смертностью и инвалидизацией [26]. Кроме того, по данным литературы, риск развития эпилептических приступов *de novo* после микрохирургической резекции

АВМ составляет от 3 до 31,6 % [13, 29] и даже 35,7 % [32]. Хирургия может создать новые очаги эпилепсии за счет манипуляций на паренхиме мозга и его сосудах [23].

Развитие технологий внутрисосудистых вмешательств позволило первой линией лечения больных с АВМ головного мозга сделать эндоваскулярные операции [17, 28]. При крупных и гигантских АВМ применяют комбинированную терапию с использованием эндоваскулярной методики с последующим микрохирургическим или лучевым лечением [18, 33]. Метод эндоваскулярной эмболизации оказался эффективным в лечении пациентов с АВМ и структурной эпилепсией. Совершенствование технологии внутрисосудистых вмешательств показывает значительное улучшение результатов в отношении сокращения периоперационных осложнений с высокой радикальностью выключения АВМ [19, 20, 25, 27]. Появились исследования, демонстрирующие хороший результат по шкале Engel в лечении структурной эпилепсии методом тотальной эмболизации АВМ [15]. Структурная эпилепсия у пациентов с АВМ головного мозга практически всегда является фармакорезистентной и связана с наличием функционирующей АВМ. Наиболее часто (до 63 %) встречаются генерализованные эпилептические приступы [4]. В связи с этим данные приступы могут угрожать жизни пациента или окружающих его людей, что определяет необходимость использования инвазивных технологий лечения. Однако, несмотря на многочисленные исследования в данной области, нет четкого алгоритма ведения таких пациентов, что требует дальнейшего изучения этапного выключения АВМ из церебрального кровотока [24].

Нами получены хорошие результаты лечения пациентов с эпилептическим типом течения АВМ головного мозга в отношении контроля над эпилептическими приступами после комбинированной инвазивной терапии. Радикальность выключения АВМ имела статистическую значимость для свободы от приступов: тотальное выключение позволяла обеспечить лучший контроль над приступами в сравнении с парциальной эмболизацией. Кроме того, по результатам лечения наших пациентов мы имели более низкий процент эпилепсии *de novo* и летальных осложнений в сравнении с литературными данными. Таким образом, можно сделать вывод о целесообразности современного мультимодального лечения пациентов с АВМ головного мозга и эпилептическим типом течения с целью избавления от эпилептических приступов и предотвращения смертельных кровоизлияний.

ВЫВОДЫ

1. Тотальное выключение АВМ обеспечивает эффективный контроль над эпилептическими приступами с избавлением от припадков более чем у 70 % больных.

2. Риск инвалидизации вследствие современного инвазивного лечения больных с АВМ головного мозга и эпилептическими припадками не превышает риск естественного течения заболевания.

3. Эндovasкулярная эмболизация АВМ показывает высокий процент избавления пациентов от эпилептических приступов, не уступая микрохирургической и радиохимирургической методикам лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев С.А., Зуев А.А. Разрыв внутрочерепных артериовенозных мальформаций: патогенез, клиника, лечение // Неврол. журн. 2008. 12. (5). 47–51.

2. Голикова В.В. Медико-социальная экспертиза ограничения жизнедеятельности у детей с эпилепсией // Мед. новости. 2013. (1). 41–44.

3. Григорян А. Сосудистые заболевания головного мозга. Ереван: Принтинфо, 2006. 144 с.

4. Кривошапкин А.Л., Брусянская А.С., Орлов К.Ю., Гайтан А.С., Сергеев Г.С. Контроль эпилептических приступов у больных с артериовенозными мальформациями после эндovasкулярного лечения // Нейрохирургия. 2017. (3). 27–33.

5. Филатов Ю.М. Артериовенозные аневризмы больших полушарий головного мозга: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1972.

6. Шанько Ю.Г., Смянович В.А. Современные принципы диагностики и лечения церебральных артериовенозных мальформаций // *Ars Medica*. 2009. (3). 16–29.

7. Arteriovenous malformations // *The Neurosurgeon's Handbook* / Ed. G. Samandouras. Oxford Univ. Press, 2010. 588–598.

8. Abecassis I.J., Xu D.S., Batjer H.H., Bendok B.R. Natural history of brain arteriovenous malformations: a systematic review // *Neurosurg. Focus*. 2014 E7.

9. Abud D.G., Riva R., Nakiri G.S., Padovani F., Khawaldeh M., Mounayer C. Treatment of brain arteriovenous malformations by double arterial catheterization with simultaneous injection of Onyx: Retrospective series of 17 patients // *Am. J. Neuroradiol*. 2010. 32. (1). 152–158.

10. Baranoski J.F., Grant R.A., Hirsch L.J., Visintainer P., Gerrard J.L., Günel M., Matouk C.C., Spencer D.D., Bulsara K.R. Seizure control for intracranial arteriovenous malformations is directly related to treatment modality: a meta-analysis // *J. Neurointerv. Surg*. 2013. 6. (9). 684–690.

11. Crawford P.M., West C.R., Chadwick D.W., Shaw M.D. Arteriovenous malformations of the brain: natural history in unoperated patients // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1986. 49. (1). 1–10.

12. Elhammady M.S., Heros R.C. Onyx and arteriovenous malformations // *J. Neurosurg*. 2011. 115. (1). 75–77.

13. Englot D.J., Young W.L., Han S.J., McCulloch C.E., Chang E.F., Lawton M.T. Seizure predictors and control after microsurgical resection of supratentorial arteriovenous malformations in 440 patients // *Neurosurgery*. 2012. 71. (3). 572–580.

14. Heros R.C., Korosue K., Diebold P.M. Surgical excision of cerebral arteriovenous malformations: late results // *Neurosurgery*. 1990. 26. (4). 570–578.

15. Hoh B.L., Carter B.S., Ogilvy C.S. Small AVMs // *Oper. Tech. Neurosurg*. 2003. 6. (2). 89–94.

16. Hyun S.-J., Kong D.-S., Lee J.-I., Kim J.-S., Hong S.-C. Cerebral arteriovenous malformations and seizures: differential impact on the time to seizure-free state according to the treatment modalities // *Acta Neurochir*. 2012. 154. (6). 1003–1010.

17. Krivoshapkin A., Orlov K., Brusyanskaya A., Berestov V., Gaytan A., Sergeev S. Whether first line embolization and subsequent microsurgery is solution to control seizures in patients with cerebral AVMs or not? // *Controversies and solutions in neurosurgery: abstr. Congr., Venice, October 1–5, 2017. Venice, 2017*. 598.

18. Krivoshapkin A.L., Melidy E.G. Microsurgery for cerebral arteriovenous malformation management: a Siberian experience // *Neurosurg. Rev*. 2005. 28. (2). 124–130.

19. Le Feuvre D., Taylor A. Target embolization of AVMs: Identification of sites and results of treatment // *Interv. Neuroradiol*. 2007. 13. (4). 389–394.

20. Lv X., Li Y., Jiang C., Yang X., Wu Z. Brain arteriovenous malformations and endovascular treatment: Effect on seizures // *Interv. Neuroradiol.* 2010. 16. (1). 39–45.
21. Mohr J.P., Parides M.K., Stapf C., Moquete E., Moy C.S., Overbey J.R., Al-Shahi Salman R., Vicaut E., Young W.L., Houdart E., Cordonnier C., Stefani M.A., Hartmann A., von Kummer R., Biondi A., Berkefeld J., Klijn C.J., Harkness K., Libman R., Barreau X., Moskowitz A.J. Medical management with or without interventional therapy for unruptured brain arteriovenous malformations (ARUBA): a multicentre, non-blinded, randomised trial // *Lancet.* 2014. 383. (9917). 614–621.
22. Morgan M.K., Davidson A.S., Assaad N.N.A., Stoodley M.A. Critical review of brain AVM surgery, surgical results and natural history in 2017 // *Acta Neurochir.* 2017. 159. (8). 1457–1478.
23. Morgan M.K., Johnston I.H., Hallinan J.M., Weber N.C. Complications of surgery for arteriovenous malformations of the brain // *J. Neurosurg.* 1993. 176–182.
24. Osipov A., Koennecke H.C., Hartmann A., Young W.L., Pile-Spellman J., Hacein-Bey L., Mohr J.P., Mast H. Seizures in Cerebral Arteriovenous Malformations: Type, Clinical Course, and Medical Management // *Interv. Neuroradiol.* 1997. 3. (1). 37–41.
25. Panagiotopoulos V., Gizewski E., Asgari S., Regel J., Forsting M., Wanke I. Embolization of intracranial arteriovenous malformations with ethylene-vinyl alcohol copolymer (Onyx) // *Am. J. Neuroradiol.* 2008. 30. (1). 99–106.
26. Reinard K.A., Pabaney A.H., Basheer A., Phillips S.B., Kole M.K., Malik G.M. Surgical management of giant intracranial arteriovenous malformations: A single center experience over 32 years // *World Neurosurg.* 2015. 84. (6). 1765–1778.
27. Saatci I., Geyik S., Yavuz K., Cekirge H.S. Endovascular treatment of brain arteriovenous malformations with prolonged intranidal Onyx injection technique: long-term results in 350 consecutive patients with completed endovascular treatment course // *J. Neurosurg.* 2011. 115. (1). 78–88.
28. Strauss I., Frolov V., Buchbut D., Gonen L., Maimon S. Critical appraisal of endovascular treatment of brain arteriovenous malformation using Onyx in a series of 92 consecutive patients // *Acta Neurochir.* 2013. 155. (4). 611–617.
29. Thorpe M.L., Cordato D.J., Morgan M.K., Herkes G.K. Postoperative seizure outcome in a series of 114 patients with supratentorial arteriovenous malformations // *J. Clin. Neurosci.* 2000. 7. (2). 107–111.
30. Turjman F., Massoud T.F., Sayre J.W., Vinuela F., Guglielmi G., Duckwiler G. Epilepsy associated with cerebral arteriovenous malformations: a multivariate analysis of angioarchitectural characteristics // *Am. J. Neuroradiol.* 1995. 16. (2). 345–350.
31. Von der Brölie C., Simon M., Esche J., Schramm J., Boström A. Seizure outcomes in patients with surgically treated cerebral arteriovenous malformations // *Neurosurgery.* 2015. 77. (5). 762–768.
32. Wang J.Y., Yang W., Ye X., Rigamonti D., Coon A.L., Tamargo R.J., Huang J. Impact on seizure control of surgical resection or radiosurgery for cerebral arteriovenous malformations // *Neurosurgery.* 2013. 73. (4). 648–656.
33. Zhao J., Wang S., Li J., Qi W., Zhao Y. Clinical characteristics and surgical results of 2086 patients with cerebral arteriovenous malformation // *Int. Congr. Ser.* 2004. 1259. 235–242.

THE RESULTS OF INVASIVE TREATMENT OF PATIENTS WITH BRAIN ARTERIOVENOUS MALFORMATIONS WITH SEIZURE

Alexey Leonidovich KRIVOSHAPKIN^{1,2,3}, Kirill Yuryevich ORLOV^{1,2},
Anna Sergeevna BRUSYANSKAYA¹, Gleb Sergeevich SERGEEV³,
Alexey Sergeevich GAYTAN^{2,3}, Alexandr Evgenyevich SIMONOVICH²

¹ Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center
n.a. Academician E.N. Meshalkin» Ministry of Health of the Russian Federation
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15

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

³ European Medical Center
129090, Moscow, Schepkin str., 35

Purpose: to estimate influence of volume malformation on the course of structural epilepsy and neurophysiological data. **Materials and methods:** The study included 207 patients with brain AVM and seizure. 81 patients (pts) were performed by EEG before and after treatment. 103 patients underwent total invasive treatment, 96 pts – partial embolization and 8 pts – subtotal embolization. Follow up was 12 months. Evaluation of treatment was carried out on a scale Engel and ILAE. **Results:** Patients underwent a total treatment of grade I on the Engel scale were in 74.8 % (77 pts), and 1 grade on the ILAE scale were in 58.3 % (60 pts). Patients with a partial embolization of grade I on the Engel scale were in 40.4 % (42 pts), and 1 grade on the ILAE scale were in 20.2 % (21 pts), which is significantly worse than in the group with total treatment (on the Engel scale $F = 5.1$, ILAE – $F = 5.8$, $p < 0.01$). The subtotal embolization let get the grade I on the Engel scale in 62.5 % (5 pts). There was no significant difference to total treatment and partial embolization ($p > 0.05$). By EEG investigated: epileptic and slow-wave activity, focus on the hemisphere, where AVM is localized, disorganization and diffuse changes in bioelectric activity (BA). The BA improvement was in 17.1 % pts in the total treatment group, and in partial embolization group – in 2.5 % pts. However, these data were not significant different ($p = 0.065$). So, total treatment of brain AVMs gives the better control of seizure and more often improves EEG data.

Key words: arteriovenous malformation, structural epilepsy, seizure, neurophysiological study, EEG.

Krivoshapkin A.L. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS chief researcher, chief of neurosurgical department neurosurgeon, e-mail: alkr01@yandex.ru

Orlov K.Yu. – candidate of medical sciences, neurosurgeon, chief of department of angonerology and neurosurgery, e-mail: orlov72@mail.ru

Brusyanskaya A.S. – neurologist of department of angonerology and neurosurgery, e-mail: asbr83@mail.ru

Sergeev G.S. – neurosurgeon, e-mail: dr.gssergeev@gmail.com

Gaytan A.S. – candidate of medical sciences, neurosurgeon, e-mail: lanceter@mail.com

Simonovich A.E. – doctor of medical sciences, neurosurgeon of the highest category, professor of the department of neurosurgery, e-mail: alsimonovich@yandex.ru