УДК 612.823 DOI: 10.15372/SSMJ20190401

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИХ ИЗУЧЕНИЮ

Елизавета Игоревна БОНЬ, Наталия Евгеньевна МАКСИМОВИЧ

Гродненский государственный медицинский университет
Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80

Нарушением функций митохондрий сопровождается любое заболевание, поэтому дальнейшее исследование функциональных особенностей митохондрий при различных патологиях в клинике и эксперименте, а также поиск новых диагностических маркеров перспективны и актуальны. Цель настоящего обзора – обобщение и систематизация данных литературы о морфофункциональных характеристиках и молекулярных иммуногистохимических маркерах, используемых для оценки функции митохондрий. Наиболее характерной особенностью этих органелл является наличие большого числа ферментов, участвующих в окислительном фосфорилировании и снабжении клетки энергией. Кроме того, митохондрии играют немаловажную роль в хранении и передаче наследственной информации, апоптозе и пластических процессах. Выделяют так называемые митохондриальные болезни, связанные с генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий, в том числе приводящими к энергодефициту клеток. Они передаются по женской линии, так как только яйцеклетка содержит митохондрии. Известны наследственные митохондриальные заболевания, связанные с мутациями генов, кодирующих синтез митохондриальных белков, – синдром Барта, синдром Кернса – Сейра, синдром Пирсона и др. Существует ряд молекулярных маркеров, использование которых позволяет детально изучить активность митохондрий при различных экспериментальных воздействиях. Известно около тысячи митохондриальных маркеров, но в настоящем обзоре представлены основные.

Ключевые слова: митохондрии, иммуногистохимические маркеры, энергетика клетки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Автор для переписки: Бонь Е.И., e-mail: e_bon@list.ru
Для цитирования: Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Морфофункциональная характеристика митохондрий и иммуногистохимические подходы к их изучению. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 5–11. doi: 10.15372/SSMJ20190401.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MITOCHONDRIA AND IMMUNOHISTOCHEMICAL APPROACHES TO THEIR STUDY

Lizaveta Igorevna BON, Nataliya Yevgenyevna MAKSIMOVICH

Grodno State Medical University
Republic Belarus, 230009, Grodno, Gorkogo str., 80

Violation of the functions of mitochondria is accompanied by any disease, so further study of the functional characteristics of mitochondria in various pathologies in the clinic and experiment, as well as the search for new diagnostic markers is promising and relevant. The purpose of this review is to summarize and systematize the literature data on morphofunctional characteristics and molecular immunohistochemical markers used to assess the function of mitochondria. The most characteristic feature of these organelles is the presence of a large number of enzymes involved in oxidative phosphorylation and energy supply to the cell. Also, the aim was to allocate so-called mitochondrial diseases associated with genetic, structural, biochemical defects of mitochondria, including those leading to energy deficiency of cells. Mitochondrial diseases are transmitted through the female line, since only the ovum contains mitochondria. Hereditary mitochondrial diseases associated with mutations in the genes encoding the synthesis of mitochondrial proteins – Bart's syndrome, Kearns – Sayre syndrome, Pearson's syndrome, and others are known. In addition, mitochondria are involved in the storage and transmission of hereditary information, apoptosis and plastic processes. There are a number of molecular markers, the use of which allows a detailed study of the activity of mitochondria under various experimental effects. The nearly thousand mitochondrial markers are known, but this review encloses the main ones.

Key words: mitochondria, immunohistochemical markers, cell energy.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.
Correspondence author: Bon L.I., e-mail: e_bon@list.ru
Citation: Bon L.I., Maksimovich N.E. Morphofunctional characteristics of mitochondria and immunohistochemical approaches to their study. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 5–11. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190401.

Наиболее характерной особенностью митохондрий является наличие большого числа ферментов, участвующих в окислительном фосфорилировании и снабжении клетки энергией. Кроме того, митохондрии играют немаловажную роль в хранении и передаче наследственной информации, апоптозе и пластических процессах [7, 15, 18, 24, 26, 33]. Цель данного обзора – обобщение и систематизация данных литературы о морфофункциональных характеристиках и молекулярных иммуногистохимических маркерах, используемых для оценки функции митохондрий.

Митохондрии – очень подвижные и пластичные органеллы, которые постоянно изменяют свою форму и сливаются друг с другом, а затем вновь разделяются. Перемещение митохондрий в цитоплазме связано с микротрубочками, что определяет их ориентацию и распределение в клетке [4, 11]. Каждая митохондрия содержит высокоспециализированные мембраны, играющие ключевую роль в ее активности. Мембраны образуют два изолированных митохондриальных компартмента: внутренний матрикс и узкое межмембранное пространство. Каждый отдел содержит уникальный набор белков [12, 18, 33].

В состав наружной мембраны входит белок порин, который образует широкие гидрофильные каналы в липидном бислое, в результате чего мембрана напоминает сито, проницаемое для всех молекул массой менее 10 000 дальтон. Основная функциональная часть митохондрии – матрикс и окружающая его внутренняя мембрана. Внутренняя мембрана содержит большое количество «двойного» фосфолипида кардиолипина (30 %), что обеспечивает ее непроницаемость для ионов, и отличается необычно высоким содержанием белка (около 70 % от веса). Многие из белков являются компонентами электронтранспортной цепи, поддерживающей протонный градиент на мембране. Другой большой белковый комплекс – фермент АТФ-синтаза, катализирующий синтез АТФ, через который протоны возвращаются в матрикс по электрохимическому градиенту [18, 28, 33].

Внутренняя мембрана образует в матриксе митохондрий сложную систему складок – крист, которые значительно увеличивают ее площадь. Кристам митохондрий в различных клетках свойственны морфологические особенности и различный состав ферментов. Во внутреннюю митохондриальную мембрану встроены ферменты дыхательной цепи, необходимые для процесса окислительного фосфорилирования, образующего основную часть АТФ, и транспортные белки, обусловливающие ее избирательную проницаемость [28]. Матрикс митохондрий имеет более вязкую консистенцию, чем цитоплазма клетки. В нем находятся ферменты, митохондриальная ДНК (мтДНК), рибосомы, органические соединения, ионы, в том числе кальция и магния. Ферменты матрикса участвуют в цикле Кребса, окислительном фосфорилировании, окислении пирувата и бета-окислении жирных кислот [24, 26, 33].

мтДНК содержит от двух до десяти идентичных кольцевых копий, отличных от кодирующих последовательностей универсальной ядерной ДНК; она кодирует рРНК, тРНК и субъединицы ферментов дыхательной цепи, в том числе семь субъединиц АТФ-синтазы, три субъединицы цитохромоксидазы и одну субъединицу убихинон-цитохром *c*-редуктазы. Информация о молекулах РНК и белков в основном считывается с более тяжелой наружной цепи мтДНК. В митохондриях существует собственная белоксинтезирующая система, представленная мелкими рибосомами [4, 24, 26].

Выделяют так называемые митохондриальные болезни, связанные с генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий, в том числе приводящими к энергодефициту клеток. Они передаются по женской линии, так как только яйцеклетка содержит митохондрии. Митохондриальная болезнь начинает проявляться в тот момент, когда большее число митохондрий большого количества клеток данной ткани приобретают мутантные копии ДНК (пороговая экспрессия).

Известны наследственные митохондриальные заболевания, связанные с мутациями генов, кодирующих синтез митохондриальных белков, – синдром Барта, синдром Кернса – Сейра, синдром Пирсона и др. Существуют наследственные болезни, связанные с патологией энергоснабжения клетки, – болезни соединительной ткани, синдром хронической усталости, гликогеноз, кар-

диомиопатия, мигрень, печеночная недостаточность, панцитопения, гипопаратиреоз, диабет, рахит и др. К наследственным митохондриальным болезням, связанным с нарушением энергетики клетки, относится дефицит цитохрома *c* (синдром Лея). Он характеризуется энцефалопатией, симметричными некрозами в головном и спинном мозге, атаксией, судорогами, задержкой умственного развития, гипотонией [9, 26].

В митохондриях протекает окислительный метаболизм, субстратом для которого служат главным образом жирные кислоты и пируват, образуемый в результате гликолиза в цитозоле. Эти вещества транспортируются из цитозоля в митохондриальный матрикс, где распадаются до двухуглеродных групп, присоединенных к ацетилкоферменту А (ацетил-СоА). В составе молекулы ацетил-СоА каждая ацетильная группа включается в цикл Кребса в качестве источника высокоэнергетических электронов. Электроны передаются в дыхательную цепь внутренней митохондриальной мембраны, где вследствие их переноса происходит извлечение энергии.

Так как большое количество высвобождаемой энергии используется ферментами внутренней мембраны для образования АТФ из АДФ, эти реакции называют окислительным фосфорилированием [2, 6, 16, 26]. При прохождении электронов по дыхательной цепи происходит их «откачивание» из матрикса. АТФ-синтаза использует энергию гидролиза АТФ для переноса H^+ через мембрану, а при достаточно большом протонном градиенте протоны начинают «течь» через фермент в обратном направлении, что сопровождается синтезом АТФ. Энергия, высвобождаемая в процессе переноса электронов по дыхательной цепи, аккумулируется в форме электрохимического протонного градиента на внутренней мембране митохондрий.

Таким образом, митохондрии осуществляют большую часть клеточных процессов окисления и производят почти весь АТФ животной клетки. В результате «откачивания» протонов из матрикса создается трансмембранный электрохимический протонный градиент, обусловленный мембранным потенциалом и разностью pH. Энергия трансмембранного градиента используется для синтеза АТФ. Это обеспечивает эффективный обмен АТФ и АДФ между митохондрией и цитозолем, что позволяет поддерживать в клетке высокий уровень энергии [23, 27]. Синтез АТФ – не единственный процесс, идущий за счет энергии электрохимического градиента. В матриксе, где находятся ферменты, участвующие в цикле Кребса и других метаболических реакциях, необходимо поддерживать высокие концентрации различных субстратов. Поэтому через внутреннюю мембрану должны транспортироваться различные несущие заряд субстраты. Их активно перекачивают против электрохимических градиентов встроенные в мембрану белки-переносчики. Энергия электрохимического протонного градиента используется также для переноса в матрикс ионов Ca^{2+}, которые играют важную роль в регуляции активности некоторых митохондриальных ферментов. Поглощение митохондриями ионов для удаления их из цитозоля имеет большое значение, их высокая концентрация в цитоплазме является опасной [2, 6, 24].

Одна из функций митохондрий – участие в образовании активных форм кислорода (АФК). Известно, что 1–2 % электронов при их переносе в дыхательной цепи идет на образование супероксидного анион-радикала $O_2^{\bullet-}$, который впоследствии преобразуется в перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал ($^{\bullet}OH$) согласно уравнению:

$$O_2 \xrightarrow{e} O_2^{\bullet-} \xrightarrow{e,\,2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e,\,H^+} H_2O + {}^{\bullet}OH$$

В норме АФК принадлежит роль мессенджеров, они поддерживают редокс-состояние клетки, участвуя в регуляции ее функциональной активности. К избыточной наработке АФК приводит несоответствие между донорами и акцепторами (O_2) электронов в дыхательной цепи, чему способствует как дефицит O_2 (гипоксия), так и его избыток, возникающий вследствие реоксигенации при восстановлении кровотока в ранее ишемизированной ткани (синдром ишемии-реперфузии). При взаимодействии $O_2^{\bullet-}$ с оксидом азота $NO^{\bullet}$ образуется мощный окислитель пероксинитрит ($ONOO^-$). Поэтому окислительный стресс может являться важным звеном патогенеза заболеваний гипоксического и реперфузионного генеза.

Одна из функций митохондрий – участие в апоптозе. Ряд условий способствует запуску митохондриального (внутреннего) пути апоптоза: гипоксия, дефицит факторов роста, усиление генерации в клетке АФК, необратимые повреждения ДНК и др. Он регулируется белками семейства Bcl-2, которые делятся на два класса. Белки первого класса, ингибирующие апоптоз, погружены в наружную мембрану митохондрий и регулируют проницаемость мембраны, а также уменьшают образование АФК; к их представителям относятся Bcl-2 и Bcl-XL.

Белки второго класса семейства Bcl-2 стимулируют развитие апоптоза. Они находятся в цитозоле, но после активации перемещаются к мембране митохондрий, где взаимодействуют с представителями первого класса семейства Bc1-2

с последующим ингибированием их функции. Представителями второго класса семейства Bc1-2 являются Bid, Bad, Bax и др. Активация белков второго класса семейства Bc1-2 вызывает повышение проницаемости внутренней мембраны митохондрии, вследствие чего происходят набухание матрикса митохондрии и разрыв наружной мембраны, меньшей по площади, чем внутренняя. При этом в мембране митохондрии образуется неселективный канал, увеличивающий ее проницаемость, что приводит к высвобождению цитохрома *c* и белка SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases), или Smac/Diablo, в цитозоль. Поступивший в цитоплазму цитохром *c* взаимодействует с белком Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) и привлекает каспазу-9, формируя при этом комплекс протеинов – апоптосому. Каспаза-9 в присутствии АТФ активируется, расщепляет и активирует каспазу-3, та в свою очередь расщепляет протеин цитоплазмы Bid, который после встраивания в мембрану митохондрии активирует каспазу-6 и каспазу-7. Белок SMAC, освободившийся из митохондрии, связывается с белками IAP (inhibitors of apoptosis), тем самым высвобождая каспазы [8, 31].

При повреждении митохондрий происходят нарушение синтеза АТФ, избыточное образование АФК, запуск апоптоза, повышается содержание Ca^{2+} в клетке с последующей активацией Ca^{2+}-зависимых ферментов (фосфолипаз, протеиназ, АТФаз, эндонуклеаз). Это приводит к деградации фосфолипидов, разрушению цитоскелета и клеточных мембран, дефициту энергии и фрагментации хроматина клеточного ядра.

Известно около тысячи молекулярных маркеров, использование которых позволяет детально изучить активность митохондрий при различных экспериментальных воздействиях, основные из них представлены в настоящем обзоре.

Маркеры энергетической функции митохондрий. *АТФ-синтаза (ATP synthase)* принадлежит к семейству альфа/бета АТФ-синтаз, в ее состав входят два структурных домена (F_1 – внемембранный катализатор и F_0 – протонный канал мембраны), соединенных центральным стержнем, который состоит из субъединиц γ, δ и ε и вместе с олигомером мембранной субъединицы представляет собой роторный домен фермента. Предполагается, что функция ε-субъединицы заключается в сборке остальных доменов фермента, ее мутация или дефицит снижает активность АТФ-синтазы. Изучение генов, необходимых для дифференцировки стволовых клеток, выявило важную роль митохондриальной АТФ-синтазы в этом процессе. Фермент способствует созреванию крист митохондрий во время дифференцировки путем димеризации и специфической регуляции АТФ-синтазного комплекса. Высокая активность АТФ-синтазы при раковых заболеваниях обусловлена активацией гликолиза, устойчивостью к апоптозу, повышенной миграцией и интенсивной пролиферацией опухолевых клеток [3, 20, 29].

SDHA (succinate dehydrogenase complex, subunit A) – член семейства оксидоредуктаз, является субъединицей сукцинатдегидрогеназы, которая входит в состав комплекса митохондриальной транспортной цепи электронов и отвечает за перенос электронов от сукцината на убихинон (коэнзим Q). Показано, что мутации SDHA способствуют развитию феохромоцитомы и почечной карциномы [1, 33].

COX7A2 (cytochrome c oxidase subunit 7A2) принадлежит к семейству цитохром *c*-оксидазы VIIa, предполагаемая функция – регуляция активности цитохром *c*-оксидазы. Белок является ценным прогностическим маркером исхода глиомы: пациенты с более высокой экспрессией COX7A2 имели большую продолжительность жизни [10]. У мышей с недостаточной экспрессией COX7A2 обнаружен более низкий, чем у интактных животных, уровень глюкозы в крови после инъекции инсулина и пирувата. Примечательно, что скорость синтеза АТФ в печени таких мышей была снижена. Полученные данные свидетельствуют о том, что опосредованное COX7A2 митохондриальное дыхание играет важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы, в связи с чем его нарушение будет способствовать патологии метаболических процессов. Белок экспрессируется в тканях с высоким потреблением энергии, таких как мозг, сердце, печень, а также при агрессивных формах рака молочной железы человека. Функционально COX7A2 способствует энергообразованию в эпителиальных клетках молочной железы, обеспечивая поддержание более высокой пролиферации, образованию опухолевых клонов и инвазии, тем самым способствуя развитию опухоли [25, 34].

COX_{IV} (cytochrome c oxidase subunit 4) – белок, который является одной из полипептидных цепей цитохром *c*-оксидазы, участвует в переносе электронов в митохондриях. Принадлежит к семейству оксидазы IV цитохрома *c*, характеризует эффективность цепи тканевого дыхания [22]. COX_{IV} может использоваться в качестве маркера колоректального рака. Большая часть энергии для опухолевой трансформации имеет митохондриальное происхождение. Различия в митохондриальной эффективности могут влиять на перерождение колоректальных аденоматозных полипов в аденокарциному. При тубулярных, ворсинчатых

аденомах и аденокарциноме отмечен более высокий уровень экспрессии COX_{IV}, чем при трубчатых полипах, что подтверждает важную роль белка в энергетическом метаболизме колоректальных клеток по мере их перехода от полипов к карциноме [32].

HADHA (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha) относится к семейству 3-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназ, является субъединицей фермента, участвующего в бета-окислении жирных кислот. Мутации в гене *HADHA* вызывают редкое аутосомно-рецессивное метаболическое расстройство, характеризующееся снижением активности митохондриального β-окисления жирных кислот [14].

Маркеры митохондриального пути апоптоза. *VDAC1 (voltage-dependent anion channel-1)/porin* – белок семейства поринов, обеспечивает диффузию гидрофильных молекул, участвует в регуляции объема клеток и апоптозе, способствуя формированию пор в наружной митохондриальной мембране [35]. При исследовании опухолевых клеток рака шейки матки обнаружено, что высокая экспрессия VDAC1 в значительной степени коррелирует с высокой частотой появления метастазов в лимфатические узлы и глубиной инвазии. Дальнейшее клиническое исследование подтвердило, что увеличение экспрессии VDAC1 связано с более низкой выживаемостью и может использоваться в качестве потенциального прогностического маркера для пациентов с раком шейки матки. Функциональное исследование показало, что подавление экспрессии VDAC1 снижает пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток.

AIF (apoptosis-inducing factor) принадлежит к FAD-зависимому семейству оксидоредуктаз, играет двойственную роль в контроле клеточного цикла. При апоптозе транслоцируется из митохондрий в ядро, где функционирует как проапоптотический фактор каспаза-независимого пути, тогда как в обычных условиях представляет собой антиапоптотический фактор благодаря оксидоредуктазной активности. Растворимая форма (AIFsol), обнаруженная в ядре, индуцирует независимую от каспазы фрагментацию хромосомной ДНК, а также активирует каспазу-7, тем самым индуцируя апоптоз. Играет важную роль в каспаза-независимой пикнотической гибели клеток, индуцированной перекисью водорода [8, 31].

Маркеры пластических процессов митохондрий. *Гексокиназа 1 (hexokinase 1)* – белок, принадлежащий к семейству гексокиназ, участвует в регуляции углеводного обмена и метаболизма гексозы. Содержит два домена, с доменом С связана каталитическая активность, а с доменом N – регуляторная. При экспериментальном моделировании болезни Паркинсона установлено накопление гексокиназы-1 в цитозоле вдали от ее обычного расположения в митохондриях [13].

Hsp60 (heat shock protein 60) принадлежит к семейству шаперонов, играющих большую роль в реализации адаптивных механизмов клетки. Участвует в транспорте митохондриальных белков, сборке макромолекул и созревании полипептидов, образующихся в митохондриальном матриксе [17]. Возможным источником аутоантигенов, экспрессируемых в тканях во время воспаления, являются белки теплового шока. Исследования показали, что Hsp60 может функционировать в качестве вакцины для подавления аутоиммунных воспалительных реакций, в том числе при ревматоидном артрите [30].

TOMM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20) функционирует как транзитный пептидный рецептор на поверхности наружной мембраны митохондрий, облегчая транслокацию синтезированных митохондриальных пробелков в цитозоле [11]. TOMM20 имеет различную экспрессию в опухолевых клетках. Так, клетки Рида – Штернберга (многоядерные клетки, обнаруживаемые в лимфоузлах при лимфоме Ходжкина) имеют высокую экспрессию TOMM20, в отличие от опухоль-ассоциированных макрофагов и лимфоцитов. Увеличение содержания белка в раковых клетках является признаком высокой метаболической гетерогенности между раковыми клетками и микроокружением опухоли и служит маркером неблагоприятного исхода заболевания [19].

Прохибитин (prohibitin) ингибирует синтез ДНК, возможно, участвует в регуляции активности митохондриального дыхания и активации мРНК. Мембранный прохибитин регулирует передачу сигналов мембранного транспорта, ядерный контролирует активацию транскрипции и клеточный цикл, локализованный в митохондриях стабилизирует митохондриальный геном и модулирует митохондриальный апоптотический путь. Кроме того, прохибитин может транслоцироваться в ядро или митохондрии при апоптозе [21].

Фратаксин (frataxin) играет важную роль во внутриклеточном гомеостазе железа: способствует биосинтезу гема и сборке железосерных кластеров, играет роль в защите от окислительного стресса благодаря способности катализировать окисление Fe^{2+} до Fe^{3+}, может хранить железо в виде ферригидрита (биоминерала, состоящего из октаэдров оксида и гидроксида железа) [5].

Нарушением функций митохондрий сопровождается любое заболевание, поэтому дальнейшее исследование функциональных особенностей митохондрий при различных патологиях в клинике и эксперименте, а также поиск новых диагностических маркеров перспективны и актуальны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baertling F., Sanchez-Caballero L., van den Brand M.A.M., Fung C.W., Chan S.H., Wong V.C., Hellebrekers D.M.E., de Coo I.F.M., Smeitink J.A.M., Rodenburg R.J.T., Nijtmans L.G.J. NDUFA9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect. *Clin. Genet*. 2018; 93: 111–118.

2. Boumans H., Grivell L.A., Berden J.A. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 4872–4877.

3. Boyer P.D. ATP synthase – past and future. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998; 1365: 3–9.

4. Brand M.D., Murphy M.P. Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rev*. 1987; 62: 141–193.

5. Britti E., Delaspre F., Feldman A., Osborne M., Greif H., Tamarit J., Ros J. Frataxin-deficient neurons and mice models of Friedreich ataxia are improved by TAT-MTScs-FXN treatment. *J. Cell. Mol. Med*. 2018; 22: 834–848.

6. Capaldi R.A., Darley-Usmar V., Fuller S., Millet F. Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. *FEBS Lett*. 1982; 138: 1–7.

7. Casey R.P. Membrane reconstitution of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1984; 768: 319–347.

8. Chao D.T., Korsmeyer S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol*. 1998; 16: 395–419.

9. Chen X., Lu J. Analysis of mitochondrial gene mutations in a child with Leigh syndrome. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2019; 36 (4): 318–321.

10. Deng S., Li Y., Yi G., Lei B., Guo M., Xiang W., Chen Z., Liu Y., Qi S. Overexpression of COX7A2 is associated with a good prognosis in patients with glioma. *J. Neurooncol*. 2018; 136 (1): 41–50.

11. Festa B.P., Chen Z., Berquez M., Debaix H., Tokonami N., Prange J.A., Hoek G.V., Alessio C., Raimondi A., Nevo N., Giles R.H., Devuyst O., Luciani A. Impaired autophagy bridges lysosomal storage disease and epithelial dysfunction in the kidney. *Nat. Commun*. 2018; 9: 161.

12. Hackenbrock C.R. Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem. Sci*. 1981; 6: 151–154.

13. Hauser D.N., Mamais A., Conti M.M., Primiani C.T., Kumaran R., Dillman A.A., Langston R.G., Beilina A., Garcia J.H., Diaz-Ruiz A., Bernier M., Fiesel F.C., Hou X., Springer W., Li Y., de Cabo R., Cookson M.R. Hexokinases link DJ-1 to the PINK1/parkin pathway. *Mol. Neurodegener*. 2017; 12: 70–77.

14. Hoffmann C., Hockele S., Kappler L., Hrabe de Angelis M., Haring H.U., Weigert C. The effect of differentiation and TGFß on mitochondrial respiration and mitochondrial enzyme abundance in cultured primary human skeletal muscle cells. *Sci. Rep*. 2018; 8: 737.

15. Holvoet P., Vanhaverbeke M., Geeraert B., de Keyzer D., Hulsmans M., Janssens S. Low cytochrome oxidase 1 links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis in mice and pigs. *PLoS One*. 2017; 12: e0170307.

16. Klingenberg M. Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocators from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1985; 456: 279–288.

17. Magnoni R., Palmfeldt J., Hansen J., Christensen J.H., Corydon T.J., Bross P. The Hsp60 folding machinery is crucial for manganese superoxide dismutase folding and function. *Free Radic Res*. 2014; 48: 168–179.

18. Mescher A.L. Junqueira's Basic Histology: text and atlas. 15th ed. N.Y.: McGraw-Hill, 2018.

19. Mikkilineni L., Whitaker-Menezes D., Domingo-Vidal M., Sprandio J. Hodgkin lymphoma: A complex metabolic ecosystem with glycolytic reprogramming of the tumor microenvironment. *Semin. Oncol*. 2017; 44: 218–225.

20. Pecina P., Nůsková H., Karbanová V., Kaplanová V., Mráček T., Houštěk J. Role of the mitochondrial ATP synthase central stalk subunits γ and δ in the activity and assembly of the mammalian enzyme. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg*. 2018; 1859 (5): 374–381.

21. Peng Y.T., Chen P., Ouyang R.Y., Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis*. 2015; 20 (9): 1135–1149.

22. Powell K.A., Davies J.R., Taylor E., Wride M.A., Votruba M. Mitochondrial localization and ocular expression of mutant Opa3 in a mouse model of 3-methylglutaconicaciduria type III. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2011; 52 (7): 4369–4380.

23. Prince R.C. The proton pump of cytochrome oxidase. *Trends Biochem. Sci*. 1988; 13: 159–160.

24. Sas K., Robotka H., Toldi J., Vécsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 2007; 15: 221–239.

25. Shiba S., Ikeda K., Horie-Inoue K., Nakayama A., Tanaka T., Inoue S. Deficiency of COX7RP, a mitochondrial supercomplex assembly promoting factor, lowers blood glucose level in mice. *Sci. Rep*. 2017; 7: 7606.

26. Silva S., Ghiarone T., Schreiber K., Grant D., White T., Frisard M., Sukhanov S., Chandrasekar B.,

Delafontaine P., Yoshida T. Angiotensin II suppresses autophagy and disrupts the ultrastructural morphology and function of mitochondria in mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol*. 2019. 126 (6): 1550–1562.

27. Slater E.C. The Q Cycle, an ubiquitous mechanism of electron transfer. *Trends Biochem. Sci*. 1983; 8: 239–242.

28. Srere P.A. The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment. *Trends Biochem. Sci*. 1982; 7: 375–378.

29. Teixeira F.K., Sanchez C.G., Hurd T.R., Seifert J.R., Czech B., Preall J.B., Hannon G.J., Lehmann R. ATP synthase promotes germ cell differentiation independent of oxidative phosphorylation. *Nat. Cell Biol*. 2015; 17 (5): 689–696.

30. Van Eden W., Jansen M., Ludwig I., Leufkens P. Heat shock proteins can be surrogate autoantigens for induction of antigen specific therapeutic tolerance in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol*. 2019; 10: 279.

31. Veis D.J., Sorenson C.M., Shutter J.R., Korsmeyer S.J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 1993; 75: 229–240.

32. Wallace L., Cherian A., Adamson P. Comparison of pre- and post-translational expressions of COXIV-1 and MT-ATPase 6 genes in colorectal adenoma-carcinoma tissues. *J. Carcinog. Mutagen*. 2018; 9: 1000319.

33. Young B. Wheater's Functional Histology: a text and colour atlas. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2013. 464 p.

34. Zhang K., Wang G., Zhang X., Hüttemann P.P., Qiu Y., Liu J., Mitchell A., Lee I., Zhang C., Lee J.S., Pecina P., Wu G., Yang Z.Q., Hüttemann M., Grossman L.I. COX7AR is a stress-inducible mitochondrial COX subunit that promotes breast cancer malignancy. *Sci. Rep*. 2016; 6: 31742.

35. Zhang X., Zhao X., Li Y., Zhou Y., Zhang Z. Long noncoding RNA SOX21-AS1 promotes cervical cancer progression by competitively sponging miR-7/VDAC1. *J. Cell. Physiol*. 2019; 234 (10): 17494–17504.

Сведения об авторах:

Бонь Е.И., к.б.н., e-mail: e_bon@list.ru
Максимович Н.Е., д.м.н., проф., e-mail: mne@grsmu.by

Information about authors:

Bon L.I., candidate of biological sciences, e-mail: asphodela@list.ru
Maksimovich N.Ye., doctor of medical sciences, professor, e-mail: mne@grsmu.by

УДК 616-092.4 DOI: 10.15372/SSMJ20190402

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА СПЕЦИФИЧНОЙ ЭНДОТЕЛИОТОКСИЧНОСТИ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

Дарья Кирилловна ШИШКОВА[1], Елена Анатольевна ВЕЛИКАНОВА[1], Ринат Авхадиевич МУХАМАДИЯРОВ[1], Арсений Евгеньевич ЮЖАЛИН[1], Юлия Александровна КУДРЯВЦЕВА[1], Анна Николаевна ПОПОВА[2], Дмитрий Михайлович РУССАКОВ[3], Антон Геннадьевич КУТИХИН[1]

[1] *НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6*

[2] *Институт углехимии и химического материаловедения ФИЦ угля и углехимии СО РАН 650000, г. Кемерово, просп. Советский, 18*

[3] *Кемеровский государственный университет 650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6*

Цель работы – идентифицировать механизм специфичной токсичности кальций-фосфатных бионов (КФБ) для эндотелия. **Материал и методы.** Искусственно синтезированные путем перенасыщения культуральной среды соответствующими солями КФБ и магний-фосфатные бионы (МФБ) были добавлены к культурам эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 и эндотелиальных клеток мыши линии 2H-11 с целью изучения пространственно-временных аспектов интернализации бионов эндотелиальными клетками методами просвечивающей электронной и конфокальной микроскопии, анализа влияния блокады вакуолярной H^+-АТФазы при помощи лизосомального ингибитора бафиломицина A1 на эндотелиотоксичность бионов, а также оценки экспрессии каспазы-3 и ее субстрата поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP-1). **Результаты.** КФБ поглощались эндотелиальными клетками уже через 1 ч после их добавления и были локализованы в лизосомах; спустя 4 ч наблюдалось выделение ионов кальция из лизосом в цитозоль, сопровождавшееся многократным повышением концентрации каспазы-3 и ее субстрата PARP-1. Добавление в культуральную среду бафиломицина A1 позволяло эндотелиальным клеткам избежать индуцируемой малорастворимыми КФБ гибели независимо от его дозы и времени экспозиции, при этом высокорастворимые МФБ не обладали эндотелиотоксичностью независимо от добавления бафиломицина A1. **Заключение.** Поглощаясь эндотелиальными клетками, КФБ инициируют их гибель вследствие своего растворения в лизосомах и последующего выделения в цитозоль ионов кальция, опосредованно активирующих каспазы. В свою очередь, МФБ не обладают эндотелиотоксичностью, поскольку при их растворении в лизосомах не происходит выделения ионов кальция. Таким образом, механизмом специфичной эндотелиотоксичности КФБ является лизосомально-опосредованная клеточная гибель.

Ключевые слова: бионы, фосфат кальция, гидроксиапатит, токсичность, эндотелий, лизосомы, клеточная гибель, атеросклероз.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Автор для переписки: Шишкова Д.К., e-mail: shishkovadk@gmail.com

Для цитирования: Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Мухамадияров Р.А., Южалин А.Е., Кудрявцева Ю.А., Попова А.Н., Руссаков Д.М., Кутихин А.Г. Изучение механизма специфичной эндотелиотоксичности кальций-фосфатных бионов. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 12–21. doi: 10.15372/SSMJ20190402.

LYSOSOME-DEPENDENT CELL DEATH DEFINES SPECIFIC ENDOTHELIAL TOXICITY OF CALCIUM PHOSPHATE BIONS

Daria Kirillovna SHISHKOVA[1], Elena Anatol'evna VELIKANOVA[1], Rinat Avkhadievich MUKHAMADIYAROV[1], Arseniy Evgen'evich YUZHALIN[1], Yuliya Aleksandrovna KUDRYAVTSEVA[1], Anna Nikolaevna POPOVA[2], Dmitriy Mikhaylovich RUSSAKOV[3], Anton Gennad'evich KUTIKHIN[1]

[1] *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases*
650002, Kemerovo, Sosnovy blvd., 6

[2] *Institute of Coal Chemistry and Material Science,*
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS
650000, Kemerovo, Sovetsky av., 18

[3] *Kemerovo State University*
650000, Kemerovo, Krasnaya str., 6

Aim of the study was to identify the mechanism of specific endothelial toxicity related to calcium phosphate bions (CPB). **Material and methods.** CPB and magnesium phosphate bions (MPB) were artificially synthesised through supersaturation of culture medium with respective salts and then added to human endothelial cells (EA.hy 926) and murine endothelial cells (2H-11) to study: 1) spatiotemporal aspects of bion internalisation by means of transmission electron microscopy and confocal microscopy; 2) whether blocking of H^+-ATPase by lysosomal inhibitor bafilomycin A1 affects endothelial toxicity of bions; 3) expression of caspase-3 and its substrate poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1). **Results.** CPB were internalized by endothelial cells as early as 1 h upon their addition and were localized in lysosomes; after 4 h, we detected release of calcium ions (Ca^{2+}) from lysosomes to cytosol accompanied by multifold increase in cleaved caspase 3 and its substrate PARP-1. Bafilomycin A1 rescued endothelial cells from death induced by slightly soluble CPB regardless of exposure time and dose; however, freely soluble MPB did not evince endothelial toxicity regardless of bafilomycin A1 addition. **Conclusion.** Upon internalization by endothelial cells, CPB cause their death due to dissolution in lysosomes and subsequent release of calcium ions into the cytosol, ultimately leading to cleavage of executioner caspases. MPB lack endothelial toxicity because their dissolution does not lead to release of calcium ions. Therefore, specific endothelial toxicity of CPB is defined by lysosome-dependent cell death.

Key words: bions, calcium phosphate, hydroxyapatite, toxicity, endothelium, lysosomes, cell death, atherosclerosis.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of funding. This study was supported by the complex program of SB RAS within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0546-2015-0011 «Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors».

Citation: Shishkova D.K., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Yuzhalin A.E., Kudryavtseva Yu.A., Popova A.N., Russakov D.M., Kutikhin A.G. Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 12–21. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190402.

Перенасыщение крови ионами кальция и фосфатами ассоциировано с атеросклерозом и его клиническими проявлениями, основными из которых являются ишемическая болезнь сердца, острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболевания периферических артерий [6, 11, 12]. Одним из физиологических механизмов поддержания минерального гомеостаза крови является образование кальций-фосфатных бионов (КФБ), которые представляют собой кристаллические частицы губчатой структуры диаметром ≤ 500 нм, состоящие из гидроксиапатита, карбонат-гидроксиапатита и ряда белков, включая ключевые ингибиторы эктопической кальцификации альбумин и фетуин-А [18]. Ранее нашей группой показано, что, защищая организм от массивной кальцификации средней оболочки артерий, КФБ, тем не менее, вызывают гибель эндотелиальных клеток в культуре и выделение ими провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6

и интерлейкина-8) [1, 10], а также индуцируют гипертрофию интимы [2, 10] и воспаление адвентиции [3] в аорте нормолипидемических крыс Wistar. В то же время, несмотря на неоднократно показанную в различных экспериментах специфичность эндотелиотоксического действия КФБ (в сравнении с магний-фосфатными бионами, (МФБ)) [1–3, 10], механизм этого эффекта остается неизвестным. Целью исследования было изучение механизма специфичной токсичности КФБ для эндотелиальных клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Искусственный синтез бионов. Все эксперименты по искусственному синтезу бионов проводились в стерильных условиях. КФБ были синтезированы искусственно путем последовательного добавления равных концентраций солевых растворов $CaCl_2$ («Sigma-Aldrich», США, 21115) и Na_2HPO_4 («Sigma-Aldrich», 94046) к питательной среде DMEM («Gibco», США, 41966029), содержащей фетальную бычью сыворотку («Gibco», 10500056). Для синтеза КФБ концентрация солей в среде после их добавления составляла 3 мМ, а доля фетальной бычьей сыворотки – 10 %. МФБ были также синтезированы искусственно при помощи последовательного добавления равных концентраций солевых растворов $MgCl_2$ («Sigma-Aldrich», 63069) и Na_2HPO_4 к питательной среде DMEM, содержащей фетальную бычью сыворотку. Концентрация солей в среде после их добавления составляла 20 мМ, а доля фетальной бычьей сыворотки – 10 %. Культивирование бионов проводили в течение суток при физиологических условиях (37 °C, 5 % CO_2, высокая влажность), после чего среду центрифугировали при 200 000 g («Optima MAX-XP», «Beckman Coulter», США) в течение часа, что позволило обеспечить осаждение бионов всего спектра размерности. После ультрацентрифугирования бионы ресуспендировали в бидистиллированной воде (для рентгеновской дифрактометрии) либо однократном фосфатно-солевом буфере (для экспериментов с клеточными культурами) до оптической плотности на длине волны 650 нм ($ОП_{650}$) в 0,08–0,10 («Multiskan GO», «Thermo Fisher Scientific», США), являющейся минимально измеримой концентрацией бионов в растворе. С целью получения сухого порошка для рентгеновской дифрактометрии суспензию бионов замораживали при –40 °C и подвергали лиофилизации в течение суток («FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System», «Labconco», США).

Рентгеновская дифрактометрия. Химические соединения, входящие в состав бионов, определяли путем анализа их лиофилизированного порошка методом рентгеновской порошковой дифрактометрии («Bruker D8 ADVANCE», «Bruker», США) с медной рентгеновской трубкой при 40 кВ. Дифрактометрию проводили по 2θ углу от 20 до 120° при скорости в 0,02° в секунду. Полученные спектры сравнивали с базой Объединенного комитета порошковых дифракционных стандартов для идентификации химической формулы соединения.

Культивирование клеток. Для экспериментов была использована культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926 (передана коллегами) и культура иммортализованных лимфатических эндотелиальных клеток мыши линии 2H-11 (American Tissue Culture Collection, CRL-2163). Пересев клеток проводили по достижении 80 % конфлюэнтности. Манипуляции с клетками проводились в стерильных условиях при 37 °C, 5 % CO_2 и высокой влажности.

Клеточная линия EA.hy 926 является гибридомой, которая была получена путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого человека линии A549 и сохраняет основные морфологические и функциональные особенности венозных эндотелиальных клеток человека. Клеточная линия 2H-11, полученная путем иммортализации первичной культуры лимфатических эндотелиальных клеток мыши вирусом SV40, также сохраняет основные морфологические и функциональные особенности лимфатических эндотелиальных клеток. Данные линии клеток культивировали в среде DMEM/F12 («Gibco», 11320074), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки, 2 % гипоксантина-аминоптерина-тимидина («Gibco», 21060017), 1 % HEPES-буфера («Sigma-Aldrich», H3537) и антибиотик-антимикотик («Gibco», 15240062: 10 000 ЕД/мл пенициллина, 10 000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина B).

Анализ интернализации бионов эндотелиальными клетками. Для оценки интернализации бионов эндотелиоцитами к клеткам линии EA.hy 926 в 6-луночных планшетах (2×10^5 клеток на лунку) добавляли суспензию КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера (100 мкл, $ОП_{650}$ = 0,08–0,10) на 48 ч, после чего проводили трипсинизацию в течение 10 мин. После центрифугирования клетки фиксировали в 2,5%-м глутаровом альдегиде (1 ч) и постфиксировали в 1%-м тетраоксиде осмия (1 ч). Клетки заключали в 2%-ю агарозу, обезвоживали в этаноле возрастающей концен-

трации (70 %, 80 % и трижды 95 % по 15 мин), помещали в смесь эпоксидной смолы и ацетона (1 : 1, 2 ч), затем пропитывали эпоксидной смолой (10 ч) и заключали в свежую эпоксидную смолу (60 °С, 24 ч). Срезы, полученные с помощью ультратома («LKB Bromma Nova Ultra», «LKB», США), помещали на медные сеточки с углеродным напылением, окрашивали 2%-м уранилацетатом, контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали при помощи просвечивающей электронной микроскопии («JEM-2100», «Jeol», Япония).

С целью подтверждения результатов просвечивающей электронной микроскопии осадок КФБ после ультрацентрифугирования ресуспендировали в растворе альбумина, меченного флуоресцеинизотиоцианатом («Invitrogen», США, A23015) в течение часа, после чего снова ультрацентрифугировали при 200 000 g (1 ч). Вносили 25 мкл суспензии КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера к клеткам линии EA.hy 926, культивированным на стеклах для конфокальной микроскопии, на 1, 2 или 4 ч с последующим добавлением лизосомального красителя LysoTracker Red («Invitrogen», L7528, 500 нМ) на 30 мин, ядерного красителя Hoechst 33342 («Invitrogen», H3570, 2 мкл/мл) на 15 мин и конфокальной микроскопией («LSM 700», «Carl Zeiss», Германия).

Анализ проницаемости лизосом. Для анализа влияния ацидификации лизосом на цитотоксичность бионов к клеткам линии EA.hy 926 в 96-луночных планшетах (80–85 % конфлюэнтности) добавляли суспензию МФБ или КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера (10 мкл, $ОП_{650}$ = 0,08–0,10, 12 лунок на группу) на 4 или 24 ч с добавлением или без добавления специфичного ингибитора вакуолярной H^+-АТФазы бафиломицина A1 («Abcam», Великобритания, ab120497, 0,1 или 1 мкМ), растворенного в диметилсульфоксиде (конечная концентрация в среде 0,6 %). Пролиферацию и жизнеспособность клеток оценивали колориметрически с помощью набора для анализа цитотоксичности клеток («Abcam», ab112118) согласно протоколу производителя.

Для оценки перехода ионов кальция из лизосом в цитозоль к клеткам линии EA.hy 926, культивированным на стеклах для конфокальной микроскопии, вносили 25 мкл суспензии КФБ либо аналогичный объем чистого однократного фосфатно-солевого буфера на 1, 2 или 4 ч с добавлением флуоресцентного детектора ионов кальция Fluo-3 AM («Invitrogen», F1242, 5 мкМ) на 1 ч, лизосомального красителя «LysoTracker Red» (500 нМ) на 30 мин и ядерного красителя «Hoechst 33342» (2 мкл/мл) на 15 мин с последующей конфокальной микроскопией.

Иммуноблоттинг. После добавления равных концентраций МФБ, КФБ или чистого однократного фосфатно-солевого буфера (100 мкл, $ОП_{650}$ = 0,08–0,10) к культурам клеток линии 2H-11 (80–85 % конфлюэнтности) на 24 ч и отмывки от остаточной культуральной среды охлажденным однократным фосфатно-солевым буфером проводили выделение белка посредством добавления 1 мл RIPA-буфера (0,15M NaCl, 1%-й NP-40, 1%-й дезоксихолат натрия, 0,1%-й додецилсульфат натрия и 0,025M Tris-HCl pH 7,6), дополненного коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз («Thermo Fisher Scientific», 78446). Для определения экспрессии белков и детекции посттрансляционных модификаций методом иммуноблоттинга 10 мкл белка (на каждую группу) смешивали с буфером Лэммли (4%-й додецилсульфат натрия, 20%-й глицерол, 10%-й 2-меркаптоэтанол, 0,004%-й бромфеноловый синий и 0,125M Tris-HCl pH 6,8) в отношении 1 : 1, нагревали в кипящей воде в течение 5 мин и далее загружали на 12-луночный гель NuPAGE® толщиной 1 мм, содержащий 4–12 % Bis-Tris («Invitrogen», NP0321BOX). В качестве маркера молекулярных масс применяли белковый стандарт «Precision Plus» («Bio-Rad», США, 1610374). Белки разделяли электрофорезом (100 В) в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в течение 1 ч. Белки на мембрану переносили при 30 В в течение 90 мин при 4 °С. Блоттинг проводили с антителами к расщепленной каспазе-3 (cleaved caspase-3, cCasp-3; «Abcam», ab49822) и расщепленной поли(АДФ-рибоза)-полимеразе (cleaved poly (ADP-ribose) polymerase, cPARP-1; «Abcam», ab194586). В качестве контроля загрузки был использован гистон H3 (histone H3; «Abcam», ab12079). Для хемилюминесцентной детекции результата использовали конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела козла («Abcam», ab205718). Белки визуализировали с использованием реагента для детекции «Amersham ECL Prime» («Sigma-Aldrich», GERPN2232) и цифрового сканера хемилюминесцентных блотов «C-DiGit» («LI-COR Bioscience», США s). Количественный анализ снимков хемилюминесцентных гелей проводился при помощи стандартного алгоритма в программе «ImageJ» (National Institutes of Health).

Статистический анализ. В силу относительно небольшого количества репликат нормальность распределения не оценивалась и использовались методы непараметрической статистики. Данные представлены в виде медианы и межквартильного расстояния. Различия между груп-

пами устанавливались при помощи критерия Манна – Уитни, статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электронная и конфокальная микроскопия выявили интернализацию КФБ (рис. 1), которая начиналась уже через 1 ч после их добавления к культурам эндотелиальных клеток, и их колокализацию КФБ с лизосомами (рис. 2). Отсутствие повреждений плазматической мембраны позволило выдвинуть гипотезу о том, что КФБ могут вызывать один из вариантов программированной гибели клеток, а не приводить к цитолизу (см. рис. 1). Было предположено, что внутрилизосомальное растворение КФБ после их интернализации сопровождается освобождением в цитозоль ионов кальция, что в конечном итоге приведет к активации каспаз и инициации клеточной гибели.

Воздействие бафиломицином А1 (соединением, ингибирующим вакуолярную H^+-АТФазу [4] и, следовательно, предотвращающим ацидификацию лизосомального содержимого [19]) частично спасало эндотелиальные клетки от вызванной КФБ гибели независимо от времени воздействия (4 или 24 ч) и дозы (0,1 или 1 мкМ) (рис. 3). Напротив, МФБ, состоящие из магния фосфата гидрата, который обладает более высокой растворимостью, чем характерный для КФБ гидроксиапатит (рис. 4), не проявляли эндотелиотоксичность независимо от присутствия бафиломицина А1 (см. рис. 3).

Через 1 ч после добавления КФБ к эндотелиальным клеткам наблюдалось смещение флуоресцентно детектируемых ионов кальция из лизосом в цитозоль (рис. 5). Следовательно, гибель эндотелиальных клеток связана с растворением КФБ и сопутствующим высвобождением ионов кальция из лизосом в цитозоль, а не с возможным осмотическим шоком, который возникал бы независимо от типа растворенных бионов из-за градиента ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} между лизосомами и цитозолем. Через 4 ч после добавления сфериче-

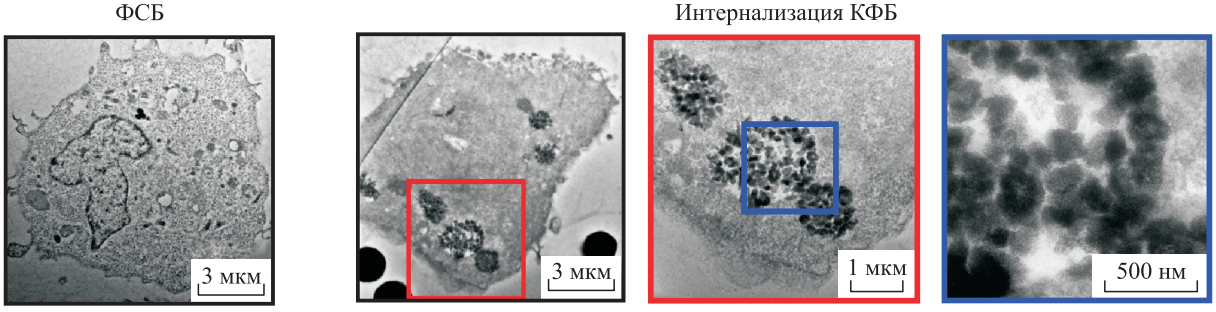

Рис. 1. *Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера или КФБ в течение 48 ч. Вставки показывают интернализированные КФБ. Просвечивающая электронная микроскопия*

Fig. 1. *EA.hy 926 cells, exposed to single phosphate-buffered saline or CPB for 48 hours. Inserts show internalized CPB. Transmission electron microscopy*

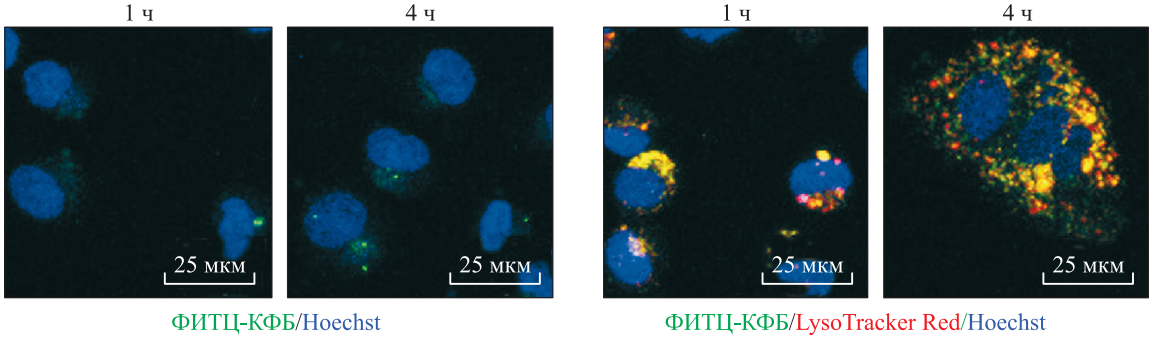

Рис. 2. *Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) КФБ в течение 1 или 4 ч и окрашенных лизосомальным красителем LysoTracker Red (справа) и ядерным красителем Hoechst 33342. Конфокальная микроскопия*

Fig. 2. *EA.hy 926 cells, exposed to fluorescein isothiocyanate (FITC) CPB for 1 or 4 hours and stained with lysosomal dye LysoTracker Red (right) and nuclear dye Hoechst 33342. Confocal microscopy*

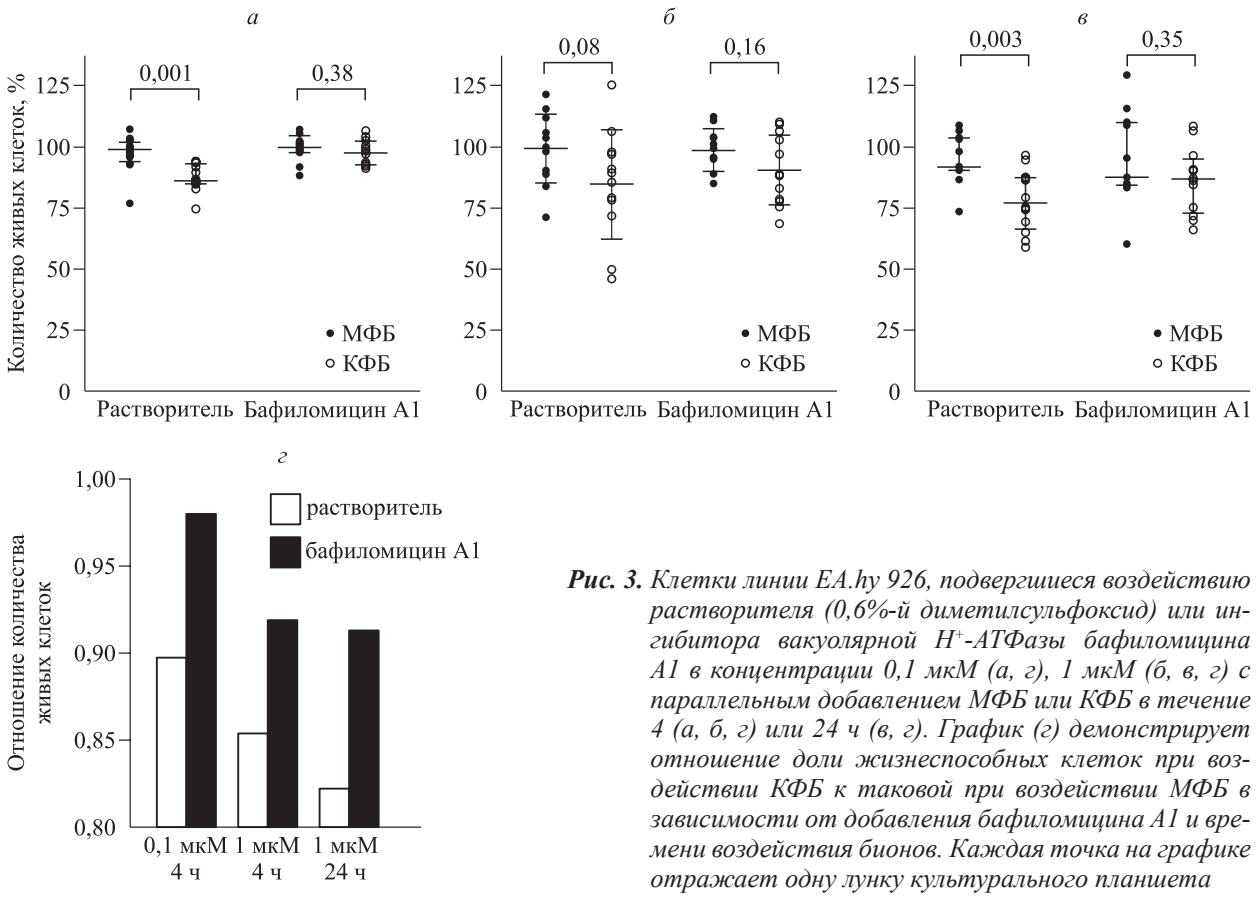

Рис. 3. *Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию растворителя (0,6%-й диметилсульфоксид) или ингибитора вакуолярной H^+-АТФазы бафиломицина А1 в концентрации 0,1 мкМ (а, г), 1 мкМ (б, в, г) с параллельным добавлением МФБ или КФБ в течение 4 (а, б, г) или 24 ч (в, г). График (г) демонстрирует отношение доли жизнеспособных клеток при воздействии КФБ к таковой при воздействии МФБ в зависимости от добавления бафиломицина А1 и времени воздействия бионов. Каждая точка на графике отражает одну лунку культурального планшета*

Fig. 3. *EA.hy 926 cells, exposed to a solvent (0.6% dimethyl sulfoxide) or vacuolar H^+-ATPase inhibitor bafilomycin A1 at a concentration of 0.1 μM (a, d), 1 μM (b, c, d) with parallel addition of MPB or CPB for 4 (a, b, d) or 24 hours (c, d). Graph (d) shows the ratio of the proportion of viable cells when exposed to CPB to that when exposed to MPB, depending on the addition of bafilomycin A1 and the time of exposure to bions. Each dot in the graph represents one well of the culture plate*

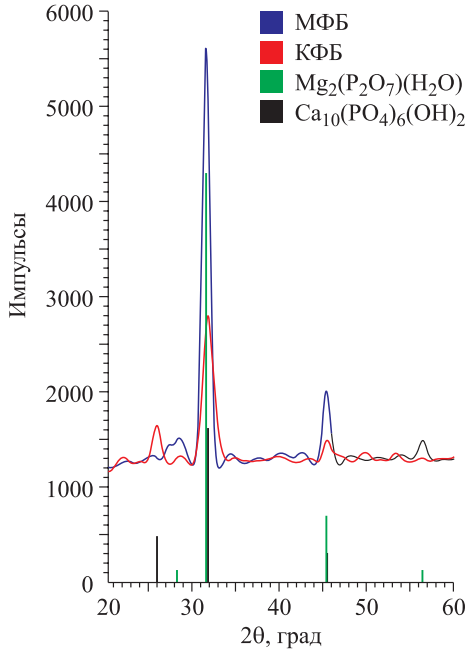

Рис. 4. *МФБ и КФБ состоят из высокорастворимого магния фосфата гидрата ($Mg_2(P_2O_7)(H_2O)$) и малорастворимого гидроксиапатита ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) соответственно. Рентгеновская порошковая дифрактометрия*

Fig. 4. *MPB and CPB consist of highly soluble magnesium phosphate hydrate ($Mg_2(P_2O_7)(H_2O)$) and poorly soluble hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), respectively. X-ray powder diffractometry*

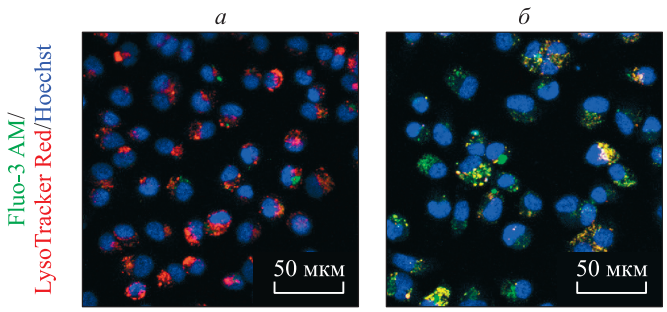

Рис. 5. *Клетки линии EA.hy 926, подвергшиеся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера (а) или КФБ (б) в течение 1 ч и окрашенные красителями Fluo 3-AM, LysoTracker Red и Hoechst 33342. В контрольных клетках лизосомы не содержат ионов кальция (красное окрашивание), которые в относительно небольшом количестве локализованы в цитозоле (зеленое окрашивание); в клетках, подвергшихся воздействию КФБ, ионы кальция расположены как в цитозоле (в большом количестве), так и в лизосомах (соответствующий наложению зеленого и красного желтый цвет, отражающий колокализацию ионов кальция и лизосом)*

Fig. 5. *EA.hy 926 cells, exposed to single phosphate-buffered saline (a) or CPB (b) for 1 hour and stained with Fluo 3-AM, LysoTracker Red and Hoechst 33342 dyes. In the control cells lysosomes do not contain calcium ions (red staining), which are located in a relatively small amount in the cytosol (green staining); in cells, exposed to CPB, calcium ions are located both in the cytosol (in large quantities) and in lysosomes (the yellow color corresponding to the superimposition of green and red, reflecting the co-localization of calcium ions and lysosomes)*

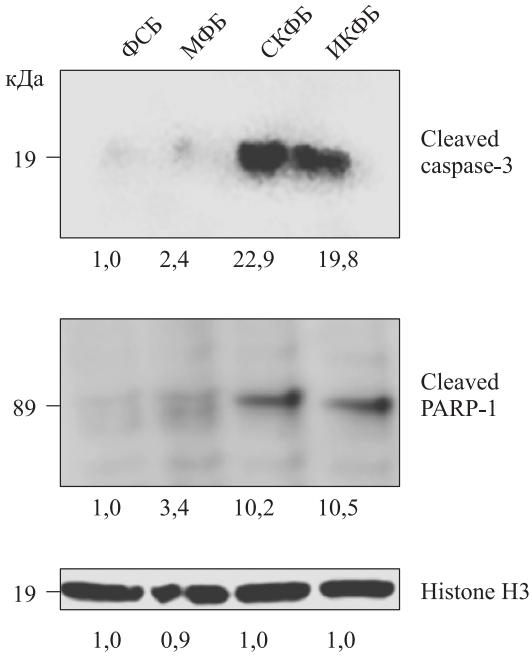

Рис. 6. *Эндотелиальные клетки линии 2H-11, подвергшиеся воздействию однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ), МФБ, сферических КФБ (СКФБ) или игольчатых КФБ (ИКФБ) в течение 24 ч. Числовые значения показывают плотность полос относительно контрольной группы (ФСБ).*

Fig. 6. *Endothelial cells of the 2H-11 line, exposed to single phosphate-buffered saline (PBS), MPB, spherical CPB, or needle CPB for 24 hours. The numerical values indicate the density of the bands relative to the control group (PBS)*

ских или игольчатых КФБ, но не МФБ или фосфатно-солевого буфера методом иммуноблоттинга было детектировано увеличение концентрации расщепленных форм каспазы-3 и ее субстрата PARP-1 (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что повышение концентрации ионов кальция в цитозоле является одним из триггеров увеличения проницаемости внешней мембраны митохондрий, в конечном итоге приводящего к активации запускающей клеточную гибель каспазы-3 [9]. Концентрация расщепленных форм как каспазы-3 (отражает ее активацию) [8, 14], так и ее субстрата, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы [17] (отражает инактивацию этого белка, ответственного за репарацию ДНК) [8, 14], увеличивалась в несколько раз через 4 ч после добавления сферических или игольчатых КФБ, но не МФБ или фосфатно-солевого буфера (см. рис. 6). Кроме того, в работах нашей группы [10] и коллег [20] ранее было продемонстрировано повышение концентрации расщепляющей каспазу-3 активной каспазы-9 (свидетельствующей об ее активации) [8, 14] при воздействии КФБ. В целом эти результаты указывают на лизосомально-опосредованную гибель клеток (тип клеточной гибели, отличаемый от остальных по первичному повышению проницаемости лизосом и активации каспазы-3 и -9) как вероятный механизм вызываемой КФБ клеточной гибели [7].

Данные результаты согласуются с полученными ранее на сосудистых гладкомышечных клетках [5, 21], однако противоречат другим работам, в которых было предположено, что КФБ вызывают разрыв мембраны лизосом вследствие создания осмотического градиента между лизосомальным матриксом и цитозолем [13, 15, 16]. Стоит отметить, что нарушение целостности мембраны лизосом в этих исследованиях определялось либо окрашиванием акридиновым оранжевым [13], либо просвечивающей электронной микроскопией [15, 16]. Оба данных метода не являются оптимальными для надежной детекции повреждения лизосомальной мембраны – акридиновый оранжевый недостаточно специфичен в качестве индикатора pH и не всегда демонстрирует стабильные результаты применительно к окрашиванию лизосом (репрезентативное изображение в работе [13] показывает полное отсутствие лизосом в клетке через 4 ч после добавления КФБ, что напрямую противоречит окрашиванию LysoTracker Red в наших экспериментах (см. рис. 4)), а визуализация разрушения лизосом методом просвечивающей электронной микроскопии весьма условна (что подтверждается полученными в этих исследованиях репрезентативными изображениями [15, 16]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При растворении в лизосомах КФБ инициируют гибель эндотелиальных клеток вследствие массивного выделения в цитоплазму ионов кальция, опосредованно активирующих каспазы, что соответствует механизму лизосомально-зависимой клеточной гибели. В то же время аналогичные КФБ по всем физико-химическим характеристикам (кроме более высокой растворимости) МФБ не вызывают токсических эффектов вследствие отсутствия выделения в цитоплазму ионов кальция при растворении в лизосомах, что доказывает специфичность эндотелиотоксического действия КФБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. *Комплекс. проблемы серд.-сосуд. заболеваний*. 2017; (1): 92–101.

Kutikhin A.G., Sinitsky M.Yu., Ponasenko A.V. The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2017; (1): 92–101. [In Russian].

2. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Кальций-фосфатные бионы специфично индуцируют гипертрофию поврежденной интимы у крыс. *Рос. кардиол. журн*. 2018; 23 (9): 33–38.

Shishkova D.K., Velikanova E.A., Krivkina E.O., Mironov A.V., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. Calcium-phosphate bions do specifically induce hypertrophy of damaged intima in rats. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2018; 23 (9): 33–38. [In Russian].

3. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Токсическое действие кальций-фосфатных бионов на адвентицию брюшной аорты крыс. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2018; (3): 37–43.

Shishkova D.K., Velikanova E.A., Krivkina E.O., Mironov A.V., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. Toxicity of calcium phosphate bions for aortic adventitia in rats. *Ateroskleroz i dislipidemii = The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias*. 2018; 3: 37–43. [In Russian].

4. Bowman E.J., Siebers A., Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988; 85 (21): 7972–7976.

5. Ewence A.E., Bootman M., Roderick H.L., Skepper J.N., McCarthy G., Epple M., Neumann M., Shanahan C.M., Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ. Res*. 2008; 103 (5): e28–e34.

6. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. Heart J*. 2008; 156 (3): 556–563.

7. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., de Laurenzi V., de Maria R., Debatin K.M., de Berardinis R.J., Deshmukh M., di Daniele N., di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M.,

Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E.A., Molkentin J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M.G., Villunger A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25 (3): 486–541.

8. Julien O., Wells J.A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017; 24 (8): 1380–1389.

9. Kumar S., Kasseckert S., Kostin S., Abdallah Y., Schafer C., Kaminski A., Reusch H.P., Piper H.M., Steinhoff G., Ladilov Y. Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12. *Cardiovasc. Res*. 2007; 73 (1): 172–180.

10. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filipev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovsky A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci. Rep*. 2016; 6: 27255.

11. Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L., Sundström J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. Arterioscler. *Thromb. Vasc. Biol*. 2010; 30 (2): 333–339.

12. Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J. Clin. Epidemiol*. 1997; 50 (8): 967–973.

13. Liu Z., Xiao Y., Chen W., Wang Y., Wang B., Wang G., Xu X., Tang R. Calcium phosphate nanoparticles primarily induce cell necrosis through lysosomal rupture: the origination of material cytotoxicity. *J. Mater. Chem*. *B*. 2014; 2: 3480–3489.

14. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015; 22 (4): 526–539.

15. Shyong Y.J., Wang M.H., Kuo L.W., Su C.F., Kuo W.T., Chang K.C., Lin F.H. Mesoporous hydroxyapatite as a carrier of olanzapine for long-acting antidepression treatment in rats with induced depression. *J. Control Release*. 2017; 255: 62–72.

16. Shyong Y.J., Wang M.H., Tseng H.C., Cheng C., Chang K.C., Lin F.H. Mesoporous hydroxyapatite as olanzapine carrier provides a long-acting effect in antidepression treatment. *J. Med. Chem*. 2015; 58 (21): 8463–8474.

17. Tewari M., Quan L.T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., Dixit V.M. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995; 81 (5): 801–809.

18. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One*. 2013; 8 (9): e75501.

19. Yoshimori T., Yamamoto A., Moriyama Y., Futai M., Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H^+-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem*. 1991; 266 (26): 17707–17712.

20. Yuan Y., Liu C., Qian J., Wang J., Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials*. 2010; 31 (4): 730–740.

21. Zhang C.Y., Sun X.Y., Ouyang J.M., Gui B.S. Diethyl citrate and sodium citrate reduce the cytotoxic effects of nanosized hydroxyapatite crystals on mouse vascular smooth muscle cells. *Int. J. Nanomedicine*. 2017; 12: 8511–8525.

Сведения об авторах:

Шишкова Д.К., e-mail: shishkovadk@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-1518-3888
Великанова Е.А., к.б.н., telella@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1079-1956
Мухамадияров Р.А., к.б.н., e-mail: rem57@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-1263-1158
Южалин А.Е., к.м.н., e-mail: yuzhalin@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-7454-6653
Кудрявцева Ю.А., д.б.н., e-mail: jackie1970@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6134-7468
Попова А.Н., к.х.н., e-mail: h991@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6970-9542
Руссаков Д.М., e-mail: dm.russakov@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5170-7530
Кутихин А.Г., к.м.н., e-mail: antonkutikhin@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-8679-4857

Information about authors:

Shishkova D.K., e-mail: shishkovadk@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-1518-3888
Velikanova E.A., candidate of biological sciences, e-mail: telella@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1079-1956
Mukhamadiyarov R.A., candidate of biological sciences, e-mail: rem57@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-1263-1158
Yuzhalin A.E., candidate of medical sciences, e-mail: yuzhalin@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-7454-6653
Kudryavtseva Yu.A., doctor of biological sciences, e-mail: jackie1970@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-6134-7468
Popova A.N., candidate of chemical sciences, e-mail: h991@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6970-9542
Russakov D.M., e-mail: dm.russakov@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5170-7530
Kutikhin A.G., candidate of medical sciences, e-mail: antonkutikhin@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-8679-4857

УДК 616-003.9:616-002.5 DOI: 10.15372/SSMJ20190403

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БЕЛКОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С ФИБРОПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ, В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ ПРИ РАЗВИТИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Петр Михайлович КОЖИН[1], Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ[1], Наталья Сергеевна ЗАЙЦЕВА[1], Марина Валерьевна ХРАПОВА[1], Лилия Александровна ЧЕРДАНЦЕВА[1,2], Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА[1], Александр Васильевич ТРОИЦКИЙ[1], Вячеслав Алексеевич ШКУРУПИЙ[1,3]

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

[2] *Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России*
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

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

В настоящем исследовании проведен анализ экспрессии генов белков, участвующих во внутриклеточных сигнальных путях, сопряженных с профибротическим ответом, активацией эпителиально-мезенхимального и эндотелиально-мезенхимального переходов, при моделировании туберкулезного гранулематоза и фармацевтических воздействиях. **Материал и методы.** Исследование проводили на мышах-самцах линии BALB/c двухмесячного возраста с массой тела 18–22 г. Генерализованный туберкулезный гранулематоз моделировали однократным внутривенным (ретроорбитально) введением 0,5 мг вакцины БЦЖ в 0,2 мл изотонического водного раствора NaCl (ФР), через 4 мес. часть мышей начинала получать препараты лечения, через 2 мес. животных выводили из эксперимента путем декапитации и выделяли легкие (через 6 мес. после введения вакцины БЦЖ). Мыши были разделены на шесть групп, по пять особей в каждой: интактные, которым внутривенно ретроорбитально вводили 0,2 мл ФР; инфицированные БЦЖ и получавшие внутрибрюшинные инъекции ФР; инфицированные БЦЖ и получавшие внутрибрюшинные инъекции раствора гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК); инфицированные БЦЖ и получавшие внутрибрюшинные инъекции раствора декстразида (конъюгат окисленного декстрана 40 кДа и ГИНК); инфицированные БЦЖ и получавшие внутрибрюшинно либо ингаляционно раствор молекулярно-наносомальных фармацевтических композиций окисленного декстрана (МНФК). По окончании эксперимента в ткани легкого мышей методом ПЦР в реальном времени определяли экспрессию мРНК матриксной металлопротеиназы-9, проколлагена типа III, TGF-β и транскрипционных факторов ZEB1 и Snai1. **Результаты.** Обнаружено, что моделирование генерализованного туберкулезного гранулематоза сопровождается индукцией эпителиально-мезенхимального перехода и активацией профибротических процессов, что через 6 мес. проявлялось в повышении экспрессии цепи α1 коллагена III типа и TGF-β. Назначение животным в течение 2 мес. традиционных (ГИНК) и оригинальных (декстразид, МНФК) препаратов с противотуберкулезной активностью обладает ингибирующей активностью разной степени выраженности в отношении различных маркеров данных процессов.

Ключевые слова: туберкулезный гранулематоз, фиброз, окисленный декстран, декстразид, матриксная металлопротеиназа-9, проколлаген типа III, TGF-β, ZEB1, Snai1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины.

Автор для переписки: Меньщикова Е.Б., e-mail: lemen@centercem.ru

Для цитирования: Кожин П.М., Чечушков А.В., Зайцева Н.С., Храпова М.В., Черданцева Л.А., Меньщикова Е.Б., Троицкий А.В., Шкурупий В.А. Экспрессия генов белков, сопряженных с фибропластическими процессами, в легких мышей при развитии туберкулезного воспаления. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39 (4): 22–29. doi: 10.15372/SSMJ20190403.

EXPRESSION OF PROTEIN GENES PARTICIPATING IN FIBROPLASTIC PROCESSES IN MICE LUNG DURING THE DEVELOPMENT OF TUBERCULOUS INFLAMMATION

Peter Mikhaylovich KOZHIN[1], Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV[1], Natal'ya Sergeevna ZAYTSEVA[1], Marina Valer'yevna KHRAPOVA, Liliya Aleksandrovna CHERDANTSEVA[1,2], Elena Bronislavovna MENSHCHIKOVA[1], Aleksandr Vasil'yevich TROITSKY[1], Vyacheslav Alekseevich SHKURUPY[1,3]

[1] *Research Institute for Experimental and Clinical Medicine of Federal Research Center for Basic and Translational Medicine*
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

[2] *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan*
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17

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

The study analyzes the expression of protein genes involved in intracellular signaling pathways associated with a profibrotic response, activation of epithelial-mesenchymal and endothelial-mesenchymal transitions, in modeling tuberculous granulomatosis and pharmaceutical effects. **Material and methods.** The study was performed on male BALB/c mice aged two months and weighing 18–22 g. Generalized tuberculous granulomatosis was simulated by a single intravenous (retro-orbital) injection of 0.5 mg BCG vaccine in 0.2 ml of isotonic aqueous NaCl solution (SS), after 4 months a part of mice started to receive treatment drugs, after 2 months the animals were sacrificed by decapitation (6 months after BCG vaccine administration) and their lung tissues were collected. Mice were divided into 6 groups, 5 males in each: intact, which were intravenously into the retro-orbital sinus injected with 0.2 ml SS (C); infected with BCG and receiving SS intraperitoneal injections (BS); infected with BCG and received intraperitoneal injections of isonicotinic acid hydrazide solution (INAH) (BI); infected with BCG and received intraperitoneal injections of dextrazide solution (conjugate of 40 kDa oxidized dextran and INAH) (BD); infected with BCG and received intraperitoneal or inhalation injections of solution of molecular-nanosomal pharmaceutical compositions of oxidized dextran (MNPC) (BMP and BMH, respectively). Finally, the expression of mRNA of matrix metalloproteinase 9, type III procollagen, TGF-β, and transcription factors ZEB1 and Snai1 was determined by real-time PCR in mice lung tissue. **Results.** The modeling of generalized tuberculous granulomatosis was found to be accompanied by the induction of epithelial-mesenchymal transition and the activation of profibrotic processes, which after 6 months was manifested in increase of the type III collagen α1-chain and TGF-β mRNA expression. Administration of traditional (INAH) and original (dextrazide, MNPC) preparations with anti-tuberculosis activity within two months has inhibitory activity of varying severity in relation to various markers of these processes.

Key words: tuberculous granulomatosis, fibrosis, oxidized dextran, dextrazide, matrix metalloproteinase 9, type III procollagen, TGF-β, ZEB1, Snai1.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Acknowledgments. This work was performed using the equipment of centre of collective usage «Modern Optical Systems» of Research Institute for Experimental and Clinical Medicine of Federal Research Center for Basic and Translational Medicine

Correspondence author: Menshchikova E.B., e-mail: lemen@centercem.ru

Citation: Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Zaytseva N.S., Khrapova M.V., Cherdantseva L.A., Menshchikova E.B., Troitsky A.V., Shkurupy V.A. Expression of protein genes participating in fibroplastic processes in mice lung during the development of tuberculous inflammation. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 22–29. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190403.

Фиброзирование является частым прогрессирующим ответом на хроническое воспаление. Накопление компонентов внеклеточного матрикса, продуцируемого активированными интерстициальными миофибробластами, в сочетании с нарушением его реорганизации приводит к нарушению нормальной архитектуры ткани и, тем самым, функции органа [10]. Белки семейства матриксной металлопротеиназы (MMP) участвуют в распаде внеклеточного матрикса в нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, размножение, ангиогенез, развитие костей, заживление ран, миграция клеток, обучение и память, а также в патологических процессах, таких как артрит, внутримозговое кровоизлияние, метастазы [9, 13]. К числу важных ферментов, участвующих в ремоделировании структур внеклеточного матрикса, относится MMP-9; данный фермент ассоциирован с многочисленными патологическими процессами, включая воспалительные, онкологические, иммунологические и сердечно-сосудистые заболевания [2]. Основу соединительной ткани организма составляют коллагены – фибриллярные белки, обеспечивающие ее прочность и эластичность; 95 % всего коллагена в дерме человека составляют коллагены I и III типов, коллаген III типа также содержится в других растяжимых соединительных тканях (легкие, сосудистая система), часто в сочетании с коллагеном типа I [15].

В процессе воспаления мононуклеары и макрофаги инфильтрируют область воспаления и секретируют различные цитокины, необходимые для клеточной миграции, активации, дифференцировки. Фибробласты активируются и дифференцируются в миофибробласты и начинают синтезировать белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, эластин, протеогликаны) для восстановления поврежденного матрикса и поддержания гомеостаза ткани. В физиологических условиях этот процесс достигается за счет баланса между уровнем синтеза белков внеклеточного матрикса и уровнем их разрушения за счет протеолитических ферментов.

Существует много сигнальных путей, приводящих к активации фибробластов (опосредованных TGF-β, IL-1β, IL-4, IL-6, EGF). К основным индукторам активации фибробластов относится TGF-β. Он принадлежит к Th1-цитокинам и синтезируется многими клетками, включая макрофаги, лимфоциты и фибробласты [3, 11]. TGF-β осуществляет передачу сигнала от поверхности клетки к ядру за счет активации Smad-сигнального пути. Цитокин связывается с конститутивно активным TGF-β-рецептором II, который стимулирует TGF-β-рецептор I и образует с ним активный комплекс, фосфорилирующий цитоплазматические сигнальные молекулы Smad2 и Smad3. Активированные Smad2 и Smad3 соединяются с Smad4, и образовавшийся комплекс транслоцируется в ядро, где взаимодействует со Smad-связывающим элементом, что в конечном итоге приводит к транскрипции целевых генов и синтезу коллагена. TGF-β также активирует ингибирующую сигнальную молекулу Smad7, которая взаимодействует с рецептором TGF-β и блокирует фосфорилирование Smad2/3, контролируя таким образом магнитуду сигнального ответа на TGF-β за счет образования петли негативной обратной связи [3, 11]. Существуют альтернативные пути передачи сигнала, например, MAP-киназный и PI3/Akt/PKB-киназный [12]. Образование большого количества коллагена может быть также связано с уменьшением количества репрессоров TGF-β-связанных сигнальных путей: Smad7, PPAR-γ, p53, Fli-1. Кроме того, цитокины TNF-α, IFN-γ снижают TGF-β-опосредованный синтез коллагена за счет активации супрессоров (NF-kB, STAT-1, AP-1).

Фибробласты являются основным источником белков внеклеточного матрикса. Изначально предполагалось, что зрелые фибробласты образуются из эмбриональных мезенхимальных клеток, а пролиферирующие резидентные фибробласты и циркулирующие фиброциты являются основным источником миофибробластов, участвующих в процессе фиброгенеза. Однако показано, что зрелые фибробласты также образуются из эпителиальных (эпителиально-мезенхимальный переход, ЭМП) и эндотелиальных клеток (эндотелиально-мезенхимальный переход) [3, 14]. Эпителиальные клетки приобретают фибробластоподобную морфологию и начинают экспрессировать маркеры фибробластов/миофибробластов, такие как FSP-1, α-SMA, N-кадгерин, виментин, теряя при этом эпителиальные маркеры – Е-кадгерин, окклюдин, десмоплакин. ЭМП характеризуется трансформацией эпителиальных и эндотелиальных клеток в мигрирующие и инвазивные мезенхимальные клетки. При этом происходит разъединение плотных и адгерентных контактов, растворение десмосом, потеря апикально-базальной ориентации клеток, реорганизация актинового цитоскелета и инициация миграции клеток.

Гиперактивация ЭМП играет важную роль в развитии и прогрессии фиброза в различных органах. Во время такого перехода происходит утрата эпителиальных и эндотелиальных маркеров и появление мезенхимальных маркеров (α-SMA, коллаген). Основным индуктором ЭМП являются белки семейства TGF-β, активирующие транскрипционные факторы семейства SMAD

[6], которые ингибируют транскрипцию эпителиальных генов и активируют гены транскрипционных факторов, участвующих в ЭМП, – Snail, ZEB и bHLH. Клетки первичного альвеолярного эпителия под воздействием TGF-β на протяжении 3–6 дней подвергаются трансформированию в фибробласты и миофибробласты [16]. Молекулярное репрограммирование, происходящее при ЭМП, управляется различными транскрипционными факторами (EMT-activating transcription factors): Snail, Twist, ZEB1 [5, 14]. Эти факторы работают как молекулярные переключатели, отвечающие за известные сигнальные пути, и регулируют ЭМП [3, 8]. Одновременно TGF-β активирует SMAD-независимые сигнальные каскады, которые необходимы для потери межклеточных контактов, а также активации пролиферации и миграции клеток: Rho ГТФазы, киназы ERK/MAP, PAR6 и PI_3 [7].

Интересно, что фиброз, опосредуемый различными этиологическими факторами, ассоциирован с активацией Th17-клеток, которая происходит при воздействии TGF-β и IL-6 на наивные Th-клетки [4]. Данные клетки рассматриваются как одна из причин фибротических осложнений, их активность ассоциирована с тяжестью поражения легких [17].

В настоящем исследовании проведен анализ экспрессии генов белков, участвующих во внутриклеточных сигнальных путях, сопряженных с профибротическим ответом, активацией эпителиально-мезенхимального и эндотелиально-мезенхимального переходов, при моделировании туберкулезного гранулематоза и фармацевтических воздействиях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на мышах-самцах линии BALB/c двухмесячного возраста массой тела 18–22 г, полученных из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово). Генерализованный туберкулезный гранулематоз моделировали однократным внутривенным (ретроорбитально) введением 0,5 мг вакцины БЦЖ в 0,2 мл изотонического водного раствора NaCl (ФР) [1], через 4 мес. часть мышей начинала получать препараты лечения внутрибрюшинно либо ингаляционно по описанной ниже схеме, выведение из эксперимента путем декапитации – через 2 мес. после начала назначения препаратов (через 6 мес. после введения вакцины БЦЖ). Животные были разделены на шесть групп, по пять особей в каждой. Группа «К» – интактные мыши, которым внутривенно ретроорбитально вводили 0,2 мл ФР. Группа «БФ» – мыши, инфицированные вакциной БЦЖ и получавшие внутрибрюшинные инъекции ФР. Группа «БГ» – мыши, инфицированные вакциной БЦЖ и получавшие 2 раза в неделю внутрибрюшинные инъекции раствора гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК) (14 мг/кг массы тела, 50 мкл). Группа «БД» – мыши, инфицированные вакциной БЦЖ и получавшие 2 раза в неделю внутрибрюшинные инъекции декстразида (конъюгат окисленного декстрана с молекулярной массой 40 кДа и ГИНК, 2%-й раствор, 50 мкл). Группа «БМВ» – мыши, инфицированные вакциной БЦЖ и получавшие 2 раза в неделю внутрибрюшинные инъекции раствора молекулярно-наносомальных фармацевтических композиций окисленного декстрана (МНФК: смесь 2%-го декстразида и 1%-го фосфатидилхолина; 50 мкл). Группа «БМИ» – мыши, инфицированные вакциной БЦЖ и получавшие 2 раза в неделю ингаляционно раствор МНФК (животных помещали на 5 мин в затравочную камеру с распыленным раствором МНФК из расчета 50 мкл на мышь).

РНК из ткани легкого выделяли с использованием TRIzol Reagent согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с использованием набора реагентов iScript cDNA Syntesis Kit согласно инструкции. Изменения экспрессии мРНК генов исследовали методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad Laboratories», США). Реакцию амплификации выполняли в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 20 мкл содержала буфер для ПЦР, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ dNTP's, 1,25 е.а. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили согласно следующей программе: 3 мин при 95 °С начальной денатурации, далее 40 циклов: 10 с при 95 °С для денатурации, 20 с при 60 °С для гибридизации праймеров, съем флуоресцентного сигнала, 20 с при 72 °С для элонгации. Уровень экспрессии мРНК генов нормировали относительно референсного гена *Gapdh*. Уровень экспрессии рассчитывали согласно методу Pfaffl. Подобранные с помощью программы PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies, США) пары праймеров (прямых и обратных) и TaqMan-зондов приведены в таблице.

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 $p < 0,05$. Связь между различными признаками в исследуемой выборке определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Пирсона (r).

Таблица

Перечень генов, подобранных пар прямых (F) и обратных (R) праймеров, TaqMan-зондов (Pr)

Table

List of genes, forward (F), reverse (R) primer sequences and TaqMan probes (Pr)

Ген	GenBank ассоциированный номер	Последовательность праймера
Gapdh	NM_001289726.1 NM_008084.3	F: 5′-AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC-3′ R: 5′-ACCAGTGGATGCAGGGATGATGTT-3′ Pr: R6G-5′-ATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA-3′-Q
Mmp9	NM_013599.4	F: 5′-CTCCAACCTCACGGACAC-3′ R: 5′-GACTGCTTCTCTCCCATCATC-3′ Pr: Fam-5′-AGCTGGCAGAGGCATACTTGTACC-3′-BHQ1
Col3a1	NM_009930.2	F: 5′-CCCTTCTTCATCCCACTCTTATT-3′ R: 5′-GATCCTGAGTCACAGACACATATT-3′ Pr: Fam-5′-TCATCTACGTTGGACTGCTGTGCC-3′-BHQ1
Tgfb1	NM_011577.2	F: 5′-CCTGAGTGGCTGTCTTTTGA-3′ R: 5′-CGTGGAGTTTGTTATCTTTGCTG-3′ Pr: Fam-5′-CCCTGTATTCCGTCTCCTTGGTTCA-3′-BHQ1
Zeb1	NM_011546.3	F: 5′-AGACACCGCCGTCATTTATC-3′ R: 5′-CAGGTGAGCAACTGGGAAA-3′ Pr: Fam-5′-ACACCAGAAGCCAGCAGTCATGAT-3′-BHQ1
Snai1	NM_011427.3	F: 5′-CTGCACGACCTGTGGAAAG-3′ R: 5′-GTTGGAGCGGTCAGCAAA-3′ Pr: Fam-5′-ACCCACACTGGTGAGAAGCCATTC-3′-BHQ1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены результаты анализа экспрессии мРНК ММР-9 (рисунок, *а*), проколлагена типа III (рисунок, *б*), TGF-β (рисунок, *в*) и транскрипционных факторов ZEB1 (рисунок, *г*) и Snai1 (рисунок, *д*). Развитие генерализованного туберкулезного гранулематоза закономерно сопровождалось индукцией ЭМП и активацией профибротических процессов, что проявлялось в повышении экспрессии цепи α1 коллагена III типа и TGF-β (см. рисунок, *б*, *в*). В легких мышей через 6 мес. после инъекции вакцины БЦЖ экспрессия гена участвующего в индукции ЭМП транскрипционного фактора ZEB1 не изменялась (см. рисунок, *г*), а содержание мРНК фактора Snai1 даже уменьшалось (см. рисунок, *д*). Экспрессия гена TGF-β уменьшалась только в результате введения декстразида. Однако несмотря на снижение экспрессии гена основного индуктора активации фибробластов, TGF-β [3, 11], декстразид не разрывал биохимического каскада ЭМП, не оказывая статистически значимого влияния ни на экспрессию исследованных генов транскрипционных факторов, участвующих в ЭМП, ни на экспрессию генов ММР-9 и проколлагена III.

Содержание мРНК ММР-9 было одинаковым практически во всех группах, за исключением инфицированных БЦЖ животных, получавших МНФК внутрибрюшинно. Данный факт можно рассматривать как потенциально позитивный терапевтический эффект, поскольку известно, что *Mycobacterium tuberculosis* индуцирует гиперпродукцию клетками хозяина протеаз, главным образом ММР, что приводит к образованию полостей и формированию антибиотикорезистентности [13]. Под действием тестируемых соединений содержание мРНК проколлагена III снижалось (в случае ГИНК и МНФК внутрибрюшинно – статистически значимо), возвращаясь к уровню, характерному для животных контрольной группы, что косвенно свидетельствует об угнетении дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Следует отметить, что, согласно полученным нами данным, традиционно использующийся в терапии туберкулеза ГИНК оказывает влияние на течение туберкулезного гранулематоза, минуя TGF-β-зависимый путь, не влияя на уровень экспрессии гена TGF-β, но подавляя экспрессию гена проколлагена III. Внутрибрюшинное введение МНФК приводило к снижению экспрессии ZEB1 у инфицированных животных, что согласуется с уменьшением экспрессии в их легочной ткани мРНК ММР-9; на сопряженность процессов с участием ММР-9 и ZEB1 указывает и наличие значимой корреляционной связи между величинами этих показателей (r = 0,68; p = 0,0013). К сожалению, менее инвазивный ингаляционный путь введения МНФК оказал-

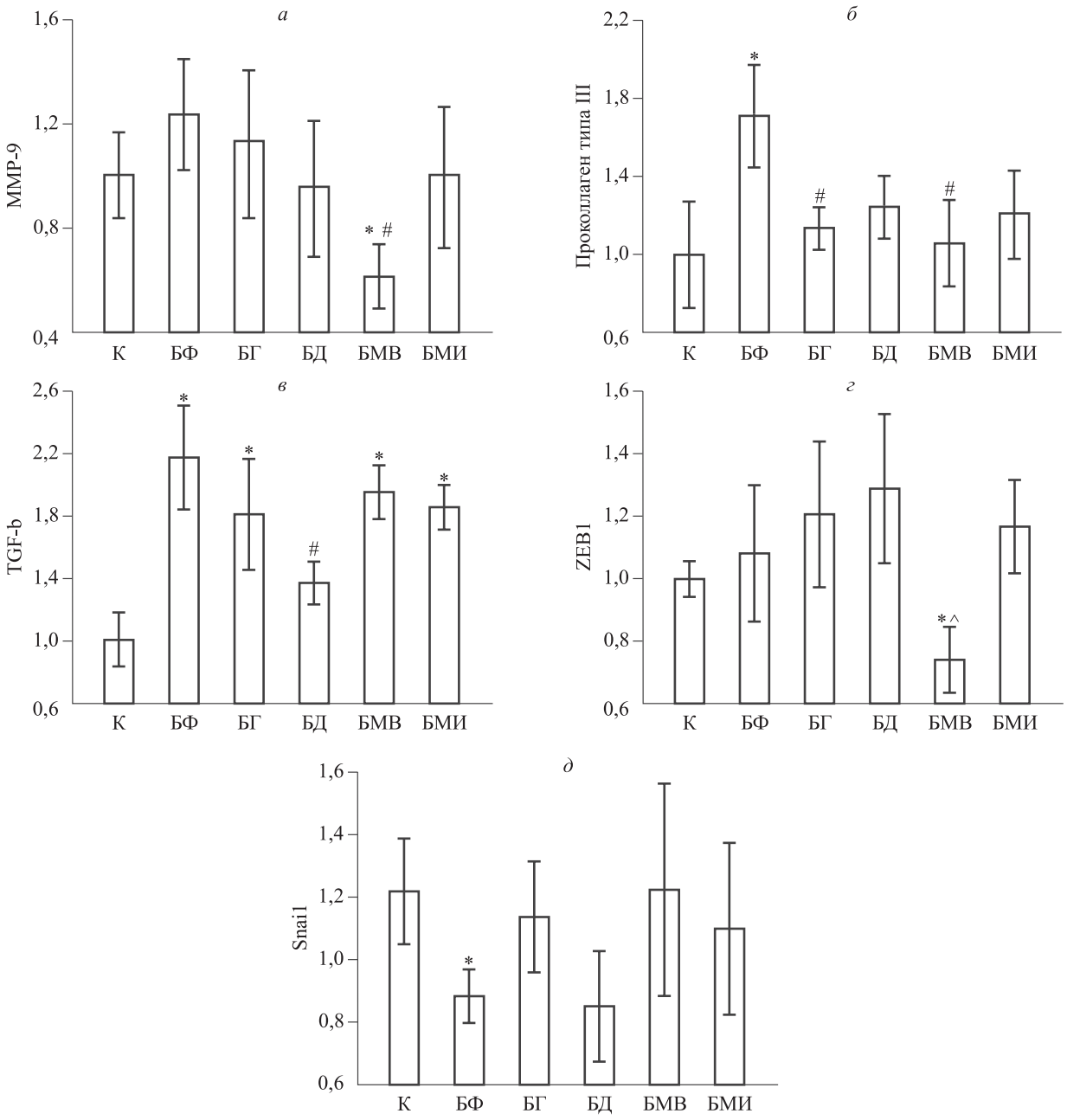

Рис. *Экспрессия мРНК белков, сопряженных с фибропластическими процессами, в легких мышей при развитии туберкулезного воспаления. Результаты нормированы на контроль, выбросы исключены с использованием критерия Шовене. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих значений: * – контроля, # – группы «БФ», ^ – группы «БГ»*

Fig. *Expression of protein genes participating in fibroplastic processes in mice lung during the development of tuberculous inflammation. Results are normalized to control, outliers excluded using Chauvenet's criterion. * – $p < 0.05$ compared with control, # – $p < 0.05$ compared with BS group*

ся неэффективен в отношении исследованных нами показателей.

Таким образом, обнаружено, что моделирование генерализованного туберкулезного гранулематоза сопровождается индукцией ЭМП и активацией профибротических процессов, что через 6 мес. проявлялось в повышении экспрессии цепи α1 коллагена III типа и TGF-β. Назначение животным в течение 2 мес. традиционных (ГИНК) и оригинальных (декстразид, МНФК) препаратов с противотуберкулезной активностью обладает ингибирующей активностью разной степени выраженности в отношении различных маркеров данных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филимонов П.Н., Шкурупий В.А., Курунов Ю.Н., Пупышев А.Б., Панасенко С.Г. Исследование процессов фиброзирования в печени и легких при лечении лизосомотропным препаратом изониазида хронического туберкулеза у мышей. *Пробл. туберкулеза*. 1999; (1): 63–65.

Filimonov P.N., Shkurupiy V.A., Kurunov Yu.N., Pupyshev A.B., Panasenko S.G. Investigation of fibrosis processes in the liver and lungs in the treatment of chronic tuberculosis in mice with a lysosomotropic isoniazid preparation. *Problemy tuberkuleza = Problems of Tuberculosis*. 1999; (1): 63–65. [In Russian].

2. Corbel M., Belleguic C., Boichot E., Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol. Toxicol*. 2002; 18 (1): 51–61.

3. Das V., Bhattacharya S., Chikkaputtaiah C., Hazra S., Pal M. The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J. Cell. Physiol*. 2019. doi 10.1002/jcp.28160

4. Goncalves R.S.G., Pereira M.C., Dantas A.T., Almeida A.R., Marques C.D.L., Rego M., Pitta I.R., Duarte A., Pitta M.G.R. IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives. *Autoimmunity*. 2018; 51: (1). 1–9. doi: 10.1080/08916934.2017.1416467.

5. Gonzalez D.M., Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal*. 2014; 7 (344): re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189.

6. Kage H., Borok Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship. *Curr. Opin. Pulm. Med*. 2012; 18 (5): 517–523. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283566721.

7. Mamuya F.A., Duncan M.K. aV integrins and TGF-beta-induced EMT: a circle of regulation. *J. Cell. Mol. Med*. 2012; 16 (3): 445–455. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01419.x.

8. Pardali K., Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007; 1775 (1): 21–62. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.06.004.

9. Robert S., Gicquel T., Victoni T., Valenca S., Barreto E., Bailly-Maitre B., Boichot E., Lagente V. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Biosci. Rep*. 2016; 36 (4): e00360. doi: 10.1042/BSR20160107.

10. Rosenbloom J., Castro S.V., Jimenez S.A. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann. Intern. Med*. 2010; 152 (3): 159–166. doi: 10.7326/0003-4819-152-3-201002020-00007.

11. Saito A., Horie M., Nagase T. TGF-beta signaling in lung health and disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19 (8): E2460. doi: 10.3390/ijms19082460.

12. Samarakoon R., Higgins P.J. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost*. 2008; 100 (6): 976–983.

13. Squeglia F., Ruggiero A., Berisio R. Collagen degradation in tuberculosis pathogenesis: the biochemical consequences of hosting an undesired guest. *Biochem. J*. 2018; 475 (19): 3123–3140. doi: 10.1042/BCJ20180482.

14. Stone R.C., Pastar I., Ojeh N., Chen V., Liu S., Garzon K.I., Tomic-Canic M. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2016; 365 (3): 495–506. doi: 10.1007/s00441-016-2464-0.

15. Weiskirchen R., Weiskirchen S., Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol. Aspects Med*. 2019; 65: 2–15. doi: 10.1016/j.mam.2018.06.003

16. Willis B.C., Liebler J.M., Luby-Phelps K., Nicholson A.G., Crandall E.D., du Bois R.M., Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol*. 2005; 166 (5): 1321–1332.

17. Wilson M.S., Madala S.K., Ramalingam T.R., Gochuico B.R., Rosas I.O., Cheever A.W., Wynn T.A. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J. Exp. Med*. 2010; 207 (3): 535–552. doi: 10.1084/jem.20092121.

Сведения об авторах:

Кожин П.М., к.м.н., ORCID 0000-0002-9989-9778, e-mail: kozhinpm@gmail.com
Чечушков А.В., к.м.н., ORCID 0000-0002-0238-4533, e-mail: achechushkov@gmail.com
Зайцева Н.С., к.б.н., e-mail: natasha115@list.ru
Храпова М.В., к.б.н., ORCID 0000-0003-3397-8067, e-mail: khrapova@centercem.ru
Черданцева Л.А., к.м.н., ORCID 0000-0002-4729-3694, e-mail: cherdanceff@yandex.ru
Меньщикова Е.Б., д.м.н., ORCID 0000-0003-2367-0114, e-mail: lemen@centercem.ru
Троицкий А.В., к.м.н., e-mail: pharm2008@yandex.ru
Шкурупий В.А., академик РАН, проф., д.м.н., ORCID 0000-0002-5078-4216, e-mail: shk@centercem.ru

Information about authors:

Kozhin P.M., candidate of medical sciences, ORCID 0000-0002-9989-9778, e-mail: kozhinpm@gmail.com
Chechushkov A.V., candidate of medical sciences, ORCID 0000-0002-0238-4533, e-mail: achechushkov@gmail.com
Zaytseva N.S., candidate of biological sciences, e-mail: natasha115@list.ru
Khrapova M.V., candidate of biological sciences, ORCID 0000-0003-3397-8067, e-mail: khrapova@centercem.ru
Cherdantseva L.A., candidate of medical sciences, ORCID 0000-0002-4729-3694, e-mail: cherdanceff@yandex.ru
Menshchikova E.B., doctor of medical sciences, ORCID 0000-0003-2367-0114, e-mail: lemen@centercem.ru
Troitsky A.V., candidate of medical sciences, e-mail: pharm2008@yandex.ru
Shkurupy V.A., academician of RAS, professor, doctor of medical sciences, ORCID 0000-0002-5078-4216, e-mail: shk@centercem.ru

УДК 577.112.856:616.15:615.277.4./.33 DOI: 10.15372/SSMJ20190404

ЛИПОПРОТЕИНЫ КРОВИ КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ ТРАНСПОРТА ГИДРОФИЛЬНЫХ И ГИДРОФОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

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

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

В работе рассмотрены транспортные функции основных классов липопротеинов (ЛП) плазмы крови, не связанные с обменом липидов, входящих в их состав. Цель исследования – изучить способность различных фракций ЛП плазмы крови (очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП)) взаимодействовать с гидрофильными и гидрофобными соединениями и показать роль ЛП как форм, способных транспортировать ксенобиотики в органы и ткани организма. **Материал и методы.** Исследования выполнены с использованием меченных тритием цитохалазина В, бензилпенициллина, бензантрацена, бензо(а)пирена, ультрацентрифугирования фракций ЛП плазмы крови, колоночной хроматографии; проведены опыты *in vivo* с внутривенным введением комплексов ЛП с меченым бензантраценом. **Результаты.** Методом ультрацентрифугирования показана способность различных классов ЛП образовывать комплексы с гидрофильными (цитохалазин В, бензилпенициллин) и гидрофобными (бензантрацен, бензо(а)пирен) соединениями. В плазме крови человека более 50 % радиоактивности гидрофильных соединений было представлено в составе фракций ЛПНП и ЛПВП, а в составе фракций ЛПОНП она была минимальной – 6,3 и 5,1 % соответственно. В инфранатанте присутствовала значительная часть цитохалазина В и бензилпенициллина – 43,6 и 40,9 % соответственно. Распределение в плазме крови для гидрофобных (бензантрацен, бензо(а)пирен) соединений было иным. Более 80 % радиоактивности было представлено в составе ЛП фракций, а в полярном белковом инфранатанте содержалось 16,1 % радиоактивности бензантрацена и 13,6 % бензо(а)пирена. В опытах *in vivo* с внутривенным введением крысам комплексов ЛП с меченным тритием бензантраценом показаны особенности поглощения липофильного ксенобиотика органами и тканями крыс. После введения ^{3}H-бензантрацена в составе ЛПОНП и ЛПНП наибольшая удельная радиоактивность была обнаружена в печени и надпочечниках. Вдвое меньшее поглощение меченого препарата наблюдали в семенниках и почках. Радиоактивность уменьшалась в ряду: легкие, жировая ткань, тимус, сердце и селезенка. Использование ЛПВП как платформы для ^{3}H-бензантрацена показало интенсивное накопление липофильного ксенобиотика в стероидпродуцирующих органах: надпочечниках и семенниках. **Заключение.** Полученные результаты позволяют считать реальной возможность использования ЛП плазмы крови в качестве платформ, способных транспортировать гидрофильные и гидрофобные соединения в клетки органов и тканей организма.

Ключевые слова: липопротеины очень низкой плотности, липопротеины низкой плотности, липопротеины высокой плотности, цитохалазин В, бензилпенициллин, бензантрацен, бензо(а)пирен, ксенобиотики, транспортные формы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Автор для переписки: Поляков Л.М., e-mail: plm@niibch.ru

Для цитирования: Поляков Л.М., Князев Р.А., Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В. Липопротеины крови как платформа для транспорта гидрофильных и гидрофобных соединений. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 30–36. doi: 10.15372/SSMJ20190404.

BLOOD LIPOPROTEINS AS A PLATFORM FOR TRANSPORT OF HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC COMPOUNDS

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

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

The paper discusses the transport functions of the main classes of blood plasma lipoproteins (LP) that are not associated with the metabolism of lipids that make up their composition. The aim of the study was to study the ability of various plasma LP fractions (very low (VLDL), low (LDL) and high density (HDL)) to interact with certain hydrophilic and hydrophobic compounds and show the role of LP as transport forms of xenobiotics in the organs and tissues of the body. **Material and methods**. The studies were performed with tritium-labeled cytochalasin B, benzylpenicillin, benzanthracene, benzo(a)pyrene, ultracentrifugation of human plasma LP fractions, column chromatography; *in vivo* experiments with intravenous injection of LP complexes with tritium-labeled benzanthracene were conducted. **Results.** The ability of various classes of LP to form complexes with hydrophilic (cytochalasin B, benzylpenicillin) and hydrophobic (benzanthracene, benzo(a)pyrene) compounds is shown by the method of ultracentrifugation. More than 50 % of the radioactivity of hydrophilic compounds in human blood plasma was represented in the composition of the LDL and HDL fractions, and in the composition of the VLDL fractions it was minimal – 6.3 and 5.1 %, respectively. A significant part of cytochalasin and benzylpenicillin was also present in the protein infranatant – 43.6 and 40.9 %, respectively. The distribution in blood plasma for hydrophobic (benzanthracene, benzo(a)pyrene) compounds was different. More than 80 % of the radioactivity was represented in the composition of the LP fractions. The polar protein infranatant contained 16.1 % of the radioactivity of benzantracene and 13.6 % of benzo(a)pyrene. The features of the lipophilic xenobiotics uptake by organs and tissues were shown *in vivo* experiments with intravenous injection of complexes of LP with tritium-labeled benzanthracene to rats. The highest specific radioactivity was found in the liver and adrenal glands after the intravenous injection of ^{3}H-benzanthracene in the composition of VLDL and LDL. Twice less uptake of the labeled drug was observed in the testis and kidneys. Radioactivity decreased in the series: lungs, adipose tissue, thymus, heart, and spleen. A feature of the use of HDL as a platform for ^{3}H-benzanthracene is the intense accumulation of lipophilic xenobiotics in steroid-producing organs: the adrenal glands and testis. **Conclusion**. The results obtained allow us to consider the real possibility of using blood plasma PL as transport platforms for hydrophilic and hydrophobic compounds into the cells of organs and tissues.

Key words: very low density lipoproteins, low density lipoproteins, high density lipoproteins, cytochalasin B, benzylpenicillin, benzanthracene, benzo(a)pyrene, xenobiotics, transport forms.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Polyakov L.M., e-mail: plm@niibch.ru

Citation: Polyakov L.M., Knyazev R.A., Ryabchenko A.V., Kotova M.V., Trifonova N.V. Blood lipoproteins as a platform for transport of hydrophilic and hydrophobic compounds. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 30–36. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190404.

Проблема транспорта биологически активных веществ и лекарственных препаратов с целью увеличения терапевтической эффективности и ограничения побочных эффектов является одной из центральных в современной медицинской биотехнологии. Это связано с тем, что используемые в настоящее время переносчики должны отвечать целому ряду признаков и способствовать решению сложных задач. Во-первых, попадая в организм, биологически активные вещества и лекарственные препараты очень быстро разрушаются в печени в системе метаболизма ксенобиотиков, полностью не реализовав своего лечебного действия. Во-вторых, для лечения ряда патологических состояний (опухолевые процессы, ферментативная, гормональная недостаточность и т.д.) необходима доставка лекарственных препаратов непосредственно в клетку, что связано с преодолением клеточного барьера. В-третьих, нужны эффективные переносчики для транспорта генетического материала в ядра клеток. Таким образом, необходимы такие переносчики, которые бы обладали одновременно протекторными свойствами, были индифферентными по отношению к

системе иммунитета организма, легко преодолевали клеточные барьеры, а также быстро доставляли лекарства и биологически активные вещества в патологический очаг любой локализации. Следует отметить, что все эти свойства присущи универсальной наноразмерной транспортной липопротеиновой системе организма. Химическая природа ЛП, их способность проникать в клетки путем рецепторного эндоцитоза обусловливают преимущества данных соединений как эффективных природных переносчиков [6, 10, 13].

Целью настоящей работы явилось изучение способности различных фракций ЛП плазмы крови (низкой (ЛПНП), очень низкой (ЛПОНП) и высокой плотности (ЛПВП)) взаимодействовать с некоторыми гидрофильными и гидрофобными соединениями и возможности использования ЛП в качестве транспортных форм ксенобиотиков для доставки в органы и ткани организма.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали меченные тритием гидрофильные препараты: цитохалазин В и бензилпенициллин («Amersham», Великобритания). В качестве гидрофобных лигандов использовали меченные тритием («Amersham») бензантрацен и бензо(а)пирен – наиболее распространенные ксенобиотики метилхолантренового ряда. Плазму крови человека (200 мл) делили на четыре части по 50 мл для каждого из четырех перечисленных ^{3}H-лигандов. К 50 мл плазмы добавляли по 5 мкл (0,5 мкКи) меченого препарата. После инкубирования (30 мин при 20 °С) поэтапное выделение отдельных фракций ЛП проводили методом ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na_2 на центрифуге «OptimaL-90K» («Beckman-Coulter», Австрия) с использованием ротора 70.1Ti [9]. Полученные фракции ЛП (ЛПОНП ($0{,}94 < d < 1{,}006$ г/мл), ЛПНП ($1{,}006 < d < 1{,}063$ г/мл), ЛПВП ($1{,}063 < d < 1{,}21$ г/мл)) и фракцию инфранатанта с плотностью более 1,21 г/мл анализировали на наличие радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark II» («Amersham») в ЦКП «Современные оптические системы» НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (НИИЭКМ ФИЦ ФТМ).

После ультрацентрифугирования фракции ЛП, содержащие меченые лиганды, подвергали хроматографическому разделению на колонке (0,8 × 40 см, Сефадекс G-50, «Pharmacia», Швеция). Элюент: 5 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, 0,15M NaCl. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе «LKB 2151» («LKB», Швеция) при длине волны 280 нм. Кроме того, элюат анализировали на наличие радиоактивности. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре «Evolution 300» («Thermo Fisher Scientific», США) в ЦКП «Спектрометрические измерения» на базе НИИ биохимии ФИЦ ФТМ.

Опыты *in vivo* проведены на самцах крыс Вистар массой 180–220 г. Исследования выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Комплексы ЛП с меченным тритием бензантраценом (0,5 мл, 0,5 мкКи) на 100 г массы тела вводили в хвостовую вену крысы, через 30 мин животных декапитировали под эфирным наркозом. Тушки крыс перфузировали 0,15M NaCl через аорту и v. porta. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark II». Величину удельной радиоактивности органов и тканей рассчитывали в имп/мин на 1 мг ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие лекарственных препаратов с отдельными классами ЛП, с их белковыми компонентами и полярными липидами может играть ключевую роль в механизме действия и поглощения лекарства клеткой. В качестве лигандов гидрофильного характера для ЛП мы использовали цитохалазин и бензилпенициллин – антибиотики из плесневых грибов. Меченные тритием цитохалазин и бензилпенициллин добавляли к плазме крови, инкубировали 30 мин при 20 °С и проводили препаративное выделение основных фракций ЛП методом ультрацентрифугирования. Фракции ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП, а также инфранатант оценивали на содержание радиоактивности. Распределение радиоактивности между отдельными фракциями ЛП представлено на рис. 1. Видно, что ее значительная часть (около 50 %) находится в составе фракций ЛПВП и ЛПНП, а в составе фракций ЛПОНП минимальна – 6,3 и 5,1 % соответственно. В белковом инфранатанте содержалось менее половины цитохалазина и бензилпенициллина – 43,6 и 40,9 % соответственно.

После ультрацентрифугирования комплексы меченных тритием цитохалазина и бензилпенициллина с частицами фракций ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП анализировались методами равновесного диализа и гель-фильтрации на сефадексе G-50. Комплексы были довольно устойчивы и не разрушались в процессе диализа и хроматографического разделения при физиологических значениях

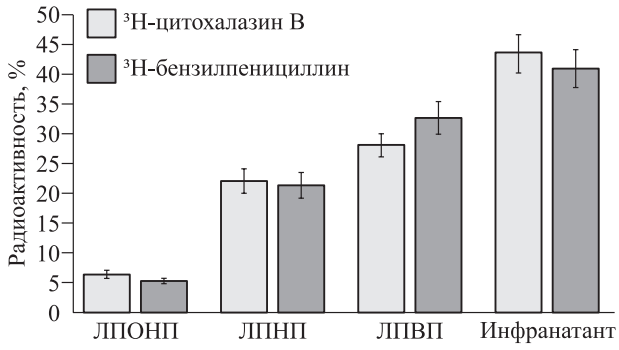

Рис. 1. *Распределение радиоактивности ^{3}H-цитохалазина B и ^{3}H-бензилпенициллина между основными фракциями ЛП плазмы крови по результатам препаративного ультрацентрифугирования*

Fig. 1. *Distribution of radioactivity of ^{3}H-cytochalasin B and ^{3}H-benzylpenicillin between the main fractions of blood plasma LP. Preparative ultracentrifugation*

pH. На рис. 2, *а* приведен пример хроматографического профиля элюата комплексов ЛПВП с меченным тритием цитохалазином B после разделения на колонке с сефадексом G-50. Пик радиоактивности препарата совпадал с объемом выхода фракции ЛПВП, что свидетельствовало об образовании комплексов «ЛПВП–^{3}H–цитохалазин B». Следует отметить, что процесс носил обратимый характер, поскольку введение в данную систему 500-кратного избытка немеченного цитохалазина B приводило к вытеснению метки из комплексов с ЛПВП (рис. 2, *б*).

Считается, что распределение ксенобиотиков в плазме крови между различными фракциями ЛП, а также их связывание с альбумином и другими транспортными белками крови зависит от целого ряда факторов, в том числе от жирорастворимости вводимого соединения: чем оно липофильнее, тем в большей степени связывается с богатыми липидами фракциями ЛП и в меньшей степени – с другими транспортными белками. При этом вклад белкового и липидного компонента в связывание гидрофобных лигандов может различаться между собой в зависимости от класса ЛП, индивидуальных характеристик белковых молекул, входящих в состав данного типа ЛП, от состава липидной фазы и, конечно, от свойств самих липофильных лигандов [11, 15].

В своей работе в качестве гидрофобных лигандов мы использовали бензантрацен и бензо(а)пирен – наиболее распространенные ксенобиотики метилхолантренового ряда. Меченные тритием бензантрацен и бензо(а)пирен в метаноле добавляли к плазме крови и проводили препаративное ультрацентрифугирование. Флотирующие фракции ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП, а также конечный инфранатант оценивали на содержание радиоактивности. Распределение меченых гидрофобных лигандов между выделенными фракциями плазмы крови человека представлено на рис. 3. Оказалось, что их подавляющее большин-

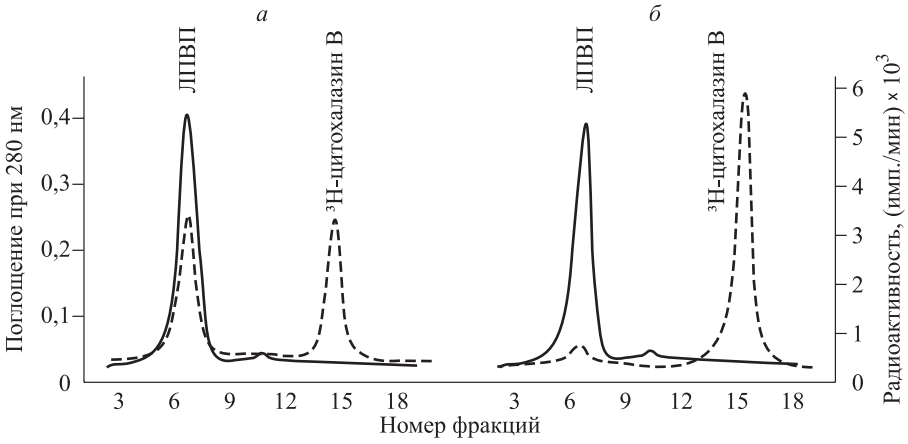

Рис. 2. *Хроматографический профиль элюата фракции ЛПВП-^{3}H-цитохалазин B (а) и в присутствии 500-кратного избытка немеченного цитохалазина B (б). Колонка: Сефадекс G-50 (0,8 × 40 см). Элюент: 5 мМ трис-HCl, pH 7,4, 0,15М NaCl, 5мМ ЭДТА. Сплошная линия – поглощение белка при 280 нм, штриховая – радиоактивность*

Fig. 2. *Chromatographic profile of the eluate of the HDL-^{3}H-cytochalasin B fraction (a) and in the presence of a 500-fold excess of unlabeled cytochalasin B (b). Column: Sephadex G-50 (0.8 × 40 cm). Eluent: 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA. The solid line is protein absorption at 280 nm, dotted line – radioactivity*

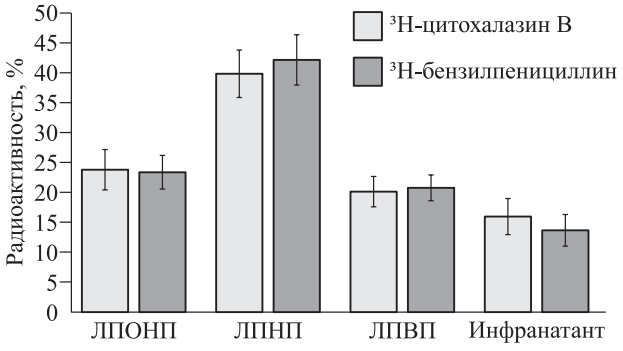

Рис. 3. *Распределение радиоактивности ³H-бензантрацена и ³H-бензо(а)пирена между основными фракциями ЛП плазмы крови по результатам препаративного ультрацентрифугирования*

Fig. 3. *Distribution of radioactivity of ³H-benzanthracene and ³H-benzo(a)pyrene between major LP blood plasma fractions according preparative ultracentrifugation*

ство (более 80 %) находится во фракциях ЛП, в том числе наибольшее количество (около 40 %) – в составе ЛПНП, причем такое распределение было характерно для обоих ксенобиотиков. Во фракциях ЛПОНП и ЛПВП находилось примерно одинаковое количество (по 20 %) ксенобиотиков. В полярном инфранатанте содержалось 16,1 % радиоактивности бензантрацена и 13,6 % радиоактивности бензо(а)пирена. Для сравнения укажем, что подобные результаты по распределению бензо(а)пирена в плазме крови крыс приведены в работе [14]: после ультрацентрифугирования в составе ЛП находилось 77 % липофильного ксенобиотика и 23 % приходилось на остальные белковые фракции.

Существует представление, что взаимодействие ксенобиотиков с отдельными классами ЛП, с их белковыми компонентами и полярными липидами может играть ключевую роль в механизме действия и поглощения лекарства клеткой [8, 12, 19]. Причем важный фактор, который может использоваться в транспорте переносимых ЛП лекарственных соединений, – это особенности поглощения ЛП различными типами тканей [3, 4, 17]. Поэтому после препаративного ультрацентрифугирования фракции ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП, содержащие в своем составе меченный тритием бензантрацен, подвергали диализу и вводили в хвостовую вену крысы.

Через 30 мин после введения ³H-бензантрацена в составе ЛПОНП наибольшая удельная радиоактивность была обнаружена в печени и надпочечниках (таблица). Вдвое меньшее поглощение меченого препарата наблюдали в семенниках и почках. Радиоактивность постепенно уменьшалась в ряду: легкие, жировая ткань, тимус. Минимальное поглощение метки отмечено в сердце и селезенке. Использование в качестве транспортной платформы для ³H-бензантрацена фракции ЛПНП не выявило существенных различий в поглощении метки органами и тканями по сравнению с ЛПОНП.

Применение ЛПВП в качестве транспортной платформы для ³H-бензантрацена позволило выявить, в первую очередь, высокое содержание меченого ксенобиотика в надпочечниках и семенниках. И этот факт вполне понятен, так

Таблица

Поглощение ³H-бензантрацена органами и тканями крыс через 30 мин после внутривенного введения в составе комплексов с ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП

Table

Absorption of ³H-benzanthracene in organs and tissues of rats 30 minutes after intravenous administration in the composition of complexes with VLDL, LDL and HDL

Орган, ткань	Радиоактивность, имп/мин на 1 мг ткани		
	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП
Печень	27,9 ± 4,1	29,6 ± 2,5	36,2 ± 7,5
Легкие	6,7 ± 1,6	5,9 ± 1,1	11,5 ± 1,4
Сердце	3,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,5
Селезенка	1,9 ± 0,3	3,7 ± 0,5	5,9 ± 1,0
Почки	11,5 ± 2,0	9,1 ± 1,2	27,4 ± 4,1
Надпочечники	24,7 ± 2,3	26,1 ± 3,7	52,6 ± 11,2
Семенники	13,4 ± 2,6	18,6 ± 3,4	44,7 ± 6,8
Тимус	4,1 ± 0,9	3,8 ± 0,4	5,9 ± 1,6
Жировая ткань	5,2 ± 0,8	5,1 ± 0,7	9,7 ± 3,1

Примечание. Число животных в каждой группе равно 5.

как в стероидпродуцирующих органах крыс для синтеза стероидных гормонов используется холестерин сосудистого происхождения – эфиры холестерина ЛПВП [1, 2]. Кроме того, имеются данные, что преимущественное связывание меченого хлордекона с фракцией ЛПВП обеспечивает его накопление в надпочечниках и семенниках – органах, наиболее подверженных токсическому воздействию хлорированных углеводородов [16]. На третьем месте по поглощению оказалась печень. Наличие высокого уровня радиоактивности в печени объясняется ведущей ролью этого органа в метаболизме ЛПВП и транспортируемых ими различных лигандов как эндогенной, так и экзогенной природы, в частности холестерина и его эфиров [7]. Кроме того, при использовании в качестве транспортной формы для ^{3}H-бензантрацена фракции ЛПВП следует отметить достаточно высокий уровень меченого бензантрацена в почечной ткани. Это подтверждается работами, в которых показана важнейшая роль почек в катаболизме ЛПВП и апо A-I, как основного структурообразующего компонента данной фракции [4, 5, 17, 18].

Таким образом, в настоящей работе рассмотрены транспортные функции основных классов ЛП плазмы крови, не связанные с обменом липидов, входящих в их состав. Методами препаративного ультрацентрифугирования и колоночной хроматографии показана способность различных классов ЛП образовывать комплексы как с гидрофильными (цитохалазин, бензилпенициллин), так и с гидрофобными (бензантрацен, бензо(а)пирен) соединениями. В плазме крови человека более половины радиоактивности цитохалазина и бензилпенициллина было представлено в составе фракций ЛПВП и ЛПНП, а в составе фракций ЛПОНП она была минимальной; значительная часть радиоактивности находилась в полярном белковом инфранатанте. Распределение в плазме крови гидрофобных (бензантрацен, бензо(а)пирен) соединений было иным: более 80 % радиоактивности было представлено в составе ЛП-фракций. Образование комплексов между частицами ЛП и мечеными лигандами было подтверждено методом гель-хроматографии. Совпадение объемов выхода ЛП-фракций и радиоактивности свидетельствовало о реальности образования таких комплексов.

В опытах *in vivo* с внутривенным введением крысам комплексов ЛП с меченным тритием бензантраценом показаны особенности поглощения липофильного ксенобиотика органами и тканями крыс в зависимости от используемого переносчика. После введения ^{3}H-бензантрацена в составе ЛПОНП и ЛПНП наибольшая удельная радиоактивность была обнаружена в печени и надпочечниках. Вдвое меньшее поглощение меченого препарата наблюдали в семенниках и почках. Радиоактивность уменьшалась в ряду: легкие, жировая ткань, тимус, сердце и селезенка. Особенностью использования ЛПВП как платформы для ^{3}H-бензантрацена являлось интенсивное накопление липофильного ксенобиотика в стероидпродуцирующих органах – надпочечниках и семенниках. Полученные результаты свидетельствуют о реальной возможности использования ЛП плазмы крови в качестве платформ, способных транспортировать гидрофильные и гидрофобные соединения в клетки органов и тканей организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Azhar S., Nomoto A., Leers-Sucheta S., Reaven E. Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J. Lipid Res*. 1998; 39 (8): 1616–1628.

2. Azhar S., Reaven E. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2002; 195 (1-2): 1–26.

3. Counsell R.E., Pohland R.C. Lipoproteins as potential site-specific delivery systems for diagnostic and therapeutic agents. *J. Med. Chem*. 1982; 25 (10): 1115–1120.

4. Glass C.K., Pittman R.C., Keller G.A., Steinberg D. Tissue sites of degradation of apoprotein A-I in the rat. *J. Biol. Chem*. 1983; 258 (11): 7161–7167.

5. Glass C., Pittman R.C., Civen M., Steinberg D. Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem*. 1985; 260 (2): 744–750.

6. Glickson J.D., Lund-Katz S., Zhou R., Choi H., Chen I.W., Li H., Corbin I., Popov A.V., Cao W., Song L., Qi C., Marotta D., Nelson D.S., Chen J., Chance B., Zheng G. Lipoprotein nanoplatform for targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents. *Mol. Imaging*. 2008; 7 (2): 101–110.

7. Fluiter K., Sattler W., de Beer M.C., Connell P.M., van der Westhuyzen D.R., van Berkel T.J. Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *J. Biol. Chem*. 1999; 274 (13): 8893–8899.

8. Hamidi M., Foroozesh M., Zarrin A. Lipoproteins: from physiological roles to drug delivery potentials. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. 2006; 23 (6): 497–523.

9. Hatch F.T. Practical method for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res*. 1968; (6): 2–68.

10. Kuai R., Li D., Chen Y.E., Moon J.J., Schwendeman A. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*. 2016; 10 (3): 3015–3041.

11. Kwong M., Sivak O., Kwong E.H., Wasan K.M. Cyclosporine A transfer between high- and low-density lipoproteins: independent from lipid transfer protein I-facilitated transfer of lipoprotein-coated phospholipids because of high affinity of cyclosporine a for the protein component of lipoproteins. *J. Pharm. Sci*. 2001; 90 (9): 1308–1317.

12. Masquelier M., Tirzitis G., Peterson C.O., Palsson M., Amolins A., Plotniece M., Plotniece A., Makarova N., Vitols S.G. Plasma stability and cytotoxicity of lipophilic daunorubicin derivatives incorporated into low density lipoproteins. *Eur. J. Med. Chem*. 2000; 35 (4): 429–438.

13. Mo Z.C., Ren K., Liu X., Tang Z.L., Yi G.H. A high-density lipoprotein-mediated drug delivery system. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2016; 106 (Pt. A): 132–147.

14. Polyakov L.M., Chasovskikh M.I., Panin L.E. Binding and transport of benzo[a]pyrene by blood plasma lipoproteins: the possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjug. Chem*. 1996; 7 (4): 396–400.

15. Sabnis N., Lacko A.G. Drug delivery via lipoprotein-based carriers: answering the challenges in systemic therapeutic. *Ther. Deliv*. 2012; 3 (5): 599–608.

16. Soine P.J., Blanke R.V., Guzelian P.S., Schwartz C.C. Preferential binding of chlordecone to the protein and high density lipoprotein fractions of plasma from humans and other species. *J. Toxicol. Environ. Health*. 1982; 9 (1): 107–118.

17. Van't Hooft F.M., van Tol A. The sites of degradation of rat high-density-lipoprotein apolipoprotein E specifically labelled with O-(4-diazo-3-[^{125}I] iodobenzoyl)sucrose. *Biochem. J*. 1985; 226 (3): 715–721.

18. Yang H., Fogo A.B., Kon V. Kidneys: key modulators of high-density lipoprotein levels and function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2016; 25 (3): 174–179.

19. Yuan Y., Wen J., Tang J., Kan Q., Ackermann R., Olsen K., Schwendeman A. Synthetic high-density lipoproteins for delivery of 10-hydroxycamptothecin. *Int. J. Nanomedicine*. 2016; 11: 6229–6238.

Сведения об авторах:

Поляков Л.М., д.м.н., проф., e-mail: plm@niibch.ru
Князев Р.А., к.б.н., e-mail: Knjazev_roman@mail.ru
Рябченко А.В., к.б.н., e-mail: borrelia@mail.ru
Котова М.В., e-mail: zerokiri@mail.ru
Трифонова Н.В., e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru

Information about authors:

Polyakov L.M., doctor of medical sciences, professor, e-mail: plm@niibch.ru
Knyazev R.A., candidate of biological sciences, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru
Ryabchenko A.V., candidate of biological sciences, e-mail: borrelia@mail.ru
Kotova M.V., e-mail: zerokiri@mail.ru
Trifonova N.V., e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru

УДК 612.128:117.2:12-008.318 DOI: 10.15372/SSMJ20190405

АДРЕНО-, ХОЛИНОРЕАКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ И ОЦЕНКА ИХ СОПРЯЖЕННОСТИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО БАЛАНСА КРОВИ У НЕЛИНЕЙНЫХ КРЫС

Евгения Владимировна КУРЬЯНОВА, Андрей Валерьевич ТРЯСУЧЕВ, Давид Львович ТЁПЛЫЙ

Астраханский государственный университет
414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1

У самцов нелинейных крыс определяли величины β-адренореактивности эритроцитов (β-АРЭ, 40,6 ± 2,3 отн. ед.) и М-холинореактивности эритроцитов (М-ХРЭ, 7,9 ± 0,3 отн. ед.), концентрацию гемоглобина, показатели свободнорадикального баланса: уровень ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) и активность каталазы в эритроцитах и плазме крови. Группировка выборки методом кластеризации по величине β-АРЭ выявила, что крысы с высокой β-АРЭ (>50 отн.ед.) имеют бóльшую концентрацию гемоглобина, ТБК-РП и активность каталазы в эритроцитах, чем крысы со средней (от 30 до 50 отн. ед.) и низкой (<30 отн. ед.) β-АРЭ. Согласно результатам корреляционного и факторного анализа, М-ХРЭ преимущественно сопряжена с эритроцитарными (Фактор 1), а β-АРЭ – с плазменными характеристиками свободнорадикального баланса крови (Фактор 3). Введение блокатора β-адренорецепторов анаприлина (2 мг/кг массы тела) уменьшает β-АРЭ и потенцирует накопление ТБК-РП в эритроцитах и плазме крови, введение блокатора М-холинорецепторов атропина (1 мг/кг массы тела) снижает не только М-ХРЭ, но и β-АРЭ, способствует росту активности каталазы эритроцитов. Таким образом, в интактном состоянии и в условиях блокады адрено- и холинорецепторов выявлены зависимости, позволяющие рассматривать β-АРЭ и М-ХРЭ как связующее звено между регуляторными влияниями на эритроциты и биохимическими, в том числе свободнорадикальными, процессами в системе «эритроциты – плазма крови».

Ключевые слова: адрено- и холинореактивность эритроцитов, свободнорадикальный баланс крови, анаприлин, атропин, нелинейные крысы.

Автор для переписки: Курьянова Е.В., e-mail: fyzevk@rambler.ru

Для цитирования: Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Тёплый Д.Л. Адрено-, холинореактивность эритроцитов и оценка их сопряженности с показателями свободнорадикального баланса крови у нелинейных крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 37–45. doi: 10.15372/SSMJ20190405.

ADRENO- AND CHOLINOREACTIVITY OF ERYTHROCYTES AND ESTIMATION OF THEIR CONJUGATION WITH PARAMETERS OF FREE RADICAL BALANCE OF BLOOD IN NON-LINEAR RATS

Evgeniya Vladimirovna KURYANOVA, Andrey Valerievich TRYASUCHEV, David Lvovich TEPLY

The Astrakhan State University
414000, Astrakhan, Shaumyana sq., 1

The values of the β-adrenoreactivity of erythrocytes (β-ARE, 40.6 ± 2.3 rel. units) and the M-cholinoreactivity of erythrocytes (M-ChRE, 7.9 ± 0.3 rel. units), concentration of hemoglobin, the parameters of free radical balance: the level of TBA-reactive products (TBA-RP) and catalase activity in erythrocytes and plasma were determined in male non-linear rats. Sample grouping by clustering largest β-ARE showed that rats with a high β-ARE (>50 rel. units) have a greater concentration of hemoglobin, TBA-RP and CAT in erythrocytes, than rats with an average (30 to 50 rel. units) and low (<30 rel. units) β-ARE. According to the results of the correlation and factor analysis, M-ChRE is predominantly conjugated with erythrocyte (Factor 1), and β-ARE – with plasma characteristics of free radical balance in blood (Factor 3). The introduction of β-adrenergic blocker anapriline (2 mg/kg bw) decreases β-ARE and potentiates the accumulation of TBA-RP in the erythrocytes and plasma, the administration of the blocker of M-cholinergic receptors atropine (1 mg/kg bw) reduces not only M-ChRE, but also β-ARE and promotes the growth of erythrocyte catalase

activity. Thus, in the intact state, under the conditions of blockade of adrenergic receptor and cholinergic receptors, dependences have been revealed that make it possible to treat β-ARE and M-ChRE as a link between regulatory influences on erythrocytes and biochemical, including free radical processes in the «erythrocyte – blood plasma».

Key words: adreno- and cholinoreactivity of erythrocytes, free radical balance of blood, anapriline, atropine, non-linear rats.

Correspondence author: Kuryanova E.V., e-mail: fyzevk@rambler.ru

Citation: Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Teply D.L. Adreno- and cholinoreactivity of erythrocytes and estimation of their conjugation with parameters of free radical balance of blood in non-linear rats. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 37–45. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190405.

Настоящая работа является продолжением исследований [5, 6, 18] физиологической роли адрено- и холинореактивности эритроцитов (β-АРЭ и М-ХРЭ). Эти относительно новые для экспериментальной физиологии показатели используются в клинике (преимущественно β-АРЭ) [12, 16, 17, 19], однако их значимость для организма и связь с другими параметрами еще не в полной мере ясны. Ранее на модели нелинейных крыс нами показана сопряженность и специфичность связей β-АРЭ и М-ХРЭ с вариабельностью сердечного ритма, подтверждающие значимость показателей реактивности эритроцитов в оценке регуляторных влияний на уровне клеточных мембран [6]. При этом важно помнить, что функционирование адрено- и холинорецепторов зависит от физико-химических свойств билипидного слоя, которые могут изменяться в результате перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 10, 11, 14], а проявлением реакции на катехоламины или холиноподобные вещества является изменение интенсивности свободнорадикальных процессов в мембране [10, 12, 14]. В этой области научных исследований основное внимание ученых обычно концентрируется на роли регуляторных факторов (гормонов, медиаторов и др.) в интенсификации процессов пероксидации [10, 14], в то время как их возможное участие в модуляции механизмов антиоксидантной защиты изучено мало [11]. Одной из вероятных причин этого является недостаток показателей, которые могли бы рассматриваться как связующее звено между регуляторными влияниями и процессами ПОЛ, ферментативным звеном антиоксидантной защиты на клеточном уровне. В этой связи показатели реактивности эритроцитов представляют интерес и могут быть перспективными при изучении регуляторных и модулирующих влияний на процессы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты.

Цель работы – дополнить представления о β-АРЭ и М-ХРЭ в аспекте их возможной сопряженности с показателями свободнорадикального баланса (СРБ) крови у нелинейных крыс в интактном состоянии и при воздействии на адрено- и холинорецепторы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 93 самцах нелинейных белых крыс массой 220–260 г из вивария при лаборатории экспериментальной физиологии Астраханского государственного университета. Перед экспериментом и во время его проведения животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды, на стандартном рационе – комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ 50258-92 (ООО «Лабораторкорм»). Животные потребляли корм и воду *ad libitum*. Все эксперименты выполнялись в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Европейской конвенцией Directive 2010/63/EU of 22 September 2010.

Для определения реактивности эритроцитов кровь забирали с помощью микропипетки из хвостовой вены у крыс в исходном состоянии и затем на фоне экспериментальных воздействий. Для определения показателей СРБ кровь получали при декапитации крыс под нембуталовым наркозом (40 мг/кг массы тела). Цельную кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (гепарин). Плазму отбирали после центрифугирования в течение 15 мин при 2000 об./мин. Эритроциты дважды отмывали холодным физиологическим раствором с последующим центрифугированием. Полученную эритроцитарную массу использовали для дальнейших исследований.

β-АРЭ определяли экспресс-методом Р.И. Стрюк и И.Г. Длусской [17], М-ХРЭ – с помощью собственной модификации метода определения β-АРЭ [6]. Активность каталазы эритро-

цитов и плазмы крови оценивали по методу [4], интенсивность процессов ПОЛ – по содержанию в плазме крови продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [12]. Содержание гемоглобина в крови крыс определяли гемиглобинцианидным методом с помощью стандартных наборов «Гемоглобин АГАТ» («Агат-Мед»).

В первой серии у 53 особей нелинейных крыс в интактном состоянии определяли β-АРЭ, уровень ТБК-РП в плазме, активность каталазы эритроцитов и плазмы крови, содержание гемоглобина. Наряду с названными показателями у 21 особи этой же группы измеряли М-ХРЭ и содержание ТБК-РП в эритроцитах. Во второй серии (40 самцов нелинейных крыс) показатели определяли на фоне введения блокаторов β-адренорецепторов и М-холинорецепторов. В качестве β-адреноблокатора использовали анаприлин (2 мг/кг м.т.), М-холиноблокатора – атропин (1 мг/кг м.т.), которые вводились животным опытных групп (по 12 особей в каждой) однократно [5, 18]. Контрольные животные (16 особей) получали инъекцию физиологического раствора.

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 $p < 0,05$. Связь между различными признаками в исследуемой выборке определялась с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Пирсона (r). Выполняли кластерный и факторный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В выборке из 53 крыс средняя величина β-АРЭ составила 40,6 ± 2,3 отн. ед. (от 11,1 до 70,2 отн. ед.), что соответствовало ранее опубликованным данным [6]. Средние значения активности каталазы в плазме крови (70,4 ± 2,99 мккат/л) и эритроцитах (239,7 ± 6,09 мккат/мл эр. массы) были сходны с данными литературы [4, 12]. Уровень ТБК-РП в плазме интактных крыс был достаточно низким – 0,9 ± 0,14 нмоль/л.

Для выявления возможных зависимостей между реактивностью эритроцитов и показателями СРБ, как и в предыдущей работе [6], нами проведена группировка особей по величине β-АРЭ с помощью процедуры кластеризации методом k-средних. В результате сформированы три группы (табл. 1): с низкой β-АРЭ (от 11,1 до 30 отн. ед.), средней β-АРЭ (от 30,6 до 50,0 отн. ед.), высокой β-АРЭ (более 50,0 отн. ед.). Установлено, что у крыс с высокой β-АРЭ содержание гемоглобина на 9,5 % ($p < 0,05$), активность каталазы эритроцитов на 14,3 % ($p < 0,05$), уровень ТБК-РП на 75 % ($p < 0,05$) выше, чем у особей со средней β-АРЭ. Достоверных различий между группами-кластерами со средней и низкой β-АРЭ не обнаружено. У особей с низкой β-АРЭ содержание гемоглобина и ТБК-РП плазмы было меньше, чем в группе с высокой β-АРЭ (соответственно на 10,8 % ($p < 0,05$) и почти в 2,8 раза ($p < 0,01$)).

Таблица 1

Показатели СРБ и концентрация гемоглобина в крови крыс с различными величинами β-АРЭ, $M \pm m$

Table 1

Indicators of free radical balance and hemoglobin concentration in blood of rats with different values of β-ARE, $M \pm m$

Показатель	Животные с низкой β-АРЭ (n = 13)	Животные со средней β-АРЭ (n = 26)	Животные с высокой β-АРЭ (n = 14)
β-АРЭ, отн. ед.	20,5 ± 1,9***, ^^^	41,0 ± 0,8	59,7 ± 1,6***
Содержание гемоглобина, г/л	132,0 ± 4,6^	133,6 ± 3,8	146,3 ± 3,1*
Активность каталазы в эритроцитах, мккат/мл эритроцитарной массы	248,3 ± 11,3	225,6 ± 8,1	257,9 ± 7,1*
Каталазная активность плазмы, мккат/л	75,0 ± 4,7	71,6 ± 4,2	63,8 ± 4,7
Содержание ТБК-РП в плазме крови, нмоль/мл	0,5 ± 0,2^^	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей крыс со средней β-АРЭ (* – при $p < 0,05$, *** – при $p < 0,001$) и высокой β-АРЭ (^ – при $p < 0,05$, ^^ – при $p < 0,01$, ^^^ – при $p < 0,001$).

Таблица 2

Матрица факторного анализа показателей реактивности эритроцитов, концентрации гемоглобина и СРБ крови крыс

Table 2

Matrix of factor analysis of erythrocyte reactivity indicators, hemoglobin concentration and rat blood free radical balance

Показатель	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
β-АРЭ, отн. ед.	0,068	–0,215	0,862*
М-ХРЭ, отн. ед.	–0,877*	0,361	0,003
Содержание гемоглобина, г/л	0,203	–0,685*	–0,181
Содержание ТБК-РП в эритроцитах, нмоль/мл эритроцитарной массы	0,841	0,064	–0,155
Содержание ТБК-РП в плазме крови, нмоль/мл	–0,239	0,268	0,803*
Активность каталазы в эритроцитах, мккат/мл эритроцитарной массы	0,805*	0,505*	–0,020
Каталазная активность плазмы, мккат/л	0,284	0,809*	–0,226
Общая дисперсия: 5,438	2,310	1,632	1,496
Доля общей дисперсии: 0,777	0,330	0,233	0,214

Примечание. * – нагрузка значима при $p < 0,05$.

Итак, у крыс с высокими величинами β-АРЭ зафиксировано большее содержание гемоглобина и ТБК-РП, а также повышенная активность каталазы эритроцитов, но несколько меньшая активность каталазы плазмы крови, нежели у крыс с низкими и средними величинами β-АРЭ.

Затем был выполнен корреляционный и факторный анализ данных, полученных от 21 интактной особи крыс, у которых помимо величин β-АРЭ и показателей, приведенных в табл. 1, были определены М-ХРЭ и содержание ТБК-РП в эритроцитах.

Корреляционный анализ показал, что β-АРЭ и М-ХРЭ не имеют между собой тесной связи и коррелируют только через оптические плотности проб по их определению ($r = 0,79$; $p < 0,01$). При этом β-АРЭ образует довольно слабые связи с показателями СРБ крови. Самой сильной является связь с уровнем ТБК-РП плазмы ($r = 0,43$), вторая по силе связь – с активностью каталазы плазмы ($r = –0,25$). М-ХРЭ, в отличие от β-АРЭ, образует с показателями СРБ более тесные связи, сопряжена с содержанием ТБК-РП в эритроцитах ($r = –0,63$; $p < 0,05$) и активностью каталазы эритроцитов ($r = –0,58$). Концентрация гемоглобина в крови не коррелирует с β-АРЭ, образует слабую связь лишь с М-ХРЭ ($r = –0,34$). Таким образом, сила корреляционных связей показателей реактивности эритроцитов с параметрами СРБ крови у интактных животных невысока, но М-ХРЭ сопряжена с ними теснее, чем β-АРЭ. При этом β-АРЭ коррелирует только с плазменными, а М-ХРЭ – преимущественно с эритроцитарными показателями СРБ.

В результате факторного анализа с применением ортогонального вращения по методу Varimax выделено три фактора (табл. 2). Самый весомый по величинам факторных нагрузок фактор Ф1 был образован М-ХРЭ, уровнем ТБК-РП и активностью каталазы эритроцитов и определен как *фактор холинореактивности и свободнорадикального баланса эритроцитов*. Основным компонентом Ф2 стала активность каталазы плазмы, а также концентрация гемоглобина и, в меньшей мере, активность каталазы эритроцитов. Учитывая это, фактор Ф2 назван *фактором антиоксидантной защиты крови*. Наконец, Ф3 был сформирован β-АРЭ, концентрацией ТБК-РП и активностью каталазы плазмы, поэтому был определен в качестве *фактора адренореактивности эритроцитов и свободнорадикального баланса плазмы крови*.

Таким образом, факторный анализ показал достаточную весомость и самостоятельность β-АРЭ и М-ХРЭ в характеристике свойств крови с учетом ее СРБ, поскольку М-ХРЭ выступила ведущим показателем фактора Ф1, а β-АРЭ основным показателем фактора Ф3. Факторный анализ подтвердил преимущественную сопряженность М-ХРЭ с эритроцитарными, β-АРЭ – с плазменными характеристиками крови.

Проведенный анализ дал основание предполагать, что вещества, комплементарные адрено- и холинорецепторам эритроцитов, способны через

Таблица 3

Влияние однократного введения β-адреноблокатора и М-холиноблокатора на β-АРЭ, М-ХРЭ и показатели СРБ крови крыс, M ± m

Table 3

The effect of a single injection of β-adrenergic antagonist and antimuscarinic agent on β-ARE, M-ChRE and rat blood free radical balance, M ± m

Показатель	Контроль (n = 16)	β-адреноблокатор (n = 12)	М-холиноблокатор (n = 12)
β-АРЭ, отн. ед.	42,2 ± 2,3	20,4 ± 1,7***	18,7 ± 1,5***
М-ХРЭ, отн. ед.	13,3 ± 2,4	–	6,4 ± 1,2**
Содержание ТБК-РП в эритроцитах, нмоль/мл эритроцитарной массы	4,0 ± 0,4	7,4 ± 1,4*	4,4 ± 0,4
Содержание ТБК-РП в плазме крови, нмоль/мл	1,4 ± 0,3	2,9 ± 0,4*	1,3 ± 0,2
Активность каталазы в эритроцитах, мккат/мл эритроцитарной массы	240,0 ± 8,0	278,1 ± 6,8*	301,9 ± 4,3***
Каталазная активность плазмы, мккат/л	51,7 ± 4,0	73,2 ± 3,7**	80,4 ± 4,5**

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

активацию внутриклеточных сигнальных каскадов влиять как на реактивность эритроцитов, так и на свободнорадикальные процессы в крови и активность антиоксидантных ферментов. Для проверки этого предположения показатели были исследованы на фоне введения в организм животных блокатора β-адренорецепторов анаприлина и блокатора М-холинорецепторов атропина.

Введение анаприлина привело к снижению β-АРЭ на 48,2 % ($p < 0,01$); по сравнению с контролем величина показателя оказалась меньше на 51,6 % ($p < 0,001$) (табл. 3). На фоне введения β-адреноблокатора концентрация ТБК-РП в эритроцитах и плазме крови была больше контрольных величин на 85 и 107 % соответственно ($p < 0,05$). Активность каталазы также была повышенной: в эритроцитах на 15,9 % ($p < 0,05$), в плазме крови на 41,6 % ($p < 0,01$). Таким образом, введение анаприлина снизило β-АРЭ, но привело к росту интенсивности ПОЛ и антиоксидантной защиты крови.

Однократное введение атропина вызвало тренд к снижению М-ХРЭ (на 44 %, $p < 0,1$), а в сравнении с контролем М-ХРЭ стала меньше на 52 % ($p < 0,01$) (см. табл. 3). То есть, атропин как блокатор М-холинорецепторов оказал эффект на М-ХРЭ, аналогичный тому, что наблюдался при введении анаприлина в отношении β-АРЭ, но только в диапазоне более низких величин (4–14 отн. ед.). β-АРЭ, определенная наряду с М-ХРЭ, у крыс, получивших атропин, оказалась в 2,2 раза ниже ($p < 0,001$), чем в контроле. Иными словами, введение атропина снизило реактивность эритроцитов к веществам, комплементарным не только холино-, но и адренорецепторов.

У крыс, получивших блокатор М-холинорецепторов, активность каталазы в эритроцитах и плазме крови была на 25,8 % ($p < 0,001$) и 55,5 % ($p < 0,01$) выше соответствующих значений в контроле. Однако блокада М-холинорецепторов практически не повлияла на концентрацию ТБК-РП в эритроцитах и плазме крови. То есть на фоне атропина, несмотря на снижение М-ХРЭ и β-АРЭ, интенсивность ПОЛ оставалась стабильной при повышении активности каталазы эритроцитов и плазмы крови.

Корреляционный анализ показал, что на фоне анаприлина усилилась сопряженность β-АРЭ с уровнем ТБК-РП и активностью каталазы эритроцитов (с $r = –0,04$ до $r = –0,26$ и с $r = –0,12$ до $r = –0,32$ соответственно). Особенно сильные связи со всеми показателями СРБ крови образовала оптическая плотность проб по определению β-АРЭ: от $r = –0,92$ до $r = –0,55$ ($p < 0,01$). Следовательно, возросла сила корреляций β-АРЭ с эритроцитарными показателями и несколько слабее стали ее корреляции с плазменными показателями СРБ крови.

После введения атропина усилилась связь М-ХРЭ с активностью каталазы эритроцитов (с $r = –0,63$ до $–0,85$; $p < 0,05$) и плазмы крови (с $r = 0,14$ до $0,59$), выросли коэффициенты корреляции уровня ТБК-РП плазмы с концентрацией ТБК-РП в эритроцитах (с $r = –0,35$ до $r = –0,85$; $p < 0,05$) и с активностью каталазы эритроцитов (с $r = –0,03$ до $r = –0,45$). То есть на фоне блока-

ды М-холинорецепторов выросла сопряженность М-ХРЭ с активностью каталазы крови, усилились связи между плазменными и эритроцитарными показателями СРБ крови.

Таким образом, β-АРЭ и М-ХРЭ снижаются при введении в организм и блокатора β-адренорецепторов, и блокатора М-холинорецепторов. Это свидетельствует о высокой чувствительности показателей реактивности эритроцитов к такого рода воздействиям, подтверждает их способность отражать изменения в связывании эритроцитами веществ, комплементарных адрено- и холинорецепторам. Полученные данные свидетельствуют, что на уровне эритроцитарных мембран происходит взаимодействие β-адренорецепторов и М-холинорецепторов, которое, по-видимому, имеет значение для оптимальной регуляции свойств и функций эритроцитов. Изменение активности каталазы крови и уровня ТБК-РП одновременно со снижением β-АРЭ и М-ХРЭ при введении блокаторов адрено- и холинорецепторов подтверждает предположение о том, что активность ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов и общее про- и антиоксидантное состояние крови зависят от рецепции регуляторных факторов на мембране эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Переходя к обсуждению результатов, следует сказать, что приведенные в исследовании данные в целом соответствуют полученным ранее [5, 6, 18]. Так, средняя величина β-АРЭ в выборке находилась в пределах 35–45 отн. ед, М-ХРЭ – 5–15 отн. ед. Для характеристики СРБ взяты наиболее часто определяемые показатели: уровень ТБК-РП и активность каталазы эритроцитов и плазмы крови. Это дает определенное основание говорить о балансе применительно как к системе «прооксиданты – антиоксиданты» [11], так к системе «эритроциты – плазма крови»

Тот факт, что у крыс с высокой β-АРЭ содержание ТБК-РП и активность каталазы эритроцитов выше, а активность каталазы в плазме крови ниже, чем у крыс с низкой и средней β-АРЭ, согласуется с представлениями об активации процессов свободнорадикального окисления при избыточности адренергической реакции [10, 11, 14]. Выявленная зависимость позволяет предполагать, что связывание лигандов с адренорецепторами мембраны вызывает активацию внутриклеточных сигнальных каскадов, влияющих не только на белки цитоскелета [7, 8, 15], но и на активность эритроцитарной каталазы. Это необходимо для поддержания высокого уровня антиоксидантной защиты в условиях усиленной адренергической реакции. Уменьшение активности каталазы плазмы может рассматриваться как следствие низкой проницаемости мембраны, поскольку фосфорилирование элементов цитоскелета приводит к повышению прочности связей между ними [7, 8, 15].

Структура корреляций и факторных нагрузок продемонстрировала бóльшую сопряженность М-ХРЭ, нежели β-АРЭ, с показателями СРБ крови. Полагаем, что преимущественная связь β-АРЭ с плазменными, а М-ХРЭ – с эритроцитарными показателями СРБ объясняется ролью холинергических влияний в поддержании гомеостаза, в данном случае на уровне эритроцитов, и ролью адренергических влияний в изменении гомеостаза эритроцитов в ответ на запросы извне, опосредованные сдвигами в составе плазмы крови, что согласуется с представлениями о функциях отделов вегетативной нервной системы в организме [3].

Уменьшение β-АРЭ после введения анаприлина говорит о том, что блокатор действительно снижает число свободных адренорецепторов на мембранах и резко ограничивает способность эритроцитов реагировать повышением осмотической стойкости в среде инкубации на вещества, комплементарные β-адренорецепторам. Ранее [5, 18] нами показано, что введение анаприлина уменьшает β-АРЭ параллельно с урежением ЧСС, т.е. адренорецепторы, локализованные в миокарде и на мембранах эритроцитов, блокируются одновременно. Увеличение интенсивности ПОЛ в этих условиях может рассматриваться как результат повышения уровня свободных катехоламинов в крови из-за ограничения связывания их эритроцитами. Свободные катехоламины при определенных условиях склонны к аутоокислению в хиноидные соединения и становятся источниками активных форм кислорода [20]. Это могло выступить непосредственной причиной накопления продуктов ПОЛ. Вклад в накопление ТБК-РП при блокаде β-адренорецепторов могла внести недостаточная активация внутриэритроцитарных процессов, в том числе антиоксидантной защиты, на что указывает весьма умеренное повышение активности каталазы крови. Названные изменения хорошо согласованы, что подтверждается усилением силы корреляций β-АРЭ с эритроцитарными показателями СРБ.

Введение атропина снизило не только М-ХРЭ, ограничив число М-холинорецепторов, способных взаимодействовать с холинолитиком в среде инкубации, но весьма существенно снизило и β-АРЭ. С учетом данных Б.Н. Манухина и Л.А. Нестеровой [9], такой эффект блокатора хо-

линорецепторов может свидетельствовать об изменении сродства адренорецепторов к лигандам за счет рецептор-рецепторных взаимодействий в эритроцитарных мембранах. Полагаем, что в присутствии атропина увеличивается жесткость мембраны [9, 22], происходит стабилизация активированного состояния адренорецепторов, согласно данным Е.В. Артемовой и соавторов [1], что ограничивает эффект анаприлина в среде инкубации при определении β-АРЭ. Стабильность показателей ПОЛ при повышении активности каталазы, особенно в эритроцитах, могло стать результатом 1) снижения сродства адренорецепторов к катехоламинам из-за аллостерических взаимодействий адрено- и холинорецепторов в эритроцитарных мембранах [9], 2) потенцирования атропином аденилатциклазного каскада [21]. Усиление связей М-ХРЭ с показателями СРБ крови после введения атропина свидетельствует о том, что вещества, комплементарные М-холинорецепторам, способны оказывать если не прямое, то опосредованное (через модуляцию свойств адренорецепторов и компонентов адренергического сигнального каскада) влияние на активность ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных исследований можно прийти к следующим заключениям:

1. Показатели реактивности эритроцитов у нелинейных крыс в интактном состоянии (β-АРЭ – 40,6 ± 2,3 отн. ед., М-ХРЭ – 7,9 ± 0,3 отн. ед.) характеризуются определенной сопряженностью с показателями свободнорадикального баланса крови, что подтверждает перспективность их использования в экспериментальной практике.

2. Животные с высокой β-АРЭ имеют несколько большее содержание гемоглобина, более высокий уровень ТБК-реактивных продуктов и активности каталазы в эритроцитах, но меньшую каталазную активность плазмы крови, нежели крысы со средними и низкими значениями β-АРЭ.

3. По результатам корреляционного и факторного анализа М-ХРЭ сильнее сопряжена и образует фактор Ф1 с эритроцитарными показателями, а β-АРЭ связана и образует фактор Ф3 с плазменными показателями свободнорадикального баланса крови.

4. Блокада β-адренорецепторов снижает β-АРЭ и потенцирует смещение СРБ в сторону накопления продуктов ПОЛ в эритроцитах и плазме крови, блокада М-холинорецепторов снижает М-ХРЭ и β-АРЭ, способствует усилению антиоксидантной защиты в виде повышения каталазной активности эритроцитов, что свидетельствует о взаимодействии адрено- и холинорецепторов эритроцитов и их участии в изменении активности антиоксидантных ферментов и интенсивности свободнорадикальных процессов в крови.

Таким образом, сопряженность β-АРЭ и М-ХРЭ с показателями СРБ крови у интактных нелинейных крыс довольно слабая, но для особей с высокой β-АРЭ характерны более высокие каталазная активность эритроцитов и содержание ТБК-РП в плазме крови. Специфичность корреляционных связей β-АРЭ и М-ХРЭ с эритроцитарными и плазменными параметрами СРБ крови, по-видимому, отражает функциональное назначение адрено- и холинорецепторов эритроцитов. Введение блокаторов адрено- и холинорецепторов вызывает снижение β-АРЭ, М-ХРЭ, сдвиги в СРБ крови и корреляционных отношениях. Следовательно, показатели реактивности эритроцитов могут рассматриваться как связующее звено между регуляторными и биохимическими процессами на уровне эритроцитов. Определение β-АРЭ и М-ХРЭ в комплексе с параметрами СРБ и другими биохимическими показателями крови может дать дополнительную информацию о регуляторных влияниях на эти процессы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемова Е.В., Горбачева А.М., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю., Гаврилова С.А., Дедов И.И. Механизмы нейрогуморальной регуляции клеточного цикла кератиноцитов при сахарном диабете. *Сах. диабет*. 2016; 19 (5): 366–374.

Artemova E.V., Gorbacheva A.M., Galstyan G.R., Tokmakova A.Yu., Gavrilova S.A., Dedov I.I. Mechanisms of neurohumoral regulation of the cell cycle of keratinocytes in diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*. 2016; 19 (5): 366–374. [In Russian].

2. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г. Структурно-функциональная характеристика мембран эритроцита и ее изменение при патологиях разного генеза. *Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН*. 2010; (3): 334–354.

Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorohova V.G. Structural and functional characteristics of erythrocyte membranes and its change in pathologies of different genesis. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2010; (3): 334–354. [In Russian].

3. Вейн А.М. Краткий анатомо-физиологический очерк. Вегетативные расстройства: Клиника, диагностика, лечение. М.: МИА, 2003. 14–43.

Veyn A.M. Brief anatomical and physiological essay. Vegetative disorders: Clinic, diagnosis, treatment. Moscow: MIA, 2003. 14–43. [In Russian].

4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988; (1): 16–18.

Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo = Laboratory Business*. 1988; (1): 16–18. [In Russian].

5. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Теплый Д.Л. Влияние стимуляции нейромедиаторных систем на вариабельность сердечного ритма и адренореактивность эритроцитов крови нелинейных крыс. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2017; 163 (1): 40–45.

Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Teplyy D.L. Effect of stimulation of neurotransmitter systems on heart rate variability and β-adrenergic responsiveness of erythrocytes in outbred rats. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2017; 163 (1): 31–36.

6. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Теплый Д.Л. Адрено- и холинореактивность эритроцитов и анализ их сопряженности с показателями сердечного ритма у нелинейных крыс. *Биомедицина*. 2018; (2): 33–46.

Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Teplyy D.L. Adreno- and cholinoreactivity of erythrocytes and analysis of their conjugation with heart rate indices in nonlinear rats. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2018; (2): 33–46. [In Russian].

7. *Курята А.В., Соя Е.В*. Уровень активности β-адренорецепторов, состояние функции эндотелия и мембран эритроцитов у больных старших возрастных групп с сердечной недостаточностью и их изменением под влиянием лечения. *Укр. кардіол. журн*. 2004; (3): 60–65.

Kuryata A.V., Soya E.V. Level of β-adrenoreceptor activity, the state of endothelial function and erythrocyte membranes in patients of older age groups with heart failure and their change under the influence of treatment. *Ukrayins'kyy kardiolohichnyy zhurnal = Ukrainian Cardiology Journal*. 2004; (3): 60–65. [In Russian].

8. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови: монографическое исследование. Белгород: БелГУ, 2007. 324 с.

Lipunova E.A., Skorkina M.Yu. Physiology of blood: monographic study. Belgorod.: BelGU, 2007. 324 p. [In Russian].

9. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. Аллостерическое влияние атропина и карбахола на активность альфа2-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс. *Биол. мембраны*. 2011; 28 (5): 382–386.

Manukhin B.N., Nesterova L.A. Allosteric effects of atropine and carbachol on the activity of alpha 2-adrenergic receptors in rat cerebral cortex membranes. *Biologicheskie membrany = Biological membranes*. 2011; 28 (5): 382–386. [In Russian].

10. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина, 1984. 266 с.

Meerson F.Z. Pathogenesis and prevention of stressor and ischemic heart damage. Moscow: Meditsina, 1984. 266 p. [In Russian].

11. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.

Menshchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants. Moscow: Slovo, 2006. 556 p. [In Russian].

12. Мещанинов В.Н., Щербаков Д.Л. Влияние нейромедиаторов на перекисное окисление липидов при иммобилизационном стресс-воздействии у крыс разного возраста. *Казан. мед. журн*. 2015; (5): 843–849.

Meshchaninov V.N., Shcherbakov D.L. Influence of neurotransmitters on lipid peroxidation during immobilization stress in rats of different ages. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2015; (5): 843–849. [In Russian].

13. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Ахапкина А.А., Булаева С.В., Михайлов П.В., Муравьев А.А. Микромеханические ответы эритроцитов человека на стимулирование мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов. *Рос. журн. биомех*. 2016; 20 (1): 28–36.

Murav'ev A.V., Tikhomirova I.A., Akhapkina A.A., Bulaeva S.V., Mikhaylov P.V., Murav'ev A.A. Micromechanical responses of human erythrocytes to stimulation of membrane receptors, ion channels and enzymes. *Rossiyskiy zhurnal biomekhaniki = Russian Journal of Biomechanics*. 2016; 20 (1); 28–36.

14. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии. Актуальные проблемы патофизиологии. Ред. Б.Б. Мороз. М.: Медицина, 2001. 220–353.

Pshennikova M.G. The phenomenon of stress. Emotional stress and its role in pathology. Actual problems of pathophysiology. Ed B.B. Moroz. Moscow: Meditsina, 2001. 220–353. [In Russian].

15. Скоркина М.Ю. Морфофизиологический анализ механизмов регуляции объема клеток крови. Автореф. дис. … д-ра биол. наук. Астрахань, 2014. 40 с.

Skorkina M.Yu. Morphological and physiological analysis of the mechanisms regulating the volume of blood cells. Abstract of the thesis … doctor of biological sciences. Astrakhan, 2014. 40 p. [In Russian].

16. Стрельникова А.И., Циркин В.И., Крысова А.В., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л. М-холи-

нореактивность эритроцитов небеременных и беременных женщин, определяемая по изменению скорости агглютинации эритроцитов под влиянием ацетилхолина. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2012; 154 (8): 140–143.

Strelnikova A.I., Tsirkin V.I., Krysova A.V., Hlybova S.V., Dmitrieva S.L. M-cholinoreactivity of erythrocytes of non-pregnant and pregnant women evaluated by changes in the rate of erythrocyte agglutination under the influence of acetylcholine. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2012; 154 (2): 180–183.

17. Стрюк Р.И., Длусская И.Г. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система. М.: Медицина, 2003. 160 с.

Stryuk R.I., Dlusskaya I.G. Adrenoreactivity and cardiovascular system. Moscow: Meditsina, 2003. 160 p. [In Russian].

18. Трясучев А.В., Курьянова Е.В., Зиновьева К.И., Мясникова Е.А., Дьяконова В.Ф., Остроушко Т.С. Адренореактивность эритроцитов и сердечный ритм крыс при введении анаприлина и атропина на фоне стимуляции центральной норадренергической. *Естеств. науки*. 2017; 59 (2): 71–79.

Tryasuchev A.V., Kuryanova E.V., Zinoveva K.I., Myasnikova E.A., Dyakonova V.F., Ostroushko T.S. Adrenoreactivity of erythrocytes and cardiac rhythm of rats with the administration of anaprilin and atropine against the background of stimulation of central noradrenergic. *Estestvennye nauki = Natural Sciences*. 2017; 59 (2): 71–79. [In Russian].

19. Циркин В.И., Анисимов К.Ю., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л., Братухина О.А., Попова В.С., Шушканова Е.Г. Хемореактивность эритроцитов как отражение течения беременности и родов (обзор литературы). *Вестн. Урал. мед. акад. науки*. 2015; (4): 143–150.

Tsirkin V.I., Anisimov K.Yu., Hlybova S.V., Dmitrieva S.L., Bratuhina O.A., Popova V.C., Shushkanova E.G. Chromoreactivity of erythrocytes as a reflection of the course of pregnancy and childbirth. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*. 2015; (4): 143–150. [In Russian].

20. Fu Y., Han J., Ishola T., Scerbo M., Adwanikar H., Ramsey C., Neugebauer V. PKA and ERK, but not PKC, in the amygdala contribute to pain-related synaptic plasticity and behavior. *Mol. Pain*. 2008; 6 (4): 26–46.

21. Katzung B.G. Basic and clinical pharmacology, 14th ed. McGraw-Hill Education, 2017. 1264 p.

22. Lopes de Almeida J.P., Saldanha C. Nonneuronal cholinergic system in human erythrocytes biological role and clinical relevance. *J. Membr. Biol*. 2010; 234: 227–234.

Сведения об авторах:

Курьянова Е.В., д.б.н, e-mail: fyzevk@rambler.ru
Трясучев А.В., к.б.н.
Тёплый Д.Л., д.б.н., проф.

Information about authors:

Kuryanova E.V., doctor of biological sciences, e-mail: fyzevk@rambler.ru
Tryasuchev A.V., candidate of biological sciences
Teply D.L., doctor of biological sciences, professor

УДК 572.7:611.441:616.441-008.64 DOI: 10.15372/SSMJ20190406

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТКАНЕВОГО МИКРОРАЙОНА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ

Ольга Владимировна ГОРЧАКОВА[1], Владимир Николаевич ГОРЧАКОВ[1,2], Георгий Анатольевич ДЕМЧЕНКО[3], Серик Наурызбаевич АБДРЕШОВ[3]

[1] *НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

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

[3] *Институт физиологии человека и животных Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан Республика Казахстан, 050060, г. Алма-Ата, просп. Аль-Фараби, 93*

Цель работы – исследование структур тканевого микрорайона щитовидной железы при экспериментальном гипотиреозе. **Материал и методы.** Модель гипотиреоза создавали приемом мерказолила в течение месяца в дозе 5 мг на 100 г массы тела. Светооптическими и ультраструктурными методами исследовали структуры тканевого микрорайона (фолликул, тиреоцит, межфолликулярное пространство) с морфометрией и расчетом интегральных показателей функциональной активности щитовидной железы. **Результаты и их обсуждение.** Морфофизиологической структурой щитовидной железы является тканевой микрорайон, объединяющий группу фолликулов и межфолликулярное пространство, которые имеют особенности структурного ответа на прием мерказолила. Под влиянием тиреостатического средства изменяется фолликулярная организация щитовидной железы с преобладанием мелких и средних фолликулов с признаками альтерации. Со стороны тиреоцитов выявлены расширение и деформация цистерн гранулярной эндоплазматической сети, образование внутриклеточного коллоида, уменьшение числа лизосом и митохондрий с их дезорганизацией. При гипотиреозе соотношение фолликулярного эпителия, коллоида и стромы меняется из-за изменения их площади. Удельная доля интерстиция увеличивается, происходит накопление тканевой жидкости, дренаж которой ослаблен. Кровеносное и лимфатическое русло реагирует уменьшением объемной плотности на прием мерказолила. **Заключение.** Тиреостатическое действие мерказолила отражается на морфологии тканевого микрорайона, изменяя метаболические и транспортные процессы, что свидетельствует о снижении функции щитовидной железы при создании адекватной модели гипотиреоза.

Ключевые слова: щитовидная железа, тканевой микрорайон, гипотиреоз.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов.
Благодарности. Работа выполнена при поддержке и в рамках научного проекта AP0513299 МОН РК.
Автор для переписки: Горчаков В.Н., e-mail: vgorchak@yandex.ru
Для цитирования: Горчакова О.В., Горчаков В.Н., Демченко Г.А., Абдрешов С.Н. Морфологическая характеристика тканевого микрорайона щитовидной железы при экспериментальном гипотиреозе. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 46–54. doi: 10.15372/SSMJ20190406.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TISSUE MICROREGION OF THE THYROID GLAND AT EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

Olga Vladimirovna GORCHAKOVA[1], Vladimir Nikolaevich GORCHAKOV[1,2], Georgiy Anatolevich DEMCHENKO[3], Serik Nauryzbaevich ABDRESHOV[3]

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

[2] *Novosibirsk State University*
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

[3] *Institute of Human and Animal Physiology of the Scientific Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan*
Kazakhstan, 050060, Almaty, Al-Farabi av., 93

Research purpose was to study the structures of the tissue microregion of the thyroid gland at an experimental hypothyroidism. **Material and methods.** The hypothyroidism model was created by mercazolilum intake at a dose of 5 mg/100 g of body mass for a month. The structure of tissue area (follicle, thyrocyte, interfollicular space) with morphometry and calculation of the integral indicators of the thyroid gland functional activity have been investigated by the light-optical and ultrastructural methods. **Results and discussion.** The morphophysiological structure of the thyroid gland is a tissue microregion. It unites a group of follicles and interfollicular space. The structure of the tissue miroregion have features of structural response to merkazolilum intake. The thyrostatic remedy changes the follicular organization of the thyroid gland to the predominance of small and medium follicles with signs of alteration. Thyrocytes have expansion and deformation of the granular endoplasmic reticulum cisterns, formation of intracellular colloid, reduction in the number of lysosomes and mitochondrions with their disorganization. The ratio of the area of the follicular epithelium, colloid and stroma changes at hypothyroidism. The portion of interstitial increases, there is an accumulation of tissue fluid because of weakening of a lymphatic drainage. Blood and lymphatic microvessels react by reducing the volume density to mercazolilum intake. **Conclusion.** The merkazolilum thyreostatics effects on morphology and metabolic and transport processes in tissue microregion. It testifies to decrease of thyroid function and the creation of hypothyroidism adequate model.

Key words: thyroid gland, tissue microregion, hypothyroidism.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Acknowledgments. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (scientific project AP0513299).

Correspondence author: Gorchakov V.N., e-mail: vgorchak@yandex.ru

Citation: Gorchakova O.V., Gorchakov V.N., Demchenko G.A., Abdreshov S.N. Morphological characteristics of tissue microregion of the thyroid gland at experimental hypothyroidism. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 46–54. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190406.

Вопросам морфологии щитовидной железы уделяется большое внимание из-за роста эндокринной патологии во всем мире. Патология щитовидной железы занимает второе место после сахарного диабета [6, 8, 11, 15, 16]. По данным морфоэкологических исследований, отмечено увеличение количества факторов, приводящих к снижению функции щитовидной железы и развитию гипотиреоза [19]. Патология щитовидной железы считается маркером экологического неблагополучия [12, 14]. Наиболее значимой морфофизиологической структурой щитовидной железы является тканевой микрорайон, объединяющий группу фолликулов и межфолликулярное пространство с автономной системой крово- и лимфообращения. Именно структуры тканевого микрорайона страдают больше всего при действии патогенных факторов на щитовидную железу, снижая ее роль в обеспечении морфологических и метаболических изменений в тканях и органах [2, 3, 5]. Это обусловливает перспективность подхода в оценке микроциркуляторно-тканевых систем щитовидной железы при гипотиреозе. В свою очередь информация об изменении структур тканевого микрорайона может дать существенный вклад в понимание патогенеза гипотиреоза и наметить стратегию коррекции.

Цель исследования – дать морфофункциональную оценку тканевого микрорайона щитовидной железы в условиях экспериментального гипотиреоза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент на животных и выведение их из опыта были выполнены в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики, изложенными на Женевской конференции (1971), а также в Приказе Минздрава СССР № 775 от 12.08.1977 «О гуманном обращении с экспериментальными животными», Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении Правил лабораторной практики» и в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985). Исследование одобрено Локальной

этической комиссией Казахского национального медицинского университета (протокол № 7 (71) от 11.06.2018).

Подготовка эксперимента и морфологические исследования были максимально стандартизированы, включая условия содержания животных, рацион питания, подбор животных, забор материала. Животные получали при свободном доступе к воде стандартную диету, которая включала экструдированный комбикорм ПК-120-1.

Опыт поставлен на 60 крысах-самцах Вистар средней массой 186 ± 3 г с выделением двух групп по 30 животных в каждой: 1) интактная (контроль, эутиреоз); 2) крысы, которые получали в течение месяца мерказолил. Мерказолил давали крысам из расчета 5 мг на 100 г массы тела, что обеспечивало получение адекватной модели экспериментального гипотиреоза, так как другие концентрации – более высокие и относительно низкие – искажают модель тиреоидной патологии [7, 9]. Препарат с торговым названием «мерказолил» (mercazolilum), или международным непатентованным названием «тиамазол» (thiamazole), является антитиреоидным средством, одна таблетка содержит 5 мг активного вещества тиамазола. По фармакологическим свойствам мерказолил относится к группе лекарственных средств, тормозящих образование гормонов щитовидной железы тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3), благодаря угнетению активности пероксидазы – фермента, участвующего в йодировании тиреоидных гормонов, что приводит к нарушению их синтеза.

По окончании эксперимента осуществляли забор щитовидной железы для морфологического исследования. Орган фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. После гистологической проводки в спиртах возрастающей концентрации материал просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Гистологические срезы щитовидной железы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали в световом микроскопе.

Для изучения структуры щитовидной железы на полутонких срезах кусочки органа размером 0,5 мм^3 фиксировали в 2,5%-м глутаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере в течение 3 ч при 4 °С с последующей дофиксацией в 1%-м растворе OsO_4 на фосфатном буфере в течение 2 ч и контрастировали в процессе обезвоживания 1,5%-м раствором уранилацетата в 70%-м этиловом спирте, затем осуществляли заливку в синтетические смолы. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. При анализе полутонких срезов выбирали участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Делали ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм на ультратоме «LKB-8800» («LKB Produkter AG», Швеция), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе «JEM 1010» («JEOL Ltd.», Япония).

Морфометрию проводили на электронограммах препаратов щитовидной железы с использованием стандартной тестовой системы, общее количество точек Рт=459, и общим увеличением в 21 000 раз. Обозначение и размерность параметров приведены согласно рекомендациям Международного стереологического общества. При выполнении гистостереометрии щитовидной железы применяли метод точечного счета [1]. С помощью стандартной сетки с 100 точками в окулярной насадке на условной единице площади (6400 мкм) определяли следующие структурно-функциональные параметры [10]: объемную плотность межфолликулярного пространства (строма), включая объемные плотности интерстиция, кровеносных и лимфатических сосудов; объемную плотность фолликулярного эпителия; объемную плотность интерфолликулярного эпителия; объемную плотность коллоида в полости фолликулов.

Количественную оценку проводили с помощью программы Image Pro Plus 4.1 с измерением в фолликуле щитовидной железы внутреннего и внешнего диаметра (не менее 30 фолликулов), высоты клеток фолликулярного эпителия (толщины стенки) с последующим расчетом фолликулярного индекса, площадей фолликула, коллоида и фолликулярного эпителия; в тиреоците – диаметра ядра с последующим расчетом его площади или объема (ядерный индекс) по известным формулам [13, 14].

Для изучения процессов фолликулогенеза анализировали спектр распределения фолликулов по диаметру [13, 14]. Гетерогенность структуры щитовидной железы определяли по количеству мелких (меньше 70 мкм), средних (70–100 мкм) и крупных (больше 100 мкм) фолликулов, исходя из величины их внутреннего диаметра, и рассчитывали индекс гетерогенности, в котором учитывали количество фолликулов (n) и степень (k) увеличения фолликула (для мелких – 0, для средних – 1, для крупных – 2) по формуле: $\sum kn/100$.

В качестве интегральных показателей функциональной активности тиреоидной паренхимы вычисляли индекс активности щитовидной железы (ИА) (или фолликулярно-коллоидный индекс (ФКИ), или индекс «накопления коллоида»), рассчитанный по соотношениям относительных объемов (площадей) фолликулярного эпителия и коллоида [1, 13, 14]; индекс функции (ИФ, соотношение среднего диаметра фолликула и высоты

тиреоидного эпителия [1]), или просвет-эпителиальный индекс (ПЭИ, отношение внутреннего диаметра фолликула к высоте тиреоидного эпителия: ПЭИ = d/h, где d – внутренний диаметр фолликула; h – высота тиреоидного эпителия [9]); показатель накопления коллоида (ПНК) – отношение внутреннего диаметра фолликула к удвоенной толщине его стенки: ПНК = $d_ф/(2 \times h)$, где $d_ф$ – внутренний диаметр фолликула; h – высота тиреоидного эпителия; индекс «склерозирования» (ИС) – соотношение относительных объемов паренхимы (фолликулярного эпителия) и стромы [4].

Статистическая обработка результатов исследования проведена с помощью программы Excel с внедренным модулем StatFi лицензионной программы StatPlus, AnalystSoft Inc. Рассчитывали среднюю арифметическую величину (M), его стандартную ошибку (m) и представляли в виде $M \pm m$. Принадлежность к нормальному распределению определяли с помощью критерия Колмогорова – Смирнова и сопутствующих показателей, для оценки уровня статистической значимости использовали t-критерий Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Таблица 1

Интегральные индексы функциональной активности щитовидной железы при эутиреозе и гипотиреозе

Table 1

Integrated indexes of thyroid gland functional activity in euthyroidism and hypothyroidism

Индекс	Эутиреоз (контроль)	Гипотиреоз (мерказолил)
ИА (ФКИ)	0,18 ± 0,11	0,71 ± 0,16*
ИФ (ПЭИ)	10,77 ± 0,32	3,62 ± 0,41*
ПНК	5,39 ± 0,41	1,81 ± 0,22*
ИС	0,56 ± 0,06	0,74 ± 0,04*
$V_{фэ}/V_{ифэ}$	6,53 ± 0,45	5,77 ± 0,40
$V_{фэ}/V_{к}$	0,24 ± 0,04	0,67 ± 0,08*

Примечание. ИА – индекс активности щитовидной железы (или ФКИ – фолликулярно-коллоидный индекс); ИФ – индекс функции (или ПЭИ – просвет-эпителиальный индекс), ПНК – показатель накопления коллоида; ИС – индекс «склерозирования»; $V_{фэ}/V_{ифэ}$ – соотношение объемной плотности фолликулярного и интерфолликулярного эпителия; $V_{фэ}/V_{к}$ – соотношение объемной плотности фолликулярного эпителия и коллоида, остальные обозначения в тексте; здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля (эутиреоз) статистически значимо при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тканевой микрорайон является структурным компартментом щитовидной железы и включает фолликулы, межфолликулярное пространство с кровеносными и лимфатическими микрососудами. Закономерно, что под влиянием тиреостатического средства в щитовидной железе в конечном итоге наступает функциональное истощение, морфофункциональным эквивалентом которого являются изменения, происходящие в тканевом микрорайоне. Это представляет особый интерес для понимания механизмов дисфункции щитовидной железы.

Фолликул. После приема мерказолила формируется гипотиреоидный статус с изменением фолликулярной организации щитовидной железы. Тиреоидный фолликул традиционно считается функциональной единицей щитовидной железы. В его структуре с учетом зональности преобладают мелкие (55,56 %) и средние (38,89 %) фолликулы, а крупных фолликулов фиксируется незначительное количество (5,56 %), в то время как в условиях эутиреоза преобладают средние и крупные фолликулы. Индекс гетерогенности уменьшается и достигает величины 0,5 (при эутиреозе – 1,19), отражая степень функциональной недостаточности щитовидной железы (табл. 1).

Средний диаметр фолликулов составил 43,93 ± 2,28 мкм, что в 2,5 раза меньше контрольного значения. Синхронно уменьшились общая площадь фолликула (в 2,2 раза), площадь, занимаемая в нем коллоидом (в 2,3 раза), и площадь фолликулярного эпителия (в 1,7 раза). Толщина фолликулярной стенки, определяемая высотой тиреоидного эпителия, увеличилась в 1,3 раза в сравнении с контролем и составила 11,10 ± 0,65 мкм. При эутиреозе высота эпителия отражает скорость тиреоидной секреции [17, 18] при условии, если нет патологических изменений. Всегда наблюдали участки с признаками как повышенной, так и пониженной функциональной активности. Выявлены альтеративные изменения в фолликулах разной величины, что связано с десквамацией эпителия, а в тиреоидном эпителии это выражалось в нарушении формы ядер, вакуолизации цитоплазмы. Чаще, чем в контроле, увеличение толщины тиреоидной стенки было связано с образованием внутриклеточного коллоида (рис. 1).

Тиреоцит. Собственно тиреоидная паренхима образована системой тиреоцитов, среди которых выделяются две основные разновидности – фолликулярные и интерфолликулярные клетки. Первые образуют фолликулы со способностью к внеклеточному накоплению гормонально-активных веществ. Вторые участвуют в пролиферации тиреоидной паренхимы, образуя интерфолли-

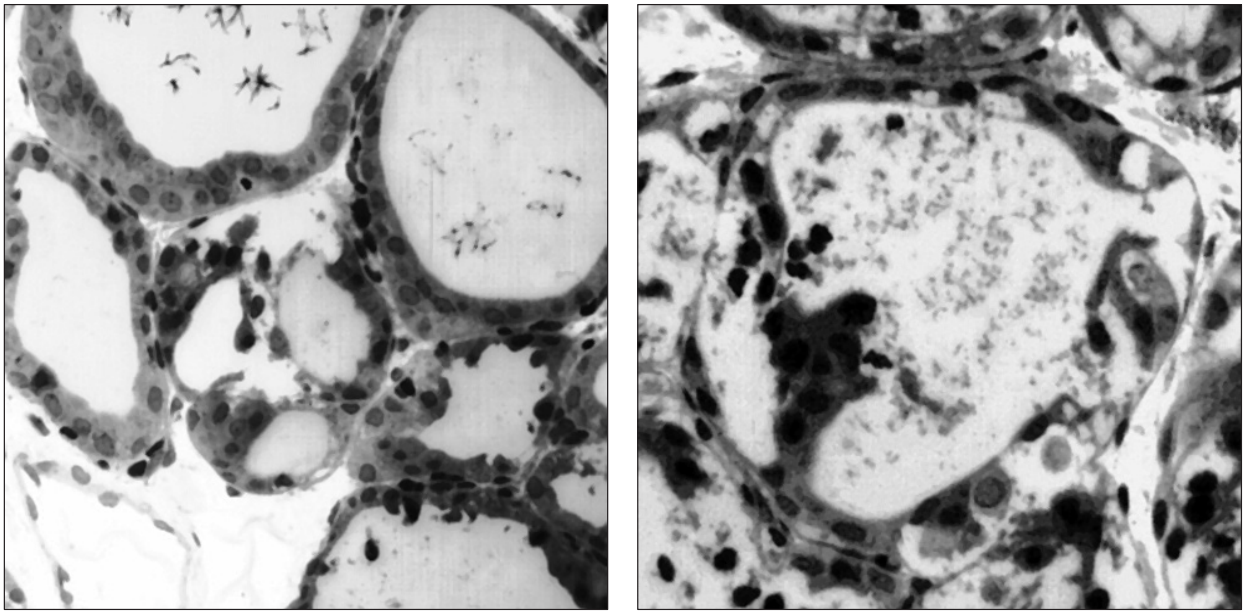

Рис. 1. *Фрагмент щитовидной железы. Увеличение толщины стенки фолликула, связанное с образованием внутриклеточного коллоида на фоне частичной десквамации эпителия. Гипотиреоз. Окраска полутонких срезов толуидиновым синим. Увеличение ок. 7, об. 20 (40)*

Fig. 1. *Fragment of thyroid gland. The increase in thickness of follicle wall related to formation of an intracellular colloid against the background of partial desquamation of epithelium. Hypothyroidism. Toluidine blue stain. Magnification: microscopic eyepiece 7, microscope objective 20 (40)*

кулярные островки между фолликулами. Прием мерказолила увеличил площадь, занимаемую интерфолликулярным эпителием. Анализ изменений размеров фолликулов весьма информативен, так как он связан с функцией органа и отражает структурный ответ на прием мерказолила, судя по интегральным показателям функциональной активности щитовидной железы (см. табл. 1). Наблюдалась активация пролиферации со стороны интерфолликулярного эпителия. В условиях приема мерказолила возрастало соотношение фолликулярного и интерфолликулярного эпителиев, в 3,9 раза увеличился интегральный показатель (индекс активности), что демонстрирует снижение функции щитовидной железы (см. табл. 1).

При гипотиреозе показатели тиреоцита (средний диаметр, объем ядра) оставались в пределах контрольных значений: средний диаметр ядра составлял 5,40 ± 0,16 мкм (при эутиреозе – 5,29 ± 0,14 мкм), площадь ядра (ядерный индекс) – 17,27 ± 1,89 мкм^2 (при эутиреозе – 16,64 ± 1,60 мкм^2), что указывает на сохранение клеток функционально активными. После приема мерказолила в 1,2 раза уменьшился ядерно-клеточный индекс (до 0,43 ± 0,04, при эутиреозе он составлял 0,50 ± 0,03; $p < 0,05$), что указывает на преобразование кубического фолликулярного эпителия в уплощенный. Последнее является признаком понижения функции тиреоидного эпителия при светооптическом исследовании.

Создание модели гипотиреоза сопряжено с изменением структурной организации самой фолликулярной клетки. При ультраструктурном анализе тиреоцитов выявлены определенные нарушения в виде резкого расширения и деформации цистерн гранулярной эндоплазматической сети с уменьшением электронной плотности их содержимого (рис. 2). При гипотиреозе на 16,1 % снижалась объемная плотность гранулярного эндоплазматического ретикулума в сравнении с показателем контрольной группы (табл. 2), при этом формировались крупные полости, содержащие коллоид в цитоплазме тиреоцита. У части тиреоцитов происходила десквамация эпителия в просвет фолликула с обнажением базальной мембраны. Все вышеперечисленное представляет собой признаки нарушения синтеза и/или транспорта тиреоглобулина в просвет фолликула.

Отмечена тенденция к снижению численной плотности лизосом при статистически значимом уменьшении на 41,2 % их объемной плотности в группе с гипотиреозом ($p = 0,013$). Это, по-видимому, отражает влияние мерказолила на активность резорбции и модификацию тиреоглобулина до тиреоидных гормонов. Одновременно наблюдали набухание и округление митохондрий

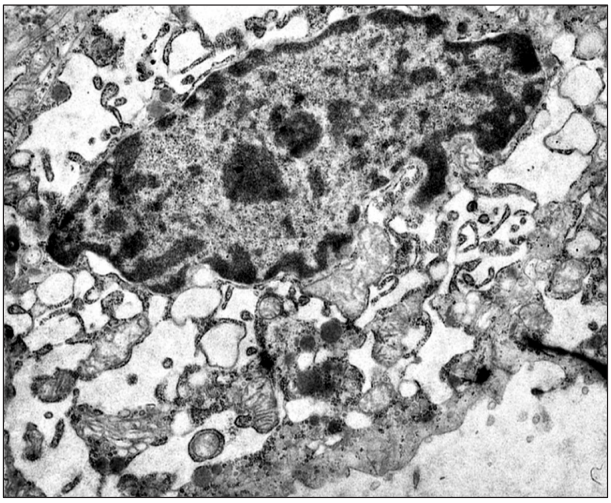

Рис. 2. *В цитоплазме тиреоцита небольшое количество органоидов, расширенный эндоплазматический ретикулум, округленные митохондрии, множество вакуолей, минимальное количество микроворсинок на люминальной поверхности. Гипотиреоз. Электронограмма. Увеличение ×8000*

Fig. 2. *Cytoplasm of thyrocyte has a small amount of organoids, an expanded endoplasmic reticulum, the rounded mitochondrions, a set of vacuoles, the minimum quantity of microvillis on a lumen surface. Hypothyroidism. Electronograms. Magnification ×8000*

с дезорганизацией их крист и просветлением матрикса. Распределение митохондрий было неравномерным, нередко они находились в тесном контакте с гранулярным эндоплазматическим ретикулумом (см. рис. 2). При гипотиреозе на 31,8 и 29 % уменьшились объемная и численная плотность митохондрий соответственно (см. табл. 2). В группе животных с гипотиреозом обнаружено уменьшение на 25,4 % объемной плотности вакуолей в цитоплазме тиреоцита. Основная масса вакуолей представлена расширенными цистернами эндоплазматического ретикулума. Объемная плотность капель коллоида (colloid droplets) в цитоплазме тиреоцита при гипотиреозе была достоверно выше, чем в контроле (в 1,9 раза, см. табл. 2). У отдельных тиреоцитов выявлены скопления липидных капель.

Отмеченные нарушения свидетельствуют о повреждающем действии мерказолила на синтетический аппарат тиреоцитов, сочетающемся с нарушениями энергетического митохондриального аппарата. При гипотиреозе в тиреоцитах изменяются метаболические процессы и транспортные процессы, связанные с синтезом и резорбцией коллоида.

Межфолликулярное пространство. Морфогенетические потенции стромально-паренхиматозных взаимоотношений определяются соотношением фолликулярной эпителиальной ткани, коллоида и интерстиция. При гипотиреозе оно составляло 1 : 1,3 : 1,2 (в контроле 1 : 3,5 : 1,5), что связано с изменением занимаемой этими структурами площади. В условиях приема мерказолила изменяется соотношение компонентов межфолликулярного пространства щитовидной железы (см. табл. 2). Изменение межфолликулярного пространства зависит от морфологии фолликулярного тиреоцита – уплощенная клетка или нет. Отмечено, что имеет место тесный контакт мембран фолликулярной клетки с микрососудами. В интерстиции обнаруживаются везикулы. В активных тиреоцитах призматической формы их базальная мембрана тесно контактирует с кро-

Таблица 2

Морфометрические показатели внутриклеточных структур тиреоцитов и межфолликулярного пространства щитовидной железы при эутиреозе и гипотиреозе

Table 2

Morphometric indicators of intracellular structures of thyrocytes and interfollicular space of thyroid gland in euthyroidism and hypothyroidism

Структура тиреоцита, параметр	Эутиреоз (контроль)	Гипотиреоз (мерказолил)
Гранулярный эндоплазматический ретикулум, Vv	31,58 ± 3,57	26,51 ± 2,24
Лизосомы		
Vv	7,30 ± 0,61	4,29 ± 0,78*
Na	23,90 ± 1,39	19,27 ± 0,97
Митохондрии		
Vv	6,64 ± 0,58	4,53 ± 0,42*
Na	13,90 ± 0,65	9,87 ± 0,55*
Вакуоли, Vv	18,54 ± 1,33	13,82 ± 1,25
Капли коллоида, Vv	3,01 ± 0,42	5,77 ± 0,55*
Объемная плотность интерстиция, %	11,73 ± 1,29 (57,42 %)	21,81 ± 0,87* (85,5 %)
Объемная плотность кровеносного русла, %	3,73 ± 0,22 (18,26 %)	1,40 ± 0,06* (5,49 %)
Объемная плотность лимфатического русла, %	4,97 ± 0,37 (24,33 %)	2,30 ± 0,09* (9,02 %)
Объемная плотность стромы, %	20,43 ± 0,63	25,51 ± 0,34*

Примечание. Na – численная плотность структур в площади среза (число структур в тестовой площади), мкм^0/мкм^2; Vv – объемная плотность структур (доля ультраструктуры в процентах от объема цитоплазмы), мкм^3/мкм^3.

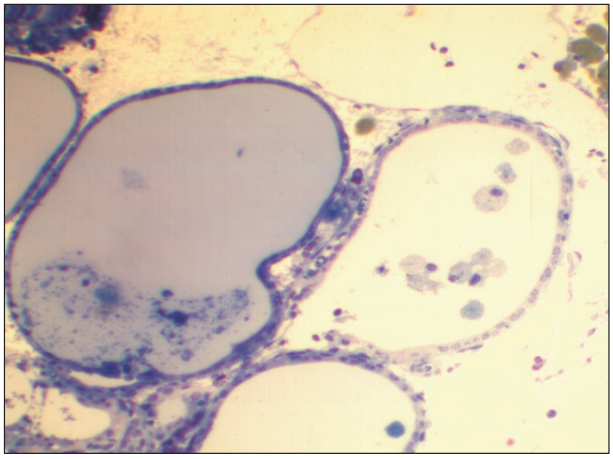

Рис. 3. *Фрагмент щитовидной железы с расширенным лимфатическим сосудом возле фолликулов. Дистрофичные клетки в просвете фолликулов. Гипотиреоз. Окраска полутонких срезов толуидиновым синим. Увеличение ок. 7, об. 10*

Fig. 3. *Fragment of a thyroid gland with expanded lymphatic vessel near follicles. Dystrophic cells in follicles. Hypothyroidism. Toluidine blue stain. Magnification: microscopic eyepiece 7, microscope objective 10*

веносным капилляром, что обеспечивает транспорт гормонов в просвет кровеносного капилляра.

Удельная доля интерстиция увеличивается в 1,86 раза, объемная плотность кровеносного и лимфатического русла уменьшается в 2,7 и 2,2 раза соответственно в структуре щитовидной железы. В интерстиции происходит накопление тканевой жидкости, дренаж которой ослаблен. При этом просвет лимфатических капилляров расширен при тесном контакте со стенкой фолликула (рис. 3). Показатели, оценивающие состояние микроциркуляторного русла, в изученных условиях изменялись достаточно резко. Это может указывать на снижение васкуляризации и лимфатического дренажа как на проявление механизма действия мерказолила. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности к тиреотропному воздействию не только кровеносного, но и лимфатического русла щитовидной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В тканевом микрорайоне щитовидной железы отмечены выраженные изменения структур после приема мерказолила, свидетельствующие о формировании гипотиреоидного состояния. Оценка изменения фолликулов показывает в разной степени выраженную перестройку их архитектоники, формы и размеров на фоне гипертрофии тиреоцита, интерфолликулярной пролиферации, фрагментации фолликулов в сочетании с десквамацией эпителия, интрацеллюлярным накоплением коллоида и ультраструктурными изменениями тиреоцита. Наиболее чувствительными к действию мерказолила являются интерстиций и микрососуды. Все это создает общую морфологическую картину тиреостатического действия мерказолила, отражая снижение функции щитовидной железы и создание адекватной модели гипотиреоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина, 2002. 240 с.

Avtandilov G.G. Basic of quantitative pathological anatomy. Moscow: Meditsina, 2002. 240 p. [In Russian].

2. Аухатова С.Н., Янбухтина Г.А. Особенности содержания йода в тканях животных при разном уровне йода и гойтрогенных веществ в рационе. *Вопр. соврем. науки и практ. ун-т им. В.И. Вернадского*. 2008; 2 (3): 29–32.

Aukhatova S.N., Yanbukhtina G.A. Features of the content of iodine in the tissues of animals under different levels of iodine and goitrogenic substances in the diet. Voprosy sovremennoy nauki i praktiki. *Universitet imeni Vladimira Ivanovicha Vernadskogo = Problems of Contemporary Science and Practice. Vernadsky University*. 2008; 2 (3): 29–32. [In Russian].

3. Бородин Ю.И., Горчакова О.В., Суховершин А.В., Горчаков В.Н., Фартуков А.В., Демченко Г.А. Концепция лимфатического региона в профилактической лимфологии. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2018. 73 с.

Borodin Yu.I., Gorchakova O.V., Sukhovershin A.V., Gorchakov V.N., Fartukov A.V., Demchenko G.A. The concept of lymphatic region in preventive lymphology. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2018. 73 p. [In Russian].

4. Быков В.Л. Стереологический анализ щитовидной железы. *Арх. анатомии*. 1979; LXXVII (7): 98–106.

Bykov V.L. Stereological analysis of the thyroid gland. *Arkhiv anatomii = Archive of Anatomy*. 1979; LXXVII (7): 98–106. [In Russian].

5. Горчакова О.В. Лимфотропный и иммунный эффекты фитотерапии гипотиреоза на этапе реабилитации. *Аллергология и иммунология*. 2008; 9 (3): 337.

Gorchakova O.V. Lymphotropic and immune effects of phytotherapy of hypothyroidism at the stage of rehabilitation. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*. 2008; 9 (3): 337. [In Russian].

6. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Трошина Е.А. Профилактика и лечение йоддефицитных заболеваний в группах повышенного риска. М., 2004. 120 с.

Dedov I.I., Melnichenko G.A., Troshina E.A. Prevention and treatment of iodine deficiency diseases in high-risk groups. Moscow: Meditsina, 2004. 120 p. [In Russian].

7. Козлов В.Н. Морфофункциональные изменения в щитовидной железе у белых крыс при моделировании тиреоидной патологии. *Вет. медицина*. 2006; (1): 18–19.

Kozlov V.N. Morphofunctional changes in the thyroid gland in white rats in the modeling of thyroid pathology. *Veterinarnaya meditsina = Veterinary Medicine*. 2006; (1): 18–19. [In Russian].

8. Мадиярова М.Ш., Моргунова Т.Б., Фадеев В.В., Насимов Б.Т., Ипполитов Л.И. Особенности клинической картины, показателей качества жизни и когнитивных функций у пациенток с гипотиреозом разной этиологии // *Клин. и эксперим. тиреоидология*. 2014; 10 (1): 44–54.

Madiyarova M.Sh., Morgunova T.B., Fadeev V.V., Nasimov B.T., Ippolitov L.I. Features of clinical pattern, quality of life and cognitive functions in patients with hypothyroidism of different etiology. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireoidologya = Clinical and Experimental Thyroidology*. 2014; 10 (1): 44–54. [In Russian].

9. Манюк Е.С., Изатулин В.Г., Васильева Л.С. Коррекция экспериментального гипотиреоза растительным препаратом «Баякон». *Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН*. 2008; (1): 54–57.

Manyuk E.S., Izatulin V.G., Vasilieva L.S. Correction of experimental hypothyroidism with herbal preparation «Bayakon». Byulleten' *Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2008; (1): 54–57. [In Russian].

10. Родзаевская Е.Б., Уварова И.А. Морфометрическое исследование щитовидной железы при зобе: нарушение нормальной корреляции тканевых компонентов. Фундаментальные исследования в биологии и медицине: сб. науч. ст. Ставрополь: Изд-во СГУ, 2006. Вып. 2. 78–82.

Rodsaevskaya E.B., Uvarova I.A. The morphometric study of the thyroid gland in the goiter: violation of the normal correlation of tissue components // Fundamental research in biology and medicine: collection of scientific papers. Stavropol: Publishing House of Stavropol State University, 2006. Issue 2. 78–82. [In Russian].

11. Федченко Н.П. Некоторые проблемы структурной организации щитовидной железы. *Арх. анатомии*. 1986; XC (6): 82–89.

Fedchenko N.P. Some problems of the structural organization of the thyroid gland. *Arkhiv anatomii = Archive of Anatomy*. 1986; XC (6): 82–89. [In Russian].

12. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: СО-ТИС, 2002. 284 с.

Khmelnitskiy O.K. Cytological and histological diagnosis of thyroid diseases. Saint Petersburg: SO-TIS, 2002. 284 p. [In Russian].

13. Хмельницкий О.К., Катинас Г.С., Быков В.Л. Морфометрическое исследование щитовидной железы. *Арх. патологии*. 1975; 37 (7): 71–76.

Khmelnitskiy O.K., Katinas G.S., Bykov V.L. Morphometric study of the thyroid gland. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*. 1975; 37 (7): 71–76. [In Russian].

14. Хмельницкий О.К., Третьякова М.С. Щитовидная железа как объект морфометрического исследования. *Арх. патологии*. 1998; (4): 47–49.

Khmelnitskiy O.K., Tretyakova M.S. Thyroid gland as an object of morphometric study. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*. 1998; (4): 47–49. [In Russian].

15. Яглова Н.В. Цитофизиологические особенности популяции тучных клеток щитовидной железы при воздействии липополисахарида. *Морфол. ведомости*. 2008; (3-4): 94–98.

Yaglova N.V. Cytophysiological features of the population of mast cells of the thyroid gland under the influence of lipopolysaccharide. *Morfologicheskiye vedomosti = Morphological Newsletter*. 2008. (3-4). 94–98. [In Russian].

16. Hegedus L. The thyroid nodule. *N. Engl. J. Med*. 2004; 351: 1764–1771.

17. Hoersch T.M. Comparative indexes of thyroid function in sheep. *Am. J. Physiol*. 1961; 201 (5): 819–822.

18. Robiller F., Stiller K.J., Machnik G. Zeitliche Zusammenhange zwischen Stoffwechselreaktionen und Epithelzeller uderungen der Schilddruse. *Z. micr. Anat. Forsch*. 1972; 86: 343.

19. Verheesen, R.H., Schweitzer, C.M. Iodine deficiency, more than cretinism and goiter. *Med. Hypotheses*. 2008; 71 (5): 645–648.

Сведения об авторах:

Горчакова О.В., к.м.н., ORCID 0000-0001-7732-7587, e-mail: vgorchak@yandex.ru
Горчаков В.Н., д.м.н., проф., ORCID 0000-0001-8135-7842, e-mail: vgorchak@yandex.ru
Демченко Г.А., д.м.н., e-mail: georgiidemchenko@mail.ru
Абдрешов С.Н., к.б.н, e-mail: snabdreshov@mail.ru

Information about authors:

Gorchakova O.V., candidate of medical sciences, ORCID 0000-0001-7732-7587, e-mail: vgorchak@yandex.ru
Gorchakov V.N., doctor of medical sciences, professor, ORCID 0000-0001-8135-7842, e-mail: vgorchak@yandex.ru
Demchenko G.A., doctor of medical sciences, e-mail: georgiidemchenko@mail.ru
Abdreshov S.N., candidate of biological sciences, e-mail: snabdreshov@mail.ru

УДК 602.66:612.017.12 DOI: 10.15372/SSMJ20190407

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ ВАРИАНТОВ HBcAg, ЭКСПОНИРУЮЩИХ ФРАГМЕНТЫ MPER ВИЧ-1

Андрей Павлович РУДОМЕТОВ, Надежда Борисовна РУДОМЕТОВА, Борис Николаевич ЗАЙЦЕВ, Леонид Рудольфович ЛЕБЕДЕВ, Александр Алексеевич ИЛЬИЧЕВ, Лариса Ивановна КАРПЕНКО

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора 630559, р. п. Кольцово Новосибирской области

Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем мирового здравоохранения. По ряду причин эффективной вакцины против этой инфекции на данный момент не создано. В настоящее время важным направлением в разработке вакцины против ВИЧ/СПИДа является конструирование иммуногенов, которые были бы способны индуцировать антитела, нейтрализующие широкий спектр штаммов ВИЧ-1 (bNAbs). Одним из подходов создания таких иммуногенов является конструирование химерных вирусоподобных частиц (VLPs), экспонирующих эпитопы, узнаваемые bNAbs. Целью исследования являлись получение и характеризация химерных VLPs на основе HBcAg, экспонирующих эпитопы, узнаваемые bNAbs 2F5 и 4E10. **Материал и методы.** Штаммы-продуценты химерных вариантов HBcAg получали путем трансформации клеток *Escherichia coli* BL21 рекомбинантными плазмидами, несущими гены *HBcAg* и содержащими встройки, кодирующие эпитопы bNAbs 2F5 и 4E10. Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B. Способность рекомбинантного HBcAg образовывать вирусоподобные частицы оценивали с помощью электронной микроскопии. Антигенные свойства эпитопов в составе химерных вариантов HBcAg анализировали с помощью иммуноблотинга. **Результаты.** Получена модифицированная нуклеотидная последовательность гена *HBcAg*, в состав которой были введены уникальные сайты рестрикции, фланкирующие район главной антигенной детерминанты кора. На основе данной генетической конструкции получены три рекомбинантные плазмиды, кодирующие химерные варианты HBcAg, включающие эпитопы bNAbs 2F5 и 4E10. С помощью иммуноблотинга установлено, что эпитопы, узнаваемые bNAbs, сохраняют свои антигенные свойства в составе химерных HBcAg.

Ключевые слова: ВИЧ-1, антигены, рекомбинантный HBcAg, рекомбинантные иммуногены, bNAbs, MPER.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта (грант № 18-44-543017).

Автор для переписки: Рудометов А.П., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Для цитирования: Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Зайцев Б.Н., Лебедев Л.Р., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Получение химерных вариантов HBcAg, экспонирующих фрагменты MPER ВИЧ-1. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 55–61. doi: 10.15372/SSMJ20190407.

OBTAINING CHIMERIC VARIANTS HBcAg EXPOSING HIV-1 MPER FRAGMENTS

Andrey Pavlovich RUDOMETOV, Nadezhda Borisovna RUDOMETOVA, Boris Nikolaevich ZAYTSEV, Leonid Rudol'fovich LEBEDEV, Alexander Alekseevich ILYICHEV, Larisa Ivanovna KARPENKO

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor 630559, Koltsovo, Novosibirsk region

The HIV-1 epidemic is one of the most acute global health problems. For several reasons, an effective vaccine against this infection has not yet been created. Currently, an important direction in the development of a vaccine against HIV / AIDS is the design of immunogens that would be able to induce antibodies that neutralize a high diversity of HIV-1 strains (bNAbs). One approach to creating such immunogens is the construction of chimeric virus-like particles (VLPs) exposing epitopes recognized by bNAbs. The aim of the study was to obtain and characterize chimeric VLPs based on HBcAg, exposing epitopes recognized by bNAbs 2F5 and 4E10. **Material and methods.** The producing strains of

chimeric HBcAg variants were obtained by transforming *E. coli* BL21 cells with recombinant plasmids carrying the HBcAg genes and containing insertions encoding bNAbs epitopes 2F5 and 4E10. Purification of recombinant proteins was performed using gel filtration on a sepharose CL-6B column. The ability of recombinant HBcAg to form virus-like particles was assessed using electron microscopy. Analysis of the antigenic properties of epitopes in the composition of chimeric variants of HBcAg was performed using immunoblotting. **Results.** A modified nucleotide sequence of the HBcAg gene was obtained, which included the introduction of unique restriction sites flanking the region of the main antigenic determinant of the core. Based on this genetic construct, three recombinant plasmids encoding chimeric HBcAg variants, including epitopes of bNAbs 2F5 and 4E10, were obtained. Using immunoblotting, it was found that epitopes recognized by bNAbs retain their antigenic properties after insertion into the HBcAg.

Key words: HIV-1, antigens, recombinant HBcAg, recombinant immunogens, bNAbs, MPER.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of The Novosibirsk region, grant № 18-44-543017.

Correspondence author: Rudometov A. P., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Citation: Rudometov A.P., Rudometova N.B., Zaytsev B.N., Lebedev L.R., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Obtaining chimeric variants HBcAg exposing HIV-1 MPER fragments. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 55–61. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190407.

Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем мирового здравоохранения. По ряду причин, основной из которых является высокая вариабельность ВИЧ-1, эффективной вакцины против этой инфекции на данный момент не создано. В настоящее время одним из важных направлений в разработке вакцины против ВИЧ/СПИДа является создание иммуногенов, которые были бы способны индуцировать антитела, нейтрализующие широкий спектр гетерологичных вариантов ВИЧ-1 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [6, 13]. bNAbs нацелены на пять областей Env ВИЧ-1: 1) сайт связывания вируса с клеточным рецептом CD4; 2) протеогликановый фрагмент V2 на верхней части поверхностного тримера Env; 3) фрагмент протеогликана V3 на маннозном участке; 4) мембранно-проксимальная внешняя область (MPER) трансмембранного домена Env; 5) поверхность gp120/gp41 [15].

На данный момент одно из наиболее активно развивающихся направлений по дизайну иммуногенов, связанных с индукцией bNAbs, заключается в разработке тримеров gp120/gp41 [9, 16]. Несмотря на значительный прогресс в этом направлении, возникли определенные проблемы, требующие их решения. Во-первых, несмотря на то, что тримеры относительно стабильны в растворе, они продуцируют конформационные состояния, которые не способны обеспечить связывание и индукцию bNAbs. Во-вторых, тримеры экспонируют нежелательные иммунодоминантные непротективные эпитопы ВИЧ, которые могут отвлекать адаптивный иммунный ответ от распознавания нейтрализующих эпитопов [16, 21].

Альтернативным подходом создания ВИЧ-иммуногенов является конструирование химерных вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLPs), экспонирующих отдельные эпитопы, узнаваемые bNAbs [7]. VLPs получают на основе вирусных структурных белков, обладающих способностью к самосборке [8]. Большинство VLPs имеют диаметр от 20 до 100 нм, т.е. размер, который позволяет свободно проникать в лимфатические сосуды и эффективно поглощаться антигенпрезентирующими клетками [14]. Эпитопы, представленные на поливалентных VLPs, могут перекрестно взаимодействовать с рецепторами В-клеток, что приводит к стимуляции и индукции устойчивого и длительного гуморального иммунного ответа [11, 24]. Данные особенности VLPs имеют важное значение для их использования в качестве носителей чужеродных антигенов [7]. Одним из успешных примеров таких VLPs является коровый антиген вируса гепатита В (HBcAg) [4, 19]. HBcAg образует частицу размером около 36 нм, состоящую из 240 копий HBcAg, собранных в виде 120 гомодимеров. Коровые частицы обеспечивают высокую иммуногенность включенных в их состав чужеродных антигенов [20].

В данной работе для конструирования ВИЧ-иммуногенов на основе HBcAg мы выбрали эпитопы, входящие в состав региона MPER ВИЧ-1 и узнаваемые bNAbs 2F5 и 4E10 [17, 18].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моноклональные антитела, штаммы бактерий, плазмиды, ферменты. Моноклональные антитела (МКА) 2F5 (№ 1475) и 4E10 (№ 10091)

были получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США). Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) был предоставлен отделом «Коллекции микроорганизмов» Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия). Эндонуклеазы рестрикции BamHI, PspLI, FauNDI, Sfr274I и T4 ДНК-лигаза были приобретены в компании «СибЭнзим» (Новосибирск).

Конструирование генов рекомбинантных белков. Оптимизацию кодонового состава гена HBcAg проводили с помощью онлайн-ресурса «GenScript» (https://www.genscript.com/). Олигонуклеотиды, кодирующие эпитопы bNAbs, рассчитывали с использованием программы «SnapGene 3.2.1». Ген, кодирующий оптимизированный белок HBcAg, и олигонуклеотиды были синтезированы компанией «Евроген» (Москва). Ген *HBcAg* был клонирован в составе плазмидного вектора pET21a («Novagen», США) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции FauNDI и Sfr274I.

Структуры целевых плазмид (pET-HBcAg, pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 и pET-HBcAg-4E10CRF63) подтверждали секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск).

Наработка и очистка рекомбинантных белков. Бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков (HBcAg, HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и 4E10CRF63) получали путем трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS соответствующими плазмидами. Биомассу наращивали как описано ранее [2]. Клетки разрушали с использованием ультразвукового гомогенизатора и отделяли растворимые белки от дебриса путем центрифугирования. Очистку проводили с помощью фракционирования растворимых белков на колонке (1,5 × 37 см) с CL-6B-сефарозой. Использовали натрий-фосфатный буфер (PBS), pH 7,6. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза по Леммли в 15%-м полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250.

Электронная микроскопия частиц HBcAg. Для изучения размеров и формы вирусоподобных частиц использовали метод негативного контрастирования. Препараты рекомбинантного HBcAg адсорбировали на сеточках с формваровой подложкой в течение 1–2 мин и окрашивали 2%-м водным раствором уранилацетата. Визуализацию проводили с использованием электронного микроскопа «JEM100C» («Jeol», Япония).

Дот-блот анализ. Дот-блот анализ проводили с использованием системы «SNAP i.d.» («Millipore», США) как описано ранее [2]. На нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», Австрия) наносили очищенные белки HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 (стартовая концентрация 0,1 мг/мл). HBcAg без встройки в той же концентрации использовали как отрицательный контроль. В качестве первичных антител были использованы МКА 2F5 и 4E10, разбавленные в блокирующем буфере (PBS, 1 % бычьего сывороточного альбумина) в соотношении 1 : 10000. Для проявления применяли антитела кролика против IgG человека («Sigma», США), конъюгированные с щелочной фосфатазой и разбавленные в блокирующем буфере в соотношении 1 : 5000. Визуализацию иммунного комплекса проводили добавлением NBT/BCIP-субстратного раствора («Sigma»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что основной иммуннодоминантный район HBcAg находится в области 76–82 аминокислотных остатков (а.о.) (петля *e*1) [20, 23]. В ряде работ показано, что чужеродная последовательность, встроенная во внутреннюю область 75–83 а.о. петли HBcAg, является значительно более антигенной и иммуногенной, чем та же последовательность, расположенная на N- или C-конце белка-носителя [20, 23]. Ранее продемонстрирована возможность сборки химерных частиц HBcAg при внедрении широкого спектра чужеродных эпитопов [20]. Тем не менее существуют данные о том, что ряд эпитопов, встроенных в HBcAg, нарушают сборку коровых частиц и уменьшают уровень экспрессии рекомбинантного гена [1, 10, 12].

Ранее нами получен химерный HBcAg, несущий линейный миметик эпитопа и узнаваемый широконейтрализующим ВИЧ-1 МКА VRC01 [3]. В качестве вектора использована рекомбинантная плазмида pUC/HBcAg, содержащая один уникальный сайт рестрикции в области главной антигенной детерминанты HBcAg. Это создает трудности для клонирования чужеродных ДНК-последовательностей. Также в ходе исследований установлено, что рекомбинантный белок находится в тельцах включения, что затрудняет очистку и требует рефолдинга рекомбинантного HBcAg. Поэтому в начале данной работы в состав гена *HBcAg* мы ввели три уникальных сайта рестрикции BamHI, MabI и PspLI, что позволяет включать пептиды в область петли *e*1 HBcAg путем замены участков, соответствующих 79–83 (BamHI и MabI) или 79–87 (BamHI и PspLI) а.о. кора. Кро-

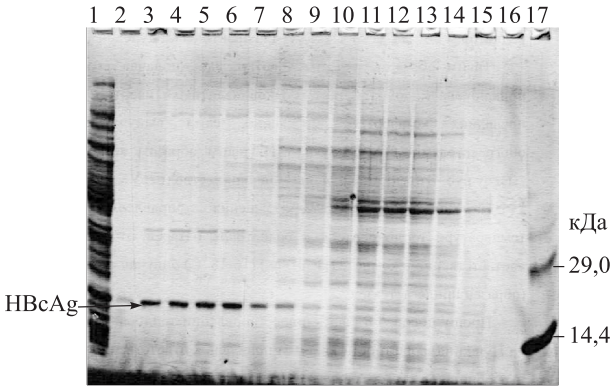

Рис. 1. *SDS-PAGE растворимых белков лизатов клеток E. coli BL21, несущих плазмиду pET-HBcAg: 1 – образец до разделения на колонке; 2–16 – фракции, полученные при гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B; 17 – маркеры молекулярных масс*

Fig. 1. *SDS-PAGE of soluble proteins of lysates of E. coli BL21 cells carrying the pET-HBcAg plasmid: 1 – sample before separation on a column; 2–16 – fractions obtained by gel filtration on a column with sepharose CL-6B; 17 – molecular weight markers*

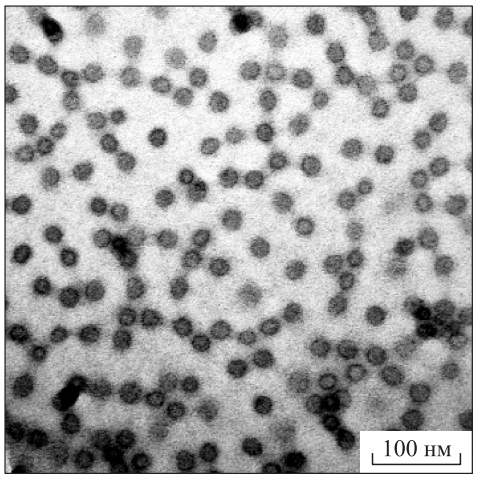

Рис. 2. *Электронная микрофотография очищенного препарата рекомбинантного HBcAg. Негативное контрастирование уранилацетатом, масштаб 100 нм*

Fig. 2. *Electron micrograph of the purified recombinant HBcAg preparation. Negative contrasting with uranyl acetate, scale 100 nm*

ме того, была проведена оптимизация кодонного состава гена *HBcAg* для эффективной экспрессии в системе *E. coli*. Модифицированный ген был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a, рекомбинантную плазмиду назвали pET-HBcAg и трансформировали ею компетентные клетки *E. coli* BL21 для получения штамма-продуцента. Полученную биомассу гомогенизировали, разделяли на растворимую и нерастворимую фракции центрифугированием и исследовали на присутствие рекомбинантных белков с помощью SDS-PAGE; целевой белок обнаруживался в растворимой фракции. Его очищали с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B и показали, что целевой белок выходит в свободном объеме (рис. 1, фракции 2–7). Так как предел исключения сефарозы CL-6B составляет 4×10^6 Да, можно предположить, что исследуемый белок формирует частицы, имеющие высокую молекулярную массу, значительно большую, чем мономер HBcAg.

Для подтверждения того, что очищенный рекомбинантный HBcAg образует вирусоподобные частицы, был проведен анализ объединенных фракций (см. рис. 1, фракции 3–6) с помощью электронной микроскопии. На электронной микрофотографии видно, что полученный рекомбинантный HBcAg формирует VLPs (рис. 2).

Полученный плазмидный вектор pET-HBcAg был использован для клонирования олигонуклеотидных дуплексов, кодирующих эпитопы – 2F5 (NEQELLELDKWASLWN), 4E10 (NWFDITNWLWYIK) и 4E10CRF63 (NWFDISNWLWYIK). Эпитопы 2F5 и 4E10 являются консенсусными последовательностями, они были взяты из базы данных https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html. Эпитоп 4E10CRF63 соответствует 671–683 а.о. env штамма ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF063_02A1, доминирующей на территории Новосибирской области [5, 22]. В результате клонирования получены три рекомбинантные плазмиды (pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 и pET-HBcAg-4E10CRF63), кодирующие химерные варианты HBcAg со встроенными эпитопами в районе главной антигенной детерминанты кора. С помощью SDS-PAGE показано, что в клетках *E. coli*, трансформированных полученными плазмидами, синтезируются белки, по электрофоретической подвижности соответствующие теоретически рассчитанной молекулярной массе (23,4 кДа для HBcAg-2F5, 23,2 кДа для HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63) (рис. 3, *а*).

Для исследования антигенных свойств белков HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 выполнен дот-блот анализ с использованием МКА 4E10 и 2F5, в качестве контроля использовали рекомбинантный HBcAg без вставки. Анализ подтвердил, что МКА 2F5 распознают соответствующий эпитоп в составе HBcAg-2F5 и не взаимодействует с HBcAg-4E10, HBcAg-4E10CRF63 и HBcAg без вставки. МКА 4E10 эф-

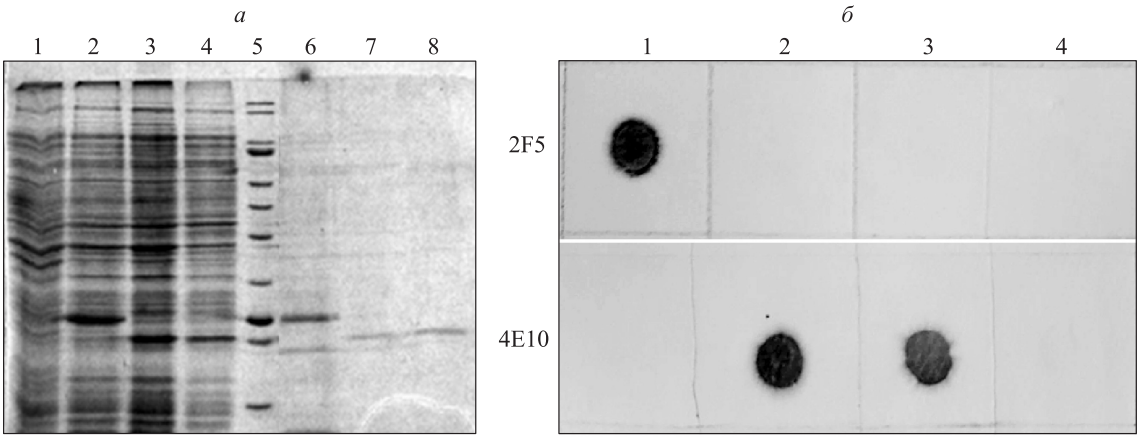

Рис. 3. *а – электрофореграмма лизатов клеток E. coli BL21 (DE3) pLysS: 1 – лизат клеток без плазмиды; 2–4 – клетки E. coli BL21, несущие плазмиды pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 и pET-HBcAg-4E10CRF63 соответственно; 5 – маркер молекулярной массы М31 («СибЭнзим», Россия); 6–8 – очищенные белки HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 соответственно; б – дот-блот анализ взаимодействия МКА 2F5 и 4E10 с рекомбинантными белками в HBcAg-2F5 (1), HBcAg-4E10 (2), HBcAg-4E10CRF63 (3) и HBcAg без встройки (4)*

Fig. 3. *a – electrophoregram of cell lysates of E. coli BL21 (DE3) pLysS: 1 – cell lysate without plasmid; 2–4 E. coli BL21 cells carrying plasmids pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 and pET-HBcAg-4E10CRF63, respectively: 5 – molecular weight marker M31 (“SibEnzyme”, Russia); 6–8 – purified HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 and HBcAg-4E10CRF63 proteins, respectively; b – dot blot analysis of the interaction of MAbs 2F5 and 4E10 with recombinant proteins in HBcAg-2F5 (1), HBcAg-4E10 (2), HBcAg-4E10CRF63 (3) and HBcAg without embedding (4)*

фективно связывается с HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 и не узнает HBcAg-2F5 и исходный HBcAg (рис. 3, *б*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преодолеть необычайное генетическое и, следовательно, экстремальное антигенное разнообразие ВИЧ-1, возможно, позволит создание иммуногена, способного индуцировать синтез антител, которые бы обладали нейтрализующей активностью против множества циркулирующих штаммов вируса.

В данной работе представлены результаты экспериментов по созданию ВИЧ-иммуногенов, несущих эпитопы, узнаваемые bNAbs 2F5 и 4E10, с использованием в качестве белка-носителя HBcAg. Сконструирован плазмидный вектор, содержащий ген HBcAg, в состав которого были введены уникальные сайты рестрикции, что позволяет получать химерные VLPs, несущие чужеродные эпитопы в районе главной антигенной детерминанты кора. На основе данной генетической конструкции получены три рекомбинантные плазмиды, кодирующие химерные варианты HBcAg, включающие эпитопы bNAbs 2F5 и 4E10. С помощью иммуноблотинга установлено, что эпитопы, узнаваемые bNAbs, сохраняют свои антигенные свойства в составе химерных HBcAg. Полученные рекомбинантные белки могут рассматриваться как перспективные ВИЧ-иммуногены и в дальнейшем будут исследованы на способность индуцировать вирус-нейтрализующие антитела у лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпенко Л.И., Иванисенко В.А., Пика И.А., Чикаев Н.А., Ерошкин А.М., Меламед Н.В., Веремейко Т.А., Ильичев А.А. Анализ чужеродных эпитопов, встроенных в HBcAg. Возможные пути решения проблемы самоорганизации химерных коровых частиц. *Молекул. биология*. 2000; 34 (2): 223–229.

Karpenko L.I., Ivanisenko V.A., Pika I.A., Chikaev N.A., Eroshkin A.M., Melamed N.V., Veremeyko T.A., Il’ichev A.A. Analysis of foreign epitope inserts in HBcAg. Approaches to solving the problem of core particle self-assembly. *Mol. Biol*. (Mosc.) 2000; 34 (2): 194–199.

2. Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Щербакова Н.С., Каплина О.Н., Карпенко Л.И. Антигенные свойства искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена. *Сиб. науч. мед. журн*. 2018; 8 (4): 37–43.

Rudometov A.P., Andreeva N.B., Chikaev A.N., Shcherbakova N.S., Kaplina O.N., Karpenko L.I. Antigenic properties of an artificial polyepitopic HIV immunogen. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* =

Siberian Scientific Medical Journal. 2018; 8 (4): 37–43. [In Russian].

3. Рудометов А.П., Чикаев А.Н., Андреева Н.Б., Щербакова Н.С., Лебедев Л.Р., Каплина О.Н., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Химерный белок HBcAg, несущий миметик эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом VRC01. *Вопр. биол., мед. и фармац. химии*. 2018; 21 (4): 46–51.

Rudometov A.P., Chikaev A.N., Andreeva N.B., Shcherbakova N.S., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Il'ichev A.A., Karpenko L.I. Chimeric protein HBcAg carrying the epitope mimetic recognized by the monoclonal antibody VRC01. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2018; 21 (4): 46–51. [In Russian].

4. Arora U., Tyagi P., Swaminathan S., Khannaet N. Chimeric Hepatitis B core antigen virus-like particles displaying the envelope domain III of dengue virus type 2. *J. Nanobiotechnol*. 2012; 10 (30): 1–6.

5. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30 (6): 592–597.

6. Burton D.R., Mascola J.R. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat. Immunol*. 2015; 16 (6): 571–576.

7. Frietze K.M., Peabody D.S., Chackerian B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Curr. Opin. Virol*. 2016; 18: 44–49.

8. Grgacic E.V.L., Anderson D.A. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*. 2006; 40 (1): 60–65.

9. Haynes B.F., Burton D.R. Developing an HIV vaccine. *Science*. 2017; 355 (6330): 1129–1130.

10. Jegerlehner A., Tissot A., Lechner F. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*. 2002; 20 (25–26): 3104–3112.

11. Jennings G.T., Bachmann M.F. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem*. 2008; 389 (5): 521–536.

12. Karpenko L.I., Ivanisenko V.A., Pika I.A. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids*. 2000; 18 (4): 329–337.

13. Korber B., Hraber P., Wagh K., Hahn B.H. Polyvalent vaccine approaches to combat HIV-1 diversity. *Immunol. Rev*. 2017; 275 (1): 230–244.

14. Manolova V., Flace A., Bauer M., Schwarz K., Saudan P., Bachmann M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol*. 2008; 38 (5): 1404–1413.

15. McCoy L.E., Burton D.R. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol. Rev*. 2017; 275 (1): 11–20.

16. Medina-Ramírez M., Garces F., Escolano A., Skog P., de Taeye S.W., Del Moral-Sanchez I., McGuire A.T., Yasmeen A., Behrens A.J., Ozorowski G. Design and crystal structure of a native-like HIV-1 envelope trimer that engages multiple broadly neutralizing antibody precursors *in vivo*. *J. Exp. Med*. 2017; 214 (9): 2573–2590.

17. Montero M., van Houten N.E., Wang X., Scott J.K. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2008; 72: 54–84.

18. Muñoz-Barroso I., Salzwedel K., Hunter E., Blumenthal R. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol*. 1999; 73 (7): 6089–6092.

19. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*. 2001; 44. 98–114.

20. Pumpens P., Grens E. The true story and advantages of the famous Hepatitis B virus core particles: Outlook 2016. *Mol. Biol*. 2016; 50: 489–509.

21. Sahay B., Nguyen C.Q., Yamamoto J.K. Conserved HIV epitopes for an effective HIV vaccine. *J. Clin. Cell. Immunol*. 2017; 8 (4): 1–27.

22. Shcherbakova N.S., Shalamova L.A., Delgado E., Fernández-García A., Vega Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Sokolov Y.V., Shcherbakov D.N., Pérez-Álvarez L., Thomson M.M. Molecular epidemiology, phylogeny, and phylodynamics of CRF63_02A1, a recently originated HIV-1 circulating recombinant form spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30 (9): 912–919.

23. Whitacre D.C., Lee B.O., Milich D.R. Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8 (11): 1565–1573.

24. Zabel F., Kündig T.M., Bachmann M.F. Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated. *Curr. Opin. Virol*. 2013; 3 (3): 357–362.

Сведения об авторах:

Рудометов А.П., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru
Рудометова Н.Б., e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru
Зайцев Б.Н., к.ф.-м.н., e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru
Лебедев Л.Р., д.м.н., e-mail: lebedev_lr@vector.nsc.ru
Ильичев А.А., д.б.н., e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru
Карпенко Л.И., д.б.н., e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

Information about authors:

Rudometov A.P., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru
Rudometova N.B., e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru
Zaytsev B.N., candidate of physical mathematical sciences, e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru
Lebedev L.R., doctor of medical sciences, e-mail: lebedev_lr@vector.nsc.ru
Ilyichev A.A., doctor of biological sciences, e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru
Karpenko L.I., doctor of biological sciences, e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

УДК (616-009.7: 616.5-006.81): 616.092.9 [575.224.22: 577.151.6: 612.115.3]
DOI: 10.15372/SSMJ20190408

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНУ УРОКИНАЗЫ НА РОСТ МЕЛАНОМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Елена Михайловна ФРАНЦИЯНЦ, Ирина Викторовна КАПЛИЕВА, Екатерина Игоревна СУРИКОВА, Ирина Валерьевна НЕСКУБИНА, Валерия Ахтямовна БАНДОВКИНА, Лидия Константиновна ТРЕПИТАКИ, Наталья Сергеевна ЛЕСОВАЯ, Наталья Дмитриевна ЧЕРЯРИНА, Юлия Александровна ПОГОРЕЛОВА, Людмила Анатольевна НЕМАШКАЛОВА

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России 344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8

Цель исследования – изучить особенности роста меланомы B16/F10 у мышей с нокаутом по гену урокиназы (uPA) без хронической нейрогенной боли (ХНБ) и на ее фоне. **Материал и методы.** Исследование проведено на разнополых мышах линии C57BL/6 ($n = 102$) и линии C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu с нокаутом по гену *uPA* ($n = 48$). Мышам основных подгрупп меланому B16/F10 перевивали подкожно через 2 недели после двустороннего лигирования седалищных нервов (модель ХНБ), контролем служили мыши соответствующей линии со стандартной перевивкой меланомы. **Результаты и их обсуждение.** Продолжительность жизни мышей с нокаутом по гену *uPA* на фоне роста меланомы не отличалась от обычной – самки жили в 1,5 раза ($p < 0,05$) дольше самцов, при этом меланома у всех нокаутных мышей появлялась на неделю раньше; динамика роста опухоли имела резко выраженную гендерную зависимость: у самок опухоль фактически не росла и перед гибелью животных ее объем не превышал 1,0 см^3, тогда как у самцов опухоль характеризовались активным ростом с двумя пиками увеличения объема (2 и 4 недели); меланома метастазировала слабо – единичные метастазы в легких (у самок) или не метастазировала, но в легких и сердце отмечались кровоизлияния (у самцов). ХНБ уменьшала продолжительность жизни самок с нокаутом по гену *uPA*, как и в случае с нормальным геномом, но не влияла на продолжительность жизни самцов; первичные опухоли у нокаутных мышей пальпировались на несколько дней позже, чем в контроле, но росли более интенсивно, при этом сглаживались гендерные различия; усиление метастазирования проявлялось в инициации метастатического поражения легких и печени у самцов, при этом кровоизлияния в легких сохранялись, и в увеличении количества метастатических очагов в легких на фоне появления кровоизлияний в них у самок. **Заключение.** Нокаут по гену *uPA* по-разному изменяет течение меланомы B16/F10 у самцов и самок мышей. ХНБ усиливает злокачественный рост опухоли, стирая гендерные различия, и активизирует метастазирование меланомы.

Ключевые слова: нокаут по гену *uPA*, меланома, хроническая нейрогенная боль, половые особенности, мыши.

Конфликт интересов. Авторы отрицают наличие конфликта интересов.

Автор для переписки: Нескубина И.В., e-mail: neskubina.irina@mail.ru

Для цитирования: Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепитаки Л.К., Лесовая Н.С., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39 (4): 62–70. doi: 10.15372/SSMJ20190408.

EFFECT OF UROKINASE GENE-KNOCKOUT ON GROWTH OF MELANOMA IN EXPERIMENT

Elena Mikhaylovna FRANTSIYANTS, Irina Viktorovna KAPLIEVA, Ekaterina Igorevna SURIKOVA, Irina Valerievna NESKUBINA, Valeria Akhtyamovna BANDOVKINA, Lidiya Konstantinovna TREPITAKI, Nataliya Sergeevna LESOVAYA, Nataliya Dmitrievna CHERYARINA, Yuliya Aleksandrovna POGORELOVA, Lyudmila Anatol'evna NEMASHKALOVA

Rostov Research Institute of Oncology of Minzdrav of Russia 344037, Rostov-on-Don, 14th line, 63, bldg. 8

The purpose of the study was to reveal special features of the B16/F10 melanoma growth in urokinase (uPA) gene knockout mice with and without chronic neurogenic pain (CNP). **Material and methods.** The study included male and female C57BL/6 mice (n = 102) and C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu mice with *uPA* gene knockout (n = 48). Mice of the main subgroups underwent subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma 2 weeks after bilateral ligation of sciatic nerves (CNP model); mice of the same strain with standard melanoma transplantation served as controls. **Results and discussion.** Survival of *uPA* gene knockout mice did not differ from that of normal animals – 1.5 times higher in females than in males ($p < 0.05$), with melanoma onset in gene-deficient mice a week earlier. The dynamics of tumor growth had pronounced gender differences: in females, the tumor did not grow and its maximal volume prior to death was 1.0 cm^3, while tumors in males were characterized by an active growth with two peaks of volume increase (weeks 2 and 4). Melanoma was weakly metastatic – solitary metastases to the lungs (in females) or no metastases, but pulmonary and heart hemorrhages were noted (in males). CNP decreased the survival of *uPA* gene knockout females, as well as of normal animals, but did not influence the survival of males; primary tumors in gene-deficient mice appeared a few days later than in controls but their growth was more intense, with diminished gender differences. Increased metastasis was manifested by the initiation of metastatic lesions to the lungs and liver in males, with maintained pulmonary hemorrhages, and by increased number of metastatic foci in the lungs together with the appearance of pulmonary hemorrhages in females. **Conclusions**. The influence of *uPA* gene knockout on the course of B16/F10 melanoma differs in male and female mice. CNP enhances malignant tumor growth, diminishing gender differences, and activates melanoma metastasis.

Key words: *uPA* gene knockout, melanoma, chronic neurogenic pain, gender differences, mice.

Conflict of interests. Authors deny conflict of interest.
Correspondence author: Neskubina I.V., e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Citation: Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Neskubina I.V., Bandovkina V.A., Trepitaki L.K., Lesovaya N.S., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Nemashkalova L.A. Effect of urokinase gene-knockout on growth of melanoma in experiment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 62–70. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190408.

Мышь как модель оказалась полезной для исследования рака в человеческой популяции из-за относительно близких геномных и физиологических характеристик биологии опухолей мышей и людей. У мышей есть достаточно много сходных с людьми анатомических, клеточных и молекулярных признаков злокачественного перерождения [12]. Доля генов мышей, тождественных человеческим, около 80 %, что позволяет использовать этих животных в качестве инструмента изучения основных механизмов канцерогенеза, а также как превосходную экспериментальную модель для исследования ответа организма на разработанное противоопухолевое лечение [16]. Хотя традиционные экспериментальные модели мышей остаются ценным инструментом для изучения молекулярных механизмов неопластического роста, ограничением является низкая степень гетерогенности опухолей у них по сравнению с высокой степенью гетерогенности опухолей у человека. Был достигнут ряд успехов в моделировании рака у мышей, и новые модели теперь в большей степени способны проецировать рак человека с мутациями, которые контролируются в пространстве и/или во времени. Кроме того, эти модели лучше учитывают гетерогенность опухолей и их изменчивость, характерные для пациентов в клинических условиях [19].

Боль – один из самых распространенных симптомов у онкологических больных, а ее тип и интенсивность зависят от местоположения опухоли и стадии болезни [5]. Многофакторность причин возникновения боли у онкологических больных связана с сопутствующими заболеваниями, побочным действием противоопухолевого лечения. Наиболее часто встречающийся тип хронической боли – нейрогенная, возникающая в результате сдавливания нервного ствола растущей опухолью [15]. Ранее на экспериментальных животных нами показано стимулирующее влияние хронической нейрогенной боли (ХНБ) на злокачественный процесс [1].

Исследования последних нескольких десятилетий показали, что ось активатора плазминогена урокиназного типа (uPA–uPAR) обладает плейотропным эффектом на разных стадиях рака. Нарушения уровней компонентов оси uPA–uPAR часто наблюдаются при ряде злокачественных новообразований; в дальнейшем было определено, что она является путем, способствующим росту опухолей и метастазированию, и дало возможность рассматривать ось uPA–uPAR в качестве мишени прогнозирования рака, диагностики и терапевтических вмешательств. Доклинические данные, полученные из ряда исследований, выявили, что нацеливание на эту ось способствует подавлению

злокачественного роста и уменьшению метастазирования [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей роста меланомы B16/F10 у самцов и самок мышей с нокаутом по гену *uPA* без ХНБ и на ее фоне.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 150 мышах. Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и Приказе Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Мыши линии C57BL/6 обоего пола (n = 102) с начальной массой 21–23 г, полученные из филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, составили 1-ю группу. Мыши линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu обоего пола (n = 48) с начальной массой у самок и самцов соответственно 24–26 и 31–33 г были получены из питомника лабораторных животных «Пущино» Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Московская область). Характеристика животных линии C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu: окраска шерсти – черная, метод модификации – целевая мутация (нокаут) с получением белка (uPA), не способного связываться с рецептором активатора плазминогена урокиназного типа. Животные-мутанты могут использоваться в исследованиях хронического воспаления ткани, механизмов фибринолиза, онкогенеза и роста сосудов в тканях. Эти мыши составили 2-ю группу.

Животные каждой группы были разделены на две подгруппы: контроль – со стандартным ростом меланомы B16/F10, перевитой подкожно в правую подлопаточную область, и основные подгруппы, в которых перевивка меланомы B16/F10 осуществлялась на фоне предварительно воспроизведенной модели ХНБ. Количество мышей в контрольных подгруппах линии C57BL/6 составило: самцов n = 25, самок n = 22, линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu: самцов n = 12, самок n = 12. Число мышей основных подгрупп линии C57BL/6 было следующим: самцов n = 27, самок n = 28, линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu: самцов n = 12, самок n = 12.

В работе использовали клеточную линию мышиной меланомы B16/F10, полученную из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всем мышам меланому перевивали подкожно одномоментно по 0,5 мл в разведении 1 : 10 в физиологическом растворе, животным основных подгрупп – через 2 недели после двухстороннего лигирования седалищных нервов [1]. Известно, что при стандартной перевивке опухоль появляется в 100 % случаев и на 12–16 сутки роста метастазирует в легкие, печень и селезенку. Клеточная популяция меланомы B16/F10 гетерогенна, включает как фрагменты с незначительным содержанием меланина, так и выраженные пигментированные участки. Пролиферативный пул опухоли составляет 71,6 %. Модальный класс опухоли насчитывает 40 хромосом. Материал для перевивки меланомы B16/F10 получали от мышей-доноров на 12–16 сутки развития опухолей. Объем опухоли в контрольные сроки наблюдения рассчитывали по формуле: $V = \frac{\pi}{6} \times D1 \times D2 \times D3$, где D1, D2 и D3 – три взаимно-перпендикулярных диаметра опухоли (см), измеренных при помощи штангенциркуля.

Переменные представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$), для оценки различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средняя продолжительность жизни мышей. У контрольных самцов линии C57BL/6 (1-я группа) средняя продолжительность жизни была статистически значимо меньше, чем у самок (в 1,4 раза). Та же тенденция сохранялась и у контрольных мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (2-я группа) – самцы жили в 1,5 раза ($p < 0,05$) меньше самок, причем продолжительность жизни нокаутных животных обоего пола на фоне роста меланомы была такой же, как и у мышей без генетических изменений из соответствующих подгрупп – контрольной или основной (табл. 1, 2).

У мышей линии C57BL/6 (1-я группа) из основной подгруппы, у которых меланома росла на фоне ХНБ, продолжительность жизни уменьшалась: у самцов – в 1,3 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 1), у самок – в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 2). Продолжительность жизни генно-модифицированных животных (2-я группа) при развитии злокаче-

Таблица 1

Влияние ХНБ на рост меланомы B16 у самцов мышей линии C57BL/6 и C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu

Table 1

Effect of chronic neurogenic pain on the growth of B16 melanoma in male C57BL/6 and C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu mice

Показатель	C57BL/6		C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu	
	Меланома	Меланома + ХНБ	Меланома	Меланома + ХНБ
Продолжительность жизни, сут	22,15 ± 1,82	17,24 ± 0,84*	23,33 ± 3,18	23,33 ± 3,18
Дата появления опухоли, сут	9,80 ± 0,82	4,00 ± 0,00*	7,67 ± 2,67	11,67 ± 0,67^{+}
Объем опухоли, см^3				
1-я неделя	Нет	0,06 ± 0,01	0,017 ± 0,008	Нет
2-я неделя	1,27 ± 0,37	1,36 ± 0,27^{1}	2,72 ± 0,78^{1}	1,57 ± 0,71
3-я неделя	5,91 ± 1,48^{2}	3,00 ± 0,58^{1,2}	2,08 ± 0,64$^{+,1}$	5,80 ± 0,81*$^{,+,2}$
4-я неделя	7,94 ± 2,10^{2}	–	6,52 ± 0,40^{1,2,3}	8,26 ± 0,42*^{,2,3}
Некроз	3–4 недели	3 недели	3 недели	2–3 недели
Метастазы	Легкие	Легкие, селезенка	Нет	Легкие, печень
Кровоизлияние в легкие	Нет	Нет	Есть (+ сердце)	Есть (+ инволюция тимуса)

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – мышей аналогичной линии с меланомой без ХНБ; + – мышей линии C57BL/6 на аналогичном сроке наблюдения; 1, 2, 3 – мышей через 1, 2, 3 недели после прививки опухоли.

Таблица 2

Влияние ХНБ на рост меланомы B16 у самок мышей линии C57BL/6 и C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu

Table 2

Effect of chronic neurogenic pain on the growth of B16 melanoma in female C57BL/6 and C57BL/6-Plautm1.1BugThis PlauGFDhu/GFDhu mice

Показатель	C57BL/6		C57BL/6-Plautm1.1BugThisPlauGFDhu/GFDhu	
	Меланома	Меланома + ХНБ	Меланома	Меланома + ХНБ
Продолжительность жизни, сут	30,25 ± 1,67	19,17 ± 1,35*	34,67 ± 0,67	21,33 ± 2,19*
Дата появления опухоли, сут	10,15 ± 0,98	5,29 ± 0,20*	6,67 ± 1,67	11,67 ± 0,67*$^{,+}$
Объем опухоли, см^3				
1-я неделя	Нет	0,70 ± 0,25	0,008 ± 0,008	нет
2-я неделя	0,85 ± 0,12	1,65 ± 0,27*^{,1}	0,33 ± 0,09$^{+,1}$	2,38 ± 0,54*
3-я неделя	2,75 ± 0,73^{2}	2,50^{1} ± 0,49	0,04 ± 0,01*$^{,+,2}$	5,76 ± 0,59*$^{,+}$
4-я неделя	4,69 ± 0,86^{2}	–	1,05± 0,08$^{+,1,2,3}$	9,50 ± 0,98*^{,2,3}
Некроз	3–4 нед.	2–3 нед.	3 нед.	2–3 нед.
Метастазы	Селезенка	Сердце, легкие, печень, матка	Легкие (единичные)	Легкие (множественные)
Кровоизлияние в легкие	Нет	Нет	Нет	Есть

ственного процесса на фоне лигирования седалищных нервов зависела от их гендерной принадлежности: у самок уменьшалась в 1,6 раза ($p < 0,05$), как и у мышей линии C57BL/6 (см. табл. 2), у самцов статистически значимо не отличалась от продолжительности жизни соответствующей контрольной подгруппы мышей (см. табл. 1).

Следовательно, в целом контрольные самки как с интактным геномом, так и имеющие нокаут по гену *uPA* жили дольше контрольных самцов. ХНБ уменьшала продолжительность жизни самцов линии C57BL/6 и всех самок и не влияла на продолжительность жизни самцов мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu.

Время появления первичного опухолевого узла. У контрольных мышей линии C57BL/6 (1-я группа) первичная опухоль пальпировалась на 9–10 сутки от момента перевивки, тогда как у контрольных мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (2-я группа) – на 5–10 сутки; статистически значимой разницы между группами по этому показателю выявлено не было ни у самцов, ни у самок (см. табл. 1, 2). ХНБ способствовала сокращению сроков появления первичных опухолей у мышей с интактным геномом (1-я группа): у самок – в 1,9 раза ($p < 0,05$), у самцов – в 2,5 раза по сравнению с соответствующей контрольной подгруппой животных. У мышей с измененным геномом (2-я группа) время обнаружения опухолей на фоне ХНБ, напротив, в среднем удлинялась на четыре дня по сравнению с соответствующим контролем. Однако если у самок с нокаутом по гену *uPA* опухолей на фоне ХНБ начинали пальпироваться в 1,7 раза позже, чем у самок соответствующей линии без боли ($p < 0,05$), то у самцов с измененным геномом – практически одновременно (см. табл. 1, 2). Несмотря на это, появление меланомы на фоне ХНБ у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu происходило позже, чем у мышей линии C57BL/6: у самцов – в 2,9 раза, у самок – в 2,2 раза (см. табл. 1, 2).

Следовательно, у мышей с измененным геномом первичный узел формировался на одну неделю раньше; под влиянием ХНБ появление первичных опухолей у мышей с нормальным генотипом и мышей, имеющих нокаут по гену *uPA*, изменялось разнонаправленно: в первом случае опухоли обнаруживались раньше, чем в соответствующем контроле, во втором – позже.

Динамика роста первичного опухолевого узла. У контрольных мышей линии C57BL/6 (1-я группа) первичная опухоль начинала пальпироваться лишь со 2-й недели канцерогенеза, при этом ее средний объем практически сразу становился равным 1,0 см^3, тогда как у контрольных мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (2-я группа) первичная опухоль хорошо прощупывалась уже на первой неделе злокачественного роста, но при этом ее размер был не больше размера горошины (см. табл. 1, 2). Наши результаты согласуются с данными ряда авторов [2, 7], свидетельствующими о том, что нокаут по урокиназе приводит к замедлению как роста первичной опухоли, так и процесса метастазирования.

На фоне ХНБ у животных линии C57BL/6 (1-я группа) меланома появлялась на неделю раньше контроля, при этом у самцов ее первоначальные размеры были гораздо меньше (в 11,7 раза), чем у самок, и не достигали объема 1,0 см^3 (см. табл. 1, 2). У нокаутных мышей (2-я группа), меланома на фоне ХНБ, напротив, начинала определяться на неделю позже, чем у контрольной подгруппы, а ее размер был более 1,0 см^3 (см. табл. 1, 2).

В целом, если сравнивать размеры первичных опухолей у всех мышей на 2-й неделе канцерогенеза – сроке, когда опухолевый узел определялся уже у всех животных, то у самцов как без ХНБ, так и на ее фоне не было статистически значимой разницы между обычными животными и мышами с генетическим нокаутом по uPA, при этом средний объем опухолей составлял около 1,5 см^3 (см. табл. 1). Что касается самок как с нормальным, так и измененным геномом, то у мышей без боли размер опухолей был меньше, чем у мышей с развитием злокачественного процесса на фоне ХНБ: у самок линии C57BL/6 – в 1,9 раза ($p < 0,05$), у самок линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu – в 7,2 раза, при этом объем опухолей у контрольных самок без боли с нокаутом по гену *uPA* не превышал 0,5 см^3 и был в 2,6 раза меньше, чем у контрольных самок без боли с нормальным генотипом; самки из основных подгрупп (с ХНБ) по размеру опухолей, который в среднем превышал 1,5 см^3, статистически значимо не отличались друг от друга (см. табл. 2).

В дальнейшем у животных 1-й группы опухоль увеличивалась в объеме вплоть до их гибели: без боли – до четвертой недели злокачественного роста, на фоне ХНБ – до 3-й недели (см. табл. 1, 2). У контрольных генно-модифицированных самцов (2-я группа) без боли опухоль резко увеличивалась в объеме (в 160,0 раз) на 2-й неделе, не изменялась на 3-й неделе и давала повторный скачок роста в 3,1 раза на 4-й неделе канцерогенеза, накануне их гибели (см. табл. 1). У контрольных самок без боли из 2-й группы подкожная опухоль практически не росла и к 4-й неделе канцерогенеза не превышала объем 1,0 см^3

(см. табл. 2). Динамика роста опухолей у мышей с измененным геномом из основной подгруппы, вне зависимости от пола, была одинаковой – такой же, как и в контрольной подгруппе у мышей линии C57BL/6 – увеличение объема со 2-й по 4-ю неделю канцерогенеза. В результате у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu с ХНБ (2-я группа) размеры первичных опухолей были статистически значимо больше, чем у соответствующего контроля: у самцов на 3-й неделе канцерогенеза – в 2,8 раза, на 4-й неделе – в 1,3 раза ($p < 0,05$), у самок на 3-й неделе канцерогенеза – в 144,0 раза, на 4-й неделе – в 8,8 раза (см. табл. 1, 2).

Следовательно, динамика роста первичного опухолевого узла у мышей линии C57BL/6, за исключением незначительных нюансов, была практически одинаковой как у самцов, так и у самок, при этом мыши с ХНБ на 3-й неделе канцерогенеза имели такой же размер опухолей, как и животные без боли, однако последние оставались живыми на одну неделю больше и погибали при размере опухолевого узла более 5,0 см^3. У мышей с нокаутом по гену *uPA* динамика роста меланомы зависела от половой принадлежности: у самок опухоли практически не росли, а их размер был минимальным, тогда как у самцов опухоли характеризовались достаточно активным ростом, а их размер на 4-й неделе канцерогенеза не отличался от значений нормальных мышей. ХНБ стирала гендерные особенности у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu, усиливая рост опухолей у всех мышей вне зависимости от их пола, при этом размеры опухолей на 4-й неделе канцерогенеза становились более 7,5 см^3 как у самцов, так и у самок (см. табл. 1, 2).

Наличие кровоизлияний в органах и особенности метастазирования. У мышей линии C57BL/6 кровоизлияний не было, тогда как у мышей линии C57BL/6-PlautmI.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu они регистрировались: у контрольных самцов – в легких и сердце, у самцов с ХНБ кровоизлияния в легких сочетались с инволюцией тимуса, у самок с ХНБ отмечались только кровоизлияния в легких; исключение – контрольные самки, у которых кровоизлияния во внутренних органах отсутствовали (см. табл. 1, 2).

У мышей с нормальным геномом (1-я группа) локусы метастазирования зависели от гендерной принадлежности: у самцов без боли метастазы определялись в легких, у самок без боли – в селезенке (см. табл. 1, 2). ХНБ способствовала распространению метастатического поражения в другие органы: у самцов – в селезенку, у самок – в сердце, легкие, печень и матку. У мышей с генетическим нокаутом (2-я группа) единичные метастазы в легких отмечались только у самок, у самцов меланома не метастазировала (см. табл. 1, 2). ХНБ, как и в группе нормальных мышей, стимулировала метастазирование, при этом у самцов меланома начинала давать метастатические отсевы в легкие и печень, у самок увеличивалось количество метастатических очагов в легких (см. табл. 1, 2).

Следовательно, у мышей с нокаутом по гену *uPA* меланома метастазировала слабо (единичные метастатические очаги в легких, не сочетающиеся с кровоизлияниями, у самок) или не метастазировала вовсе (у самцов, но при этом в их легких и сердце развивались кровоизлияния); ХНБ, как и в группе нормальных мышей, стимулировала метастазирование, инициируя метастатическое поражение легких и печени у самцов на фоне сохранения кровоизлияний в легких, и увеличивая количество метастатических очагов в легких на фоне появления кровоизлияний в них у самок.

Известно, что uPA находится на поверхности опухолевых клеток и сверхэкспрессируется на конечной стадии трансформации злокачественных клеток, которая ответственна за инвазию и метастазирование [20]. Кроме того, uPA участвует в повреждении базальной мембраны и деградации интерстициального белка во время канцерогенеза и отвечает за прогрессирование заболевания [10]. Следовательно, ингибирование uPA может быть использовано при лечении злокачественного процесса для торможения или регрессии опухоли и предотвращения метастазирования. Ингибирование протеолиза в опухолевой ткани способствует ослаблению инвазии опухоли, ангиогенезу и миграции, которые являются основными свойствами злокачественных опухолей, что заслуживает дальнейшего развития [4].

Исторически одним из первых идентифицированных специфических ингибиторов uPA был амилорид, который ограничивает рост опухоли и ангиогенез, что доказано в опытах *in vitro* и модели *in vivo* [9]. Среди множества новых ингибиторов, разработанных рядом исследователей [3, 11], только небольшое количество было переведено в клиническую практику. Одним из них является WX-UK1, также известный как этил-4-[(2S)-3-[3-[(Z)-N′-гидроксикарбамимидоил]фенил]-2-[[2,4,6-три(пропан-2-ил)фенил]сульфониламино]пропаноил]пиперазин-1-карбоксилат, или месупрон, который является одним из наиболее эффективных ингибиторов uPA и в настоящее время находится в I фазе клинических испытаний в случае рака поджелудочной железы и рака молочной железы, с возможностью применения при раке яичников и раке толстой кишки [18, 21]. Кроме того, проведена оценка эффективности и безопас-

ности упамостата, данный ингибитор uPA и его метаболит WX-UK1 показали свою антиметастатическую и противоопухолевую активность на модели аденокарциномы поджелудочной железы крысы CA20948. Аддитивный эффект комбинированной терапии упамостата с гемцитабином наблюдался и на модели опухоли молочной железы BN472 [8].

Другая возможность ингибирования uPA заключается в использовании антител. Так, показано, что опухолевые клетки способны проникать в хорион-аллантоисную мембрану цыпленка и метастазировать из нее в эмбрион, данная способность снижается для клеток карциномы человека, экспрессирующих большое количество uPA во время лечения антителами, направленными на активный сайт uPA, по сравнению с необработанными клетками [20].

И, наконец, генное моделирование. Генно-инженерные мыши успешно используются на протяжении десятилетий при моделировании опухолевого процесса у человека [6]. Использование лабораторных животных способствует созданию соответствующей платформы для проспективных исследований при изучении конкретных гипотез и причинных ассоциаций при заболеваниях человека. Более того, постоянный прогресс в генной инженерии позволяет более точно осуществлять пространственно-временной контроль экспрессии генов, улучшая способность повторять события в канцерогенезе и прогрессировании заболевания [13, 17]. Существуют определенные типы моделей, использующиеся в исследованиях злокачественного процесса, включающие трансгенных мышей, у которых онкогены могут быть конститутивно или условно экспрессированы. В таких моделях гены-супрессоры опухолей могут быть подавлены с использованием традиционных методов, таких как ретровирусная инфекция, микроинъекция ДНК-конструкций и так называемый «направленный на гены» трансгенный подход. На сегодняшний день трансгенные модели стали традиционными и успешно применяются в исследованиях канцерогенеза [12].

В данном исследовании с использованием линейных мышей и нокаутированных по гену *uPA* продемонстрировано протекание двух патологических процессов в сравнительном аспекте и в зависимости от половой принадлежности животных. Мы получили подтверждение влияния нокаута гена *uPA* на опухолевый процесс, а именно подавление роста опухоли и развития метастазов, и постарались обозначить наиболее интересные патофизиологические характеристики злокачественных процессов, протекающих самостоятельно и на фоне хронической нейрогенной боли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитие меланомы у мышей с нокаутом по гену *uPA* отличалось от аналогичного злокачественного процесса у мышей с нормальным геномом более ранним появлением первичных опухолевых узлов у всех мышей и ярко выраженными половыми особенностями: у самцов – «скачкообразной» динамикой роста первичных опухолей с двумя пиками увеличения объема – на второй и четвертой неделях, кровоизлияниями в легких и сердце, отсутствием метастазирования; у самок – отсутствием выраженной динамики роста первичных опухолей (максимум – на четвертой неделе, не более 1,0 см^3), единичными метастазами в легких, отсутствием кровоизлияний во внутренних органах. У мышей с измененным геномом нейрогенная боль, как и у обычных мышей, стимулировала рост первичного опухолевого узла и метастазирование, но, в отличие от них, увеличивала срок появления первичных опухолей, уменьшала продолжительность жизни исключительно у самок, при этом большее количество самцов, по сравнению с нормальными, жили дольше трех недель.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Рос. журн. боли*. 2017; 53 (2): 14–20.

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Rozenko L Ya., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain. *Rossiyskiy zhurnal boli = Russian Journal of Pain*. 2017; 53 (2): 14–20. [In Russian].

2. Almholt K., Lund L.R., Rygaard J., Nielsen B.S., Danø K., Rømer J., Johnsen M. Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice. *Int. J. Cancer*. 2005; 113 (4): 525–532. doi 10.1002/ijc.20631.

3. Bruncko M., McClellan W.J., Wendt M.D., Sauer D.R., Geyer A., Dalton C.R., Kaminski M.A., Weitzberg M., Gong J., Dellaria J.F., Mantei R., Zhao X., Nienaber V.L., Stewart K., Klinghofer V., Bouska J., Rockway T.W., Giranda V.L. Naphthamidine urokinase plasminogen activator inhibitors with improved pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2005; 15: 93–98. doi 10.1016/j.bmcl.2004.10.026.

4. Cathcart J., Pulkoski-Gross A., Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life

to old ideas. *Genes Dis*. 2015; 2: 26–34. doi 10.1016/j.gendis.2014.12.002.

5. Fernández-Lao C., Cantarero-Villanueva I., Fernández-de-las-Peñas C., Del-Moral-Ávila R., Menjón-Beltrán S., Arroyo-Morales M. Widespread mechanical pain hypersensitivity as a sign of central sensitization after breast cancer surgery: comparison between mastectomy and lumpectomy. *Pain Med*. 2011; 12 (1): 72–78. doi 10.1111/j.1526-4637.2010.01027.

6. Frese K.K., Tuveson D.A. Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer*. 2007; 7 (9): 645–58. doi 10.1038/nrc2192.

7. Gutierrez L.S., Schulman A., Brito-Robinson T., Noria F., Ploplis V.A., Castellino F.J. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res*. 2000; 60 (20): 5839–5847.

8. Heinemann V., Ebert M.P., Laubender R.P., Bevan P., Mala C., Boeck S. Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*. 2013; 108 (4): 766–770. doi 10.1038/bjc.2013.62.

9. *Jankun J., Keck R.W., Selman S.H*. Epigallocatechin-3-gallate prevents tumor cell implantation/growth in an experimental rat bladder tumor model. *Int. J. Oncol*. 2014; 44: 147–152. doi 10.3892/ijo.2013.2174.

10. *Jankun J., Selman S.H., Aniola J., Skrzypczak-Jankun E*. Nutraceutical inhibitors of urokinase: Potential applications in prostate cancer prevention and treatment. *Oncol. Rep*. 2006; 16: 341–346.

11. Katz B.A., Sprengeler P.A., Luong C., Verner E., Elrod K., Kirtley M., Janc J., Spencer J.R., Breitenbucher J.G., Hui H., McGee D., Allen D., Martelli A., Mackman R.L. Engineering inhibitors highly selective for the S1 sites of Ser190 trypsin-like serine protease drug targets. *Chem. Biol*. 2001; 8: 1107–1121. doi 10.1016/S1074-5521(01)00084-9.

12. Lampreht Tratar U., Horvat S., Cemaza M. Transgenic mouse models in cancer research. *Front. Oncol*. 2018; 8: 268. doi 10.3389/fonc.2018.00268.

13. Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet*. 2001; 2 (10): 743–755.

14. Mahmood N., Mihalcioiu C., Rabbani S.A. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): Diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front. Oncol*. 2018; 8: 24. doi 10.3389/fonc.2018.00024.

15. Malfliet A., Leysen L., Pas R., Kuppens K., Nijs J., van Wilgen P., Huysmans E., Goudman L., Ickmans K. Modern pain neuroscience in clinical practice: applied to post-cancer, paediatric and sports-related pain. *Braz. J. Phys. Ther*. 2017; 21 (4): 225–232. doi 10.1016/j.bjpt.2017.05.009.

16. Ogilvie L.A., Kovachev A., Wierling C., Lange B.M., Lehrach H. Models of models: a translational route for cancer treatment and drug development. *Front. Oncol*. 2017; 7: 219. doi: 10.3389/fonc.2017.00219.

17. Pérez-Guijarro E., Day C.P., Merlino G., Zaidi M.R. Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer*. 2017; 123 (S11): 2089–2103. doi 10.1002/cncr.30684.

18. Schmitt M., Harbeck N., Brünner N., Jänicke F., Meisner C., Mühlenweg B., Jansen H., Dorn J., Nitz U., Kantelhardt E.J., Thomssen C. Cancer therapy trials employing level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Exp. Rev. Mol. Diagn*. 2011; 11: 617–634. doi 10.1586/erm.11.47.

19. Walrath J.C., Hawes J.J., van Dyke T., Reilly K.M. Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv. Cancer Res*. 2010; 106: 113–164. doi 10.1016/S0065-230X(10)06004-5.

20. Wyganowska-Świątkowska M., Tarnowski M., Murtagh D., Skrzypczak-Jankun E., Jankun J. Proteolysis is the most fundamental property of malignancy and its inhibition may be used therapeutically (Review). *Int. J. Mol. Med*. 2018; 43 (1): 15–25. doi 10.3892/ijmm.2018.3983.

21. Zengel P., Ramp D., Mack B., Zahler S., Berghaus A., Muehlenweg B., Gires O., Schmitz S. Multimodal therapy for synergic inhibition of tumour cell invasion and tumour-induced angiogenesis. *BMC Cancer*. 2010; 10: 92. doi 10.1186/1471-2407-10-92.

Сведения об авторах:

Франциянц Е.М., д.б.н., проф., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Каплиева И.В., к.м.н., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru
Сурикова Е.И., к.б.н., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru
Нескубина И.В., к.б.н., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7395-3086, e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Бандовкина В.А., к.б.н., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Трепитаки Л.К., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-9749-2747, e-mail: legolab69@yandex.ru
Лесовая Н.С., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-5686-8659, e-mail: n.chugunova@bk.ru
Черярина Н.Д., ORCID ID: http://orcid.org0000-0002-3711-8155, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Погорелова Ю.А., к.б.н., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Немашкалова Л.А., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2713-8598, e-mail: tilde09@rambler.ru

Information about authors:

Frantsiyants E.M., doctor of biological sciences, professor, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Kaplieva I.V., candidate of medical sciences, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru
Surikova E.I., candidate of biological sciences, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru
Neskubina I.V., candidate of biological sciences, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7395-3086, e-mail: neskubina.irina@mail.ru
Bandovkina V.A., candidate of biological sciences, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Trepitaki L.K., ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-9749-2747, e-mail: legolab69@yandex.ru
Lesovaya N.S., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-5686-8659, e-mail: n.chugunova@bk.ru
Cheryarina N.D., ORCID ID: http://orcid.org0000-0002-3711-8155, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Pogorelova Yu.A., candidate of biological sciences, ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Nemashkalova L.A., ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2713-8598, e-mail: tilde09@rambler.ru

УДК 611.778.018:612.67 DOI: 10.15372/SSMJ20190409

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ЛАМИНОВ В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ХРОНОЛОГИЧЕСКОМ СТАРЕНИИ

Наталья Николаевна ГОЛУБЦОВА, Алексей Владимирович БОГДАНОВ, Андрей Германович ГУНИН

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова
428015, г. Чебоксары, Московский просп., 45

Цель исследования – изучить гендерные особенности содержания иммунопозитивных по ламинам А, В1 и В2 фибробластов в образцах кожи человека при хронологическом старении. **Материал и методы.** Изучен 331 образец кожи плодов обоего пола от 20 до 40 недель беременности и лиц мужского и женского пола от рождения до 85 лет. Иммуногистохимическим методом исследовано содержание положительно окрашенных дермальных фибробластов и экспрессия ламинов А, В1 и В2 в их ядрах. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что постепенное (начиная от пренатального периода и до глубокой старости) снижение содержания у мужчин и женщин фибробластов, позитивных по ламину А, и его экспрессии зависит от возраста, но не имеет различий, связанных с полом. Содержание позитивных по ламину В1 фибробластов, также как экспрессия ламина В1, достоверно уменьшается сразу после рождения и продолжает оставаться сниженным до 40 лет, а затем повышается. Указанные изменения не имеют достоверных отличий по гендерному признаку. Изменение количества положительно окрашенных на ламин В2 фибробластов и экспрессии ламина В2 не имеет статистически достоверной связи с возрастом и полом. Таким образом, гендерных различий в динамических возрастных изменениях содержания и экспрессии белков-ламинов в фибробластах кожи при хронологическом старении не установлено.

Ключевые слова: ламин А, ламин В1, ламин В2, фибробласты, кожа, гендерные особенности, хронологическое старение.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 18-44-210001.
Автор для переписки: Голубцова Н.Н., e-mail: golubnata@list.ru
Для цитирования: Голубцова Н.Н., Богданов А.В., Гунин А.Г. Гендерные особенности содержания ламинов в фибробластах кожи человека при хронологическом старении. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 71–77. doi: 10.15372/SSMJ20190409.

GENDER FEATURES OF LAMINA CONTENT IN HUMAN SKIN FIBROBLASTS IN A PROCESS OF CHRONOLOGICAL AGING

Natalya Nikolaevna GOLUBTSOVA, Aleksey Vladimirovich BOGDANOV, Andrey Germanovich GUNIN

Chuvash State University n.a. I.N. Ul'yanov
428015, Cheboksary, Moskovsky av., 45

The purpose of the study was to investigate gender peculiarities of the content of fibroblasts immunopositive to lamins A, B1 and B2 in skin samples in a process of chronological aging. **Material and methods.** 331 skin samples at the period from 20 to 40 weeks of gestation and people from birth to 85 years were examined. The content of positively stained dermal fibroblasts and the expression level of lamins A, B1 and B2 in their nucleus was explored by immunohistochemistry. **Results and discussion.** The gradual decrease of fibroblasts with positive staining for lamin A and the expression level of lamin A after antenatal period and up to old age depends on the age, but does not have differences, which are related to gender. The lamin B1 positively fibroblasts content is declining reliably from birth to 40 years and then it is increasing as well as the expression level of lamina B1. The indicated changes don't have reliable variances in gender. The change in the number of lamina B2-positively colored fibroblasts and the expression level of lamina B2 has no statistically valid correlation with gender and age. Thus, there are no gender differences in dynamical age related changes of the content and the expression level of protein-lamina in skin fibroblasts in a process of chronological aging.

Key words: lamin A, lamin B1, lamin B2, fibroblasts, skin, gender features, chronological aging.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.
Acknowledgments. This work was supported by the russian science foundation, grant № 18-44-210001.
Correspondence author: Golubtsova N.N., e-mail: golubnata@list.ru
Citation: Golubtsova N.N., Bogdanov A.V., Gunin A.G. Gender features of lamina content in human skin fibroblasts in a process of chronological aging.: *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 71–77. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190409.

В эукариотических клетках ядерный геном ограничен и защищен ядерной оболочкой, которая представляет собой двухмембранную систему, разделенную перинуклеарным пространством и пронизанную ядерными порами. К внутренней ядерной мембране прилежит сеть из промежуточных филаментов (ядерная ламина) [5], в состав которой входят белки трех типов – ламины А, В и С. Исследования последних лет показали, что ламины типа А и В играют важную роль в регуляции репликации ДНК, экспрессии генов и трехмерной организации генома. Ламины В1 и В2 входят в состав периферической ядерной пластинки, где они взаимодействуют с так называемыми ламина-ассоциированными доменами хроматина (LADs) [15]. Ламины А и С (или ламин А/С) локализуются как на периферии ядра, так и внутри него, и также способны взаимодействовать с хроматином [3].

К настоящему времени установлены взаимосвязи между ламинами и процессами, приводящими к возрастным изменениям организма, в том числе обсуждается их возможное участие в механизмах регуляции пролиферативного потенциала фибробластов, который снижается с возрастом [11]. Значительная разница между эмбриональной и взрослой кожей существует и в отношении содержания компонентов внеклеточного матрикса [1]. Например, экспрессия инволюкрина, дермального Ki-67, фибронектина и хондроитинсульфата выше в коже плода, чем у взрослых. В пренатальный период в дерме отсутствует эластин [6]. С возрастом количество белков внеклеточного матрикса уменьшается под действием металлопротеиназ [7]. Синтетическая функция фибробластов в процессе старения меняется в зависимости от пола. Так, уменьшение продукции гиалуроновой кислоты и гепаринсульфата характерно и для мужчин, и для женщин, а снижение синтеза хондроитинсульфата – только для женского организма [14]. Вместе с тем взаимосвязь между содержанием белков ядерной ламины в фибробластах дермы и ее морфофункциональной перестройкой в связи с возрастом и половым диморфизмом остается неизученной. Цель данного исследования заключалась в определении количества ламин-позитивных фибробластов и экспрессии ламинов А, В1 и В2 в фибробластах дермы человека при хронологическом старении у мужчин и женщин.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали аутопсийный материал кожи из нижней части передней поверхности шеи плодов человека и людей, умерших от различных причин внутриутробно (начиная с 20 недели беременности) или после рождения (в возрасте до 85 лет). В области забора кусочков кожи для исследования не было повреждений и патологических изменений. Исследование одобрено Этическим комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (протокол № 3/4 от 31.01.14). Кусочки кожи фиксировали в 4%-м параформальдегиде и заливали в парафин, затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм.

Ламины А, В1 и В2 выявляли иммуногистохимическим методом. Все препараты проводили по этапам иммуногистохимической реакции одномоментно. Для обнаружения ламина А, В1 и В2 в качестве первых антител использовали поликлональные кроличьи антитела соответственно против ламина А («Gene Tex Inc.», США) в разведении 1 : 20, против ламина В1 (титр 1 : 400, NBP1–42594, «Novus Biologicals Inc.», США) в разведении 1 : 400 и против ламина В2 (NBP2–19325, «Novus Biologicals Inc.», США) в разведении 1 : 400. Для разведения использовали 0,05 М трис-буфер с pH 7,4 с добавлением 0,15 М натрия хлорида [9]. В качестве вторых антител применяли визуализирующую систему «EnVision», конъюгированную с пероксидазой (K 4002, «Dako Cytomation», Дания). Пероксидазу выявляли с использованием 3,3-диаминобензидина. Продукт реакции окрашивался в коричневый цвет. В качестве контроля специфичности окрашивания применяли такую же процедуру обработки срезов, где вместо первых антител использовали нормальную кроличью сыворотку в конечной концентрации 1 %.

В срезах определяли интенсивность окрашивания фибробластов дермы на ламины А, В1 и В2. Для этого препараты фотографировали при уве-

личении 400 с помощью микроскопа «Olympus CX-21» и цифровой камеры «Olympus Camedia 4040z» («Olympus Corporation», Япония). В каждом случае было сфотографировано как минимум 3–5 случайно выбранных полей зрения. Далее фотографии анализировали в программе «Sigma Scan Pro demo 5.0» («Systat Software Inc.», США). Интенсивность окраски на ламины определяли с использованием круглого программного зонда диаметром 19 пикселей по формуле $D = \lg(F_0/F)$, где F и F_0 – оптическая плотность положительно окрашенных структур и фона препарата соответственно. Для определения числа фибробластов с положительной окраской препараты кожи фотографировали при увеличении 400 (не менее трех случайно выбранных полей зрения), с помощью программы «Sigma Scan pro demo 5.0» определяли площадь анализируемого участка препарата, подсчитывали в нем окрашенные на ламины A, B1 и B2 ядра фибробластов и общее число фибробластов. В результате вычисляли долю фибробластов с положительной окраской на ламины A, B1 и B2 и общее число фибробластов на 1 мм^2 ткани.

Результаты группировали по возрастному принципу: группа 1 – 20–40 недель беременности, группа 2 – 0–20 лет, группа 3 – 21–40 лет, группа 4 – 41– 60 лет, группа 5 – 61–85 лет. Для исследования ламина A, B1 и B2 использовали соответственно 112 фрагментов кожи (от 64 мужчин и 48 женщин), 106 (от 62 мужчин и 44 женщин) и 113 (от 57 мужчин и 56 женщин). По каждой группе данных рассчитывали средние арифметические величины (*M*) и их стандартные ошибки (*m*). Достоверность влияния возраста и пола на исследуемые параметры кожи оценивали с помощью дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фибробласты с положительной окраской на ламины A, B1 и B2 выявлены в препаратах кожи плодов и людей мужского и женского пола всех изученных возрастных групп (рис. 1, *а*; 2, *а*; *3*, а). Количество иммунопозитивных клеток и интенсивность окрашивания фибробластов на ламины A, B1 и B2 изменялись в зависимости от возраста (рис. 1, *б*, *в*; 2, *б*, *в*; 3, *б*, *в*). Так, в образцах кожи плодов мужского пола на сроке 20–40 недель беременности содержание иммунопозитивных по ламину A фибробластов составляло 86,3 ± 3,5 %, что на 8 % меньше, чем в образцах кожи женского пола (см. рис. 1, *б*). В следующей возрастной группе, включающей фрагменты кожи людей от рождения до 20 лет, у мужчин мы наблюдали незначительное повышение содержания фибробластов, позитивных по ламину A, а у женщин их количество уменьшалось по сравнению с антенатальным периодом на 7 % (см. рис. 1, *б*). У мужчин 21–40 лет количество содержащих ламин A фибробластов уменьшилось по отношению к предыдущему возрасту на 6 %, а у женщин, напротив, незначительно повысилось. У мужчин 41–60 лет этот параметр не изменился, однако в образцах кожи, полученных у женщин, содержание позитивных по ламину A фибробластов уменьшилось на 10 %. В период от 61 до 85 лет содержание ламин A-позитивных фибробластов у мужчин уменьшилось на 14 %, а у женщин не изменилось (рис. 1, *б*). Дисперсионный анализ определил достоверное ($p < 0{,}001$) влияние возраста, но не выявил статистически значимого влияния пола на количество фибробластов, положительно окрашенных на ламин A. Таким образом, несмотря на противоположный характер изменений у мужчин и женщин в каждый из исследованных возрастов, содержание позитивных по ламину A фибробластов в коже лиц обоих полов к 85 годам уменьшается по сравнению с плодным периодом одинаково: на 16 % у мужчин и на 15 % у женщин.

Содержание иммунопозитивных по ламину B1 фибробластов в группе 1 в образцах кожи лиц мужского и женского пола составляло 57,1 ± 2,8 и 67,5 ± 3,2 % соответственно (см. рис. 2, *б*). В следующий период, с рождения и до 40 лет, мы наблюдали уменьшение содержания позитивных по ламину B1 фибробластов на 33 % как у мужчин, так и женщин. После 41 года оно стало больше в образцах кожи лиц обоих полов: у мужчин увеличилось на 29 % по сравнению с группой 3, а у женщин – на 27 %. В группе 5 содержание положительно окрашенных на ламин B1 фибробластов продолжало возрастать: на 7 % у мужчин и на 3 % у женщин по сравнению с группой 4 (см. рис. 2, *б*). Дисперсионный анализ установил достоверное ($p < 0{,}001$) влияние возраста, но не пола на количество позитивных по ламину B1 фибробластов в дерме человека. Итак, содержание ламин B1-положительных фибробластов в дерме человека достоверно уменьшается начиная от рождения и до 40 лет, а затем повышается. Данная закономерность не имеет гендерных различий.

Количество иммунопозитивных к ламину B2 фибробластов в 20–40 недель беременности в образцах кожи лиц мужского и женского пола составляло 78,5 ± 3,5 и 82,8 ± 3,1 % соответственно (см. рис. 3, *б*). Сразу после рождения (0–20 лет) оно снизилось на 5 % у мужчин и на 7 % у женщин. В 3-й и 4-й возрастных группах в образцах кожи как мужчин, так и женщин количество ламин B2-позитивных фибробластов не изменилось по сравнению с группой 2. Только в возрасте 61–85 лет содержание таких клеток у лиц обоего

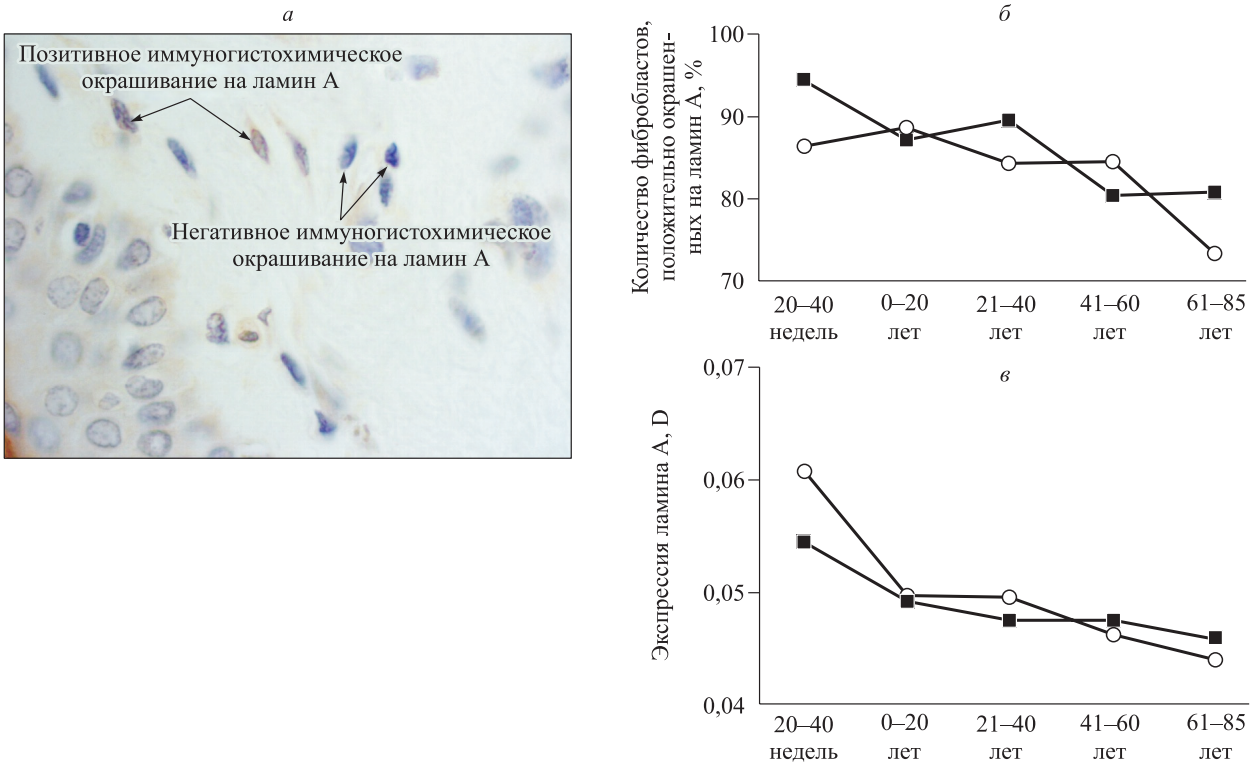

Рис. 1. *Результаты иммуногистохимического исследования кожи человека на ламин А: а – иммунопозитивные и иммунонегативные на ламин А фибробласты в дерме, увеличение 1000; б – динамика количества фибробластов с положительной окраской на ламин А в коже мужчин и женщин разного возраста; в – изменение экспрессии ламина А в ядрах фибробластов у мужчин и женщин разного возраста*

Fig. 1. *The results of immunohistochemical studies of human skin on lamin A: a – immunopositive and immunonegative for lamin A fibroblasts in the dermis, magnification 1000; b – dynamics of the number of lamin A-positive fibroblasts in the skin of men and women of different ages; c – changes in the expression of lamin A in fibroblast nuclei in men and women of different ages*

пола уменьшилось на 7 % по отношению к предыдущему возрастному периоду (см. рис. 3, *б*). Дисперсионный анализ не выявил наличие достоверного влияния ($p < 0{,}001$) возраста и пола на изменение содержания позитивных по ламину B2 фибробластов.

Измерение интенсивности окрашивания ядер ламин-содержащих фибробластов показало следующее. В дерме плодов на сроке 20–40 недель беременности интенсивность окрашивания фибробластов на ламин А была достаточно высокой (см. рис. 1, *а*): у плодов мужского и женского пола показатель D составил 0,061 ± 0,005 и 0,054 ± 0,006 соответственно (см. рис. 1, *в*). В группе 2, объединяющей образцы кожи людей от рождения до 20 лет, степень окрашивания фибробластов дермы на ламин А уменьшилась на 20 % у мужчин и на 9 % у женщин, в дальнейшем величина показателя не изменялась (см. рис. 1, *в*).

В 20–40 недель беременности интенсивность окрашивания фибробластов на ламин B1 была равна 0,059 ± 0,005 и 0,066 ± 0,005 у плодов мужского и женского пола соответственно (см. рис. 2, *в*), во 2-й и 3-й группах произошло уменьшение величины показателя на 25–28 % у мужчин и на 22–34 % у женщин. Начиная с 41 года до 85 лет интенсивность окрашивания ядер на ламин B1 у мужчин и женщин увеличилась по сравнению с группой 1 на 42 и 37 % соответственно (см. рис. 2, *в*). Дисперсионный анализ выявил наличие достоверного влияния ($p < 0{,}001$) возраста на изменение интенсивности окраски фибробластов дермы человека на ламин А и B1, но не установил статистически значимого влияния пола.

Интенсивность окрашивания ядер фибробластов на ламин B2 во всех возрастных группах у женщин была выше, чем у мужчин, в среднем на 5 %, при этом практически не изменяясь с возрастом. По результатам дисперсионного анализа не установлено достоверное влияние ($p < 0{,}001$) возраста и пола на изменение интенсивности окраски фибробластов дермы человека на ламин B2.

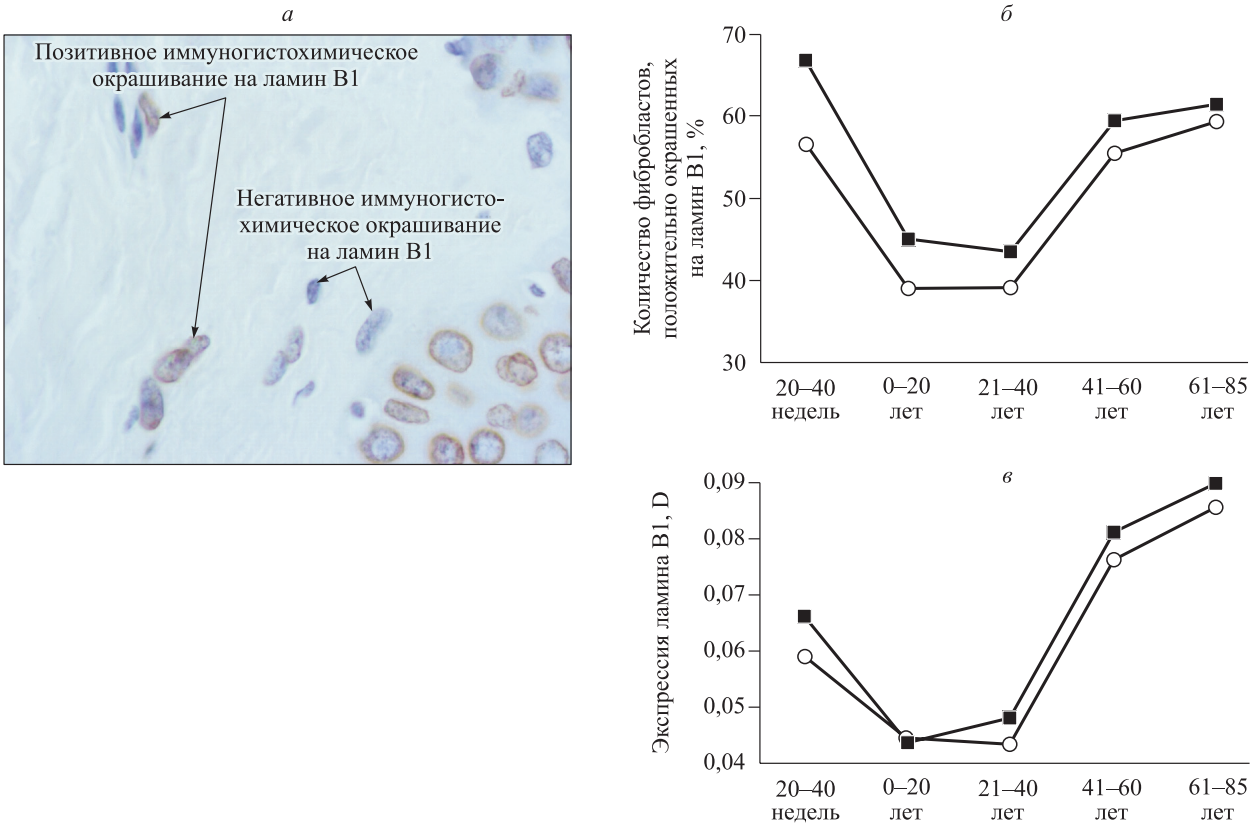

Рис. 2. *Результаты иммуногистохимического исследования кожи человека на ламин B1: а – иммунопозитивные и иммунонегативные на ламин B1 фибробласты в дерме, увеличение 1000; б – динамика количества фибробластов с положительной окраской на ламин B1 в коже мужчин и женщин разного возраста; в – изменение экспрессии ламина B1 в ядрах фибробластов у мужчин и женщин разного возраста*

Fig. 2. *The results of an immunohistochemical study of human skin on lamin B1: a – lamin B1-immunopositive and immunonegative fibroblasts in the dermis, magnification 1000; b – the dynamics of the number of lamin B1-positive fibroblasts in the skin of men and women of different ages; c – changes in the expression of lamin B1 in the nuclei of fibroblasts in men and women of different ages*

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования демонстрируют, что вариативность изученных параметров (содержание ламинов в ядрах фибробластов и количество ламин-позитивных фибробластов) у мужчин и женщин статистически значимо не различается. Изменение во взаимодействии ламинов и генома будет влиять на организацию генома на периферии ядра и внутри ядра независимо от пола [5, 8].

Вместе с тем мы установили, что содержание ламин-позитивных фибробластов и экспрессия ламинов A, B1 и B2 зависят от возраста. В антенатальный период преобладают клетки, позитивные по ламину А, доля которых достигает 90 %, их содержание одинаково у плодов мужского и женского пола. Известно, что ламин А синтезируется в виде преламина А, имеющего фарнезилированный участок на С-конце [8], который, вероятно, не определяется при данном способе детекции. В постнатальный период содержание положительно окрашенных по ламину А фибробластов снижается к 85 годам только на 14 %, что позволяет заключить, что и после рождения ламин А выполняет важную роль в реализации структуры и функции ядра [3]. Известно, что при мутации гена ламина А развивается преждевременное необратимое старение (прогерия) с выраженными изменениями кожи, которая приобретает признаки раннего старения в виде множественных морщин, сухости, уменьшения толщины [10, 13].

Ламины группы В (B1 и B2) кодируются отдельными генами [2, 12] и, по имеющимся данным, экспрессируются в большинстве клеток эмбрионов и взрослых животных [12]. Это дает основание считать, что они необходимы для выживания клеток. Согласно нашим данным, ламины B1 и B2 находятся в большинстве фибробластов плодов мужского и женского пола. После

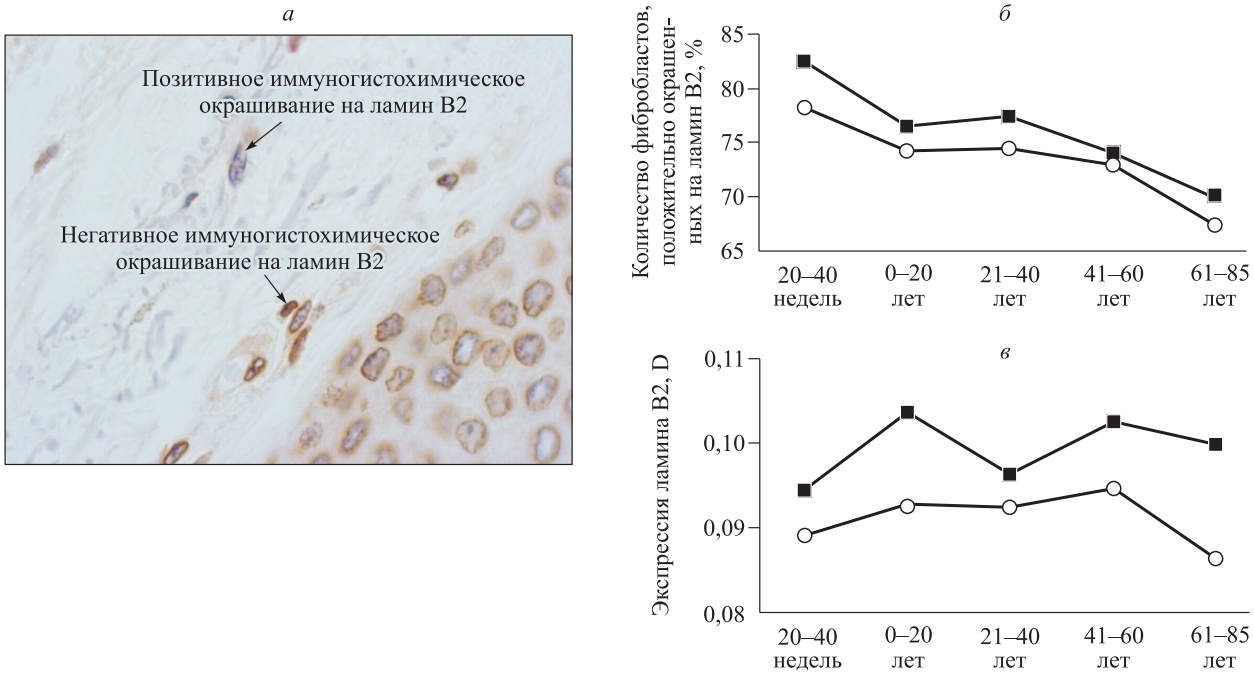

Рис. 3. *Результаты иммуногистохимического исследования кожи человека на ламин B2: а – иммунопозитивные и иммунонегативные на ламин B2 фибробласты в дерме, увеличение 1000; б – динамика количества фибробластов с положительной окраской на ламин B2 в коже мужчин и женщин разного возраста; в – изменение экспрессии ламина B2 в ядрах фибробластов у мужчин и женщин разного возраста*

Fig. 3. *The results of an immunohistochemical study of human skin on lamin B2: a – lamin B2-immunopositive and immunonegative fibroblasts in the dermis, magnification 1000; b – the dynamics of the number of lamin B2-positive fibroblasts in the skin of men and women of different ages; c – changes in the expression of lamin B2 in the nuclei of fibroblasts in men and women of different ages*

рождения динамика их содержания существенно различается. Так, количество позитивно окрашенных на ламин B1 фибробластов и экспрессия ламина B1 уменьшаются сразу после рождения и сохраняются на сниженном уровне до 40 лет независимо от пола. По всей видимости, падение содержания ламина B1 в фибробластах в данный возрастной период является одним из факторов, приводящих к характерному для этого возраста уменьшению числа клеток в дерме [9]. В отличие от ламина B1, содержание ламина B2 в фибробластах кожи достоверно не изменяется от 20 недель беременности до 85 лет как у мужчин, так и у женщин. Существует мнение, что к старению клетки приводит сочетанное уменьшение экспрессии ламинов B1 и A [13].

Таким образом, получены свидетельства участия ламинов в развитии возрастных изменений в организме независимо от пола.

ВЫВОДЫ

1. Содержание позитивных по ламину A фибробластов в образцах кожи человека и экспрессия ламина A в ядрах фибробластов не имеют гендерных отличий и планомерно уменьшаются начиная с антенатального периода и до 85 лет как у мужчин, так и у женщин.

2. Количество позитивных по ламину B1 фибробластов и экспрессия ламина B1 в ядрах фибробластов не имеют различий, связанных с половой принадлежностью. В образцах кожи лиц обоих полов эти параметры достоверно уменьшаются сразу после рождения, оставаясь низкими вплоть до 40 лет, с 41 до 85 лет их величины возрастают.

3. Содержание позитивно окрашенных по ламину B2 фибробластов и экспрессия ламина B2 в их ядрах не имеет достоверных различий, связанных с возрастом и половым диморфизмом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева О.В., Голубцова Н.Н., Филиппов Ф.Н., Гунин А.Г. Фактор роста соединительной ткани (CTGF) в дерме человека в онтогенезе. *Онтогенез*. 2016; 47 (2): 75–82.

Vasilieva O.V., Golubtsova N.N., Filippov F.N., Gunin A.G. Connective tissue growth factor (CTGF) in the human dermis through ontogenesis. *Ontogenez = Ontogenesis*. 2016; 47 (2): 75–82. [In Russian]

2. Barton L.J., Soshnev A.A., Geyer P.K. Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2015; 34: 1–8.

3. Briand N., Cahyani I., Madsen-Østerbye J., Paulsen J., Rønningen T., Sørensen A.L., Collas P. Lamin A, chromatin and FPLD2: Not just a peripheral ménage-à-trois. Front. *Cell Dev. Biol*. 2018; 6: ID 73.

4. Briand N., Collas P. Laminopathy-causing lamin A mutations reconfigure lamina-associated domains and local spatial chromatin conformation. *Nucleus*. 2018; 9 (1): 216–226.

5. Burke B., Stewart C.L. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2013; 14: 13–24.

6. Coolen N.A., Schouten K.C., Middelkoop E. Comparison between human fetal and adult skin. *Arch. Dermatol. Res*. 2010; 302 (1): 47–55.

7. Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci*. 2010; 123 (24): 4195–4200.

8. Gesson K., Vidak S., Foisner R. Lamina-associated polypeptide (LAP)2α and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol*. 2014; 29: 116–124.

9. Golubtsova N.N. Kornilova N.K., Gunin A.G. Age-related changes in serin-arginin protein kinase 1 (SRPK1) content in the human dermis. *Adv. Gerontol*. 2018; 8 (2): 147–152.

10. Gruenbaum Y., Medalia O. Lamins: the structure and protein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2015; 32: 7–12.

11. Gunin A.G., Petrov V.V., Golubtsova N.N., Vasilieva O.V., Kornilova N.K. Age-related changes in angiogenesis in human dermis. *Exp. Gerontol*. 2014; 55: 143–151.

12. Hutchison C.J. B-type lamins in health and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol*. 2014; 29 (100): 158–163.

13. Lund E., Collas P. Nuclear lamins: making contacts with promoters. *Nucleus*. 2013; 4 (6): 424–430.

14. Oh J.H., Kim Y.K., Jung J.Y., Shin J.E., Chung J.H. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin *in vivo*. *Exp. Dermatol*. 2011; 20 (5): 454–456.

15. Van Steensel B., Belmont A.S. Lamina-associated domains: Links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell*. 2017; 169: 780–791.

Сведения об авторах:

Голубцова Н.Н., к.б.н., e-mail: golubnata@list.ru
Богданов А.В., e-mail: alexeivld@mail.ru
Гунин А.Г., д.м.н., e-mail: drgunin@mail.ru

Information about authors:

Golubtsova N.N., candidate of biological sciences, e-mail: golubnata@list.ru
Bogdanov A.V., e-mail: alexeivld@mail.ru
Gunin A.G., doctor of medical sciences, e-mail: drgunin@mail.ru

УДК 612.015.11-07:615.254-092.4:612.398.192 DOI: 10.15372/SSMJ20190410

АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПОЧКАХ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ В МОЧЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ОКСАЛАТНОГО НЕФРОЛИТИАЗА ТЕТРАПЕПТИДОМ Leu-Ile-Lys-Met

Александр Юрьевич ЖАРИКОВ, Николай Николаевич ЯКУШЕВ, Ганна Викторовна ЖАРИКОВА, Олеся Николаевна МАЗКО, Олеся Геннадьевна МАКАРОВА, Валерий Михайлович БРЮХАНОВ, Юрий Владимирович КОРЕНОВСКИЙ, Ольга Васильевна АЗАРОВА

Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России
6560038, г. Барнаул, просп. Ленина, 40

Цель исследования – изучить влияние тетрапептида Leu-Ile-Lys-Met на активность процессов свободнорадикального окисления (СРО) и экспрессию циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) и ЦОГ-2 в почках крыс при экспериментальном оксалатном нефролитиазе. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на 30 самцах крыс сток Вистар, разделенных на три группы: группа сравнения (10 интактных крыс), контрольная группа (6 недель моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза, $n = 10$), подопытная группа (6 недель моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза + пероральное введение тетрапептида Leu-Ile-Lys-Met в дозе 12 мг/кг в период с 3-й по 6-ю недели, $n = 10$). Оксалатный нефролитиаз имитировали с использованием общепринятой этиленгликолевой модели. Концентрацию ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в моче крыс на исходном уровне и после 6 недель моделирования нефролитиаза измеряли методом иммуноферментного анализа с использованием набора для определения простагландин-эндопероксид-синтаз 1 и 2 (PTGS 1, 2) фирмы «Cloud-Clone Corp.». В гомогенате почек крыс определяли показатели активности процессов СРО по общепринятым методикам. **Результаты и их обсуждение.** На фоне применения тетрапептида Leu-Ile-Lys-Met ослаблялось свободнорадикальное повреждение почек, что проявилось в полном отсутствии морфологических признаков развития нефролитиаза, снижении концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, и общей прооксидантной активности по сравнению с контрольной группой; активность глутатионпероксидазы, напротив, увеличилась (в 1,5 раза).

Ключевые слова: мочекаменная болезнь, тетрапептид, окислительный стресс.

Автор для переписки: Жариков А.Ю., e-mail: zharikov_a_y@mail.ru

Для цитирования: Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Жарикова Г.В., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Брюханов В.М., Кореновский Ю.В., Азарова О.В. Активность процессов свободнорадикального окисления в почках и содержание циклооксигеназ в моче крыс в условиях экспериментальной терапии оксалатного нефролитиаза тетрапептидом Leu-Ile-Lys-Met. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 78–84. doi: 10.15372/SSMJ20190410.

ACTIVITY OF FREE RADICAL OXIDATION AND CYCLOOXYGENASE EXPRESSION IN RATS KIDNEYS UNDER EXPERIMENTAL THERAPY OF OXALATE NEPHROLITHIASIS WITH TETRAPEPTIDE Leu-Ile-Lys-Met

Aleksandr Yuryevich ZHARIKOV, Nikolay Nikolaevich YAKUSHEV, Ganna Viktorovna ZHARIKOVA, Olesya Nikolaevna MAZKO, Olesya Gennadyevna MAKAROVA, Valeriy Mikhaylovich BRYUKHANOV, Yuriy Vladimirovich KORENOVSKIY, Olga Vasil'yevna AZAROVA

Altai State Medical University of Minzdrav of Russia
6560038, Barnaul, Lenin av., 40

The aim of the study was to investigate the effect of Leu-Ile-Lys-Met tetrapeptide on the activity of free radical oxidation (FRO) and the level of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 expression in rat kidney with experimental oxalate nephrolithiasis. **Material and methods.** The experiments were carried out on 30 male rats Wistar runoff, divided into 3 groups: the comparison group (10 intact rats), the control group (6 weeks of experimental oxalate nephrolithiasis

simulation, *n* = 10), the experimental group (6 weeks of experimental simulation oxalate nephrolithiasis + oral administration of Leu-Ile-Lys-Met tetrapeptide at a dose of 12 mg/kg from the 3rd to the 6th week, n = 10). The oxalate nephrolithiasis was simulated according to conventional ethylene glycol model. COX-1 and COX-2 concentration in rat urine at baseline and after 6 weeks of experimental nephrolithiasis was determined by enzyme immunoassay using the prostaglandin-endoperoxide synthase 1 and 2 (PTGS 1, 2) kit from «Cloud-Clone Corp.». In rat kidney homogenate, the activity indicators of FRO processes were determined by common methods. **Results and discussion.** At the background of the Leu-Ile-Lys-Met tetrapeptide, free radical kidney damage was weakened, which was manifested in the complete absence of morphological signs of nephrolithiasis, decrease of thiobarbituric acid-reactive product concentration and overall prooxidant activity as compared to the control group; glutathione peroxidase activity, on the contrary, increased by 1.5 times.

Key words: urolithiasis, tetrapeptide, oxidative stress.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Zharikov A.Yu., e-mail: lemen@centercem.ru

Citation: Zharikov A.Yu., Yakushev N.N., Zharikova G.V., Mazko O.N., Makarova O.G., Bryukhanov V.M., Korenovskiy Yu.V., Azarova O.V. Activity of free radical oxidation and cyclooxygenase expression in rats kidneys under experimental therapy of oxalate nephrolithiasis with tetrapeptide Leu-Ile-Lys-Met. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 78–84. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190410.

Разработка новых антилитогенных средств на основе так называемого протеомного подхода является современным и перспективным направлением поиска новых фармакологических подходов к лечению мочекаменной болезни [1]. Ранее в экспериментальных условиях нами продемонстрирована высокая антилитогенная активность нового трипептида Leu-Ile-Lys [5]. Это создало предпосылки для драг-дизайна на основе этой молекулы новых пептидов с потенциальной антилитогенной активностью. Одной из аминокислот, чья роль в развитии нефролитиаза давно и активно обсуждается, является метионин. В частности, существуют экспериментальные данные о том, что введение метионина крысам с нефролитиазом на фоне индуцированного дефицита витамина B_6 нивелирует окислительный стресс и подавляет камнеобразование [13]. Кроме того, хорошо известны антиоксидантные свойства метионина в организме [9]. При этом важная роль окислительного стресса и воспалительного повреждения нефроцитов в развитии нефролитиаза давно доказана и не вызывает сомнений [11].

Вышесказанное определило цель настоящего исследования – разработать тетрапептид Leu-Ile-Lys-Met и изучить его влияние на активность процессов свободнорадикального окисления (СРО) и экспрессию циклооксигеназы (ЦОГ) 1 и 2 типа в почках крыс при экспериментальном оксалатном нефролитиазе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 30 самцах крыс сток Вистар, выращенных в отделении генетики животных и человека ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), возрастом 2–3 мес. и весом 200–250 г. Исследования на животных проводили согласно Правилам надлежащей лабораторной практики (GLP), утвержденным Приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н, и требованиям Директивы 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010.

Крысы были разделены на три группы, по 10 животных в каждой: 1) группа сравнения – интактные крысы, у которых определялись показатели активности СРО в почках в норме; 2) контрольная группа – 6 недель моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза; 3) подопытная группа – 6 недель моделирования экспериментального оксалатного нефролитиаза + ежедневное пероральное введение тетрапептида Leu-Ile-Lys-Met в дозе 12 мг/кг в период с 3-й по 6-ю недели. На всем протяжении эксперимента животные находились в индивидуальных метаболических клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях свободного доступа к питью и пище при естественном световом режиме. Оксалатный нефролитиаз имитировали с использованием общепринятой этиленгликолевой модели, суть которой заключается в том, что на протяжении 6 недель крысам предоставляется в качестве питья в свободном доступе 1%-й раствор этиленгликоля [3]. Пептид Leu-Ile-Lys-Met был синтезирован на предприятии Shanghai Apeptide Co., Ltd. (г. Шанхай, Китай) при посредничестве ЗАО «Эвалар» (г. Бийск, Россия). Чистота образца составила не менее 98 %.

У крыс контрольной и подопытной групп собирали суточную мочу до начала моделирования нефролитиаза и на 42-й день эксперимента. В моче

определяли концентрацию ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Cloud-Clone Corp.» (США) по инструкции производителя. По истечении 6 недель эксперимента крыс всех трех групп подвергали эвтаназии под эфирным наркозом, извлекали обе почки, одну из которых использовали для определения активности процессов СРО в почечной ткани, а другую – для проведения морфологических исследований.

В гомогенате почек крыс определяли показатели активности процессов СРО [2]. Для оценки прооксидантного статуса измеряли концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБРП), колориметрическим методом. Суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободнорадикальных метаболитов – общую прооксидантную активность (ОПА) – оценивали по интенсивности окраски флуоресцентного комплекса, образующегося при взаимодействии продуктов окисления ТВИН-80 с тиобарбитуровой кислотой. Для оценки антиоксидантного статуса клеток определяли общую антиоксидантную активность (ОАА) и активность антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы (ГПО), каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). ОАА, интегральный показатель активности всех ферментных и неферментных факторов нейтрализации свободных радикалов, оценивали по степени угнетения Fe^{2+}/аскорбатзависимого окисления ТВИН-80 гомогенатом почки. Активность каталазы определяли по подавлению окисления молибдата натрия перекисью водорода, активность СОД – по содержанию в пробе нитроформазана, окрашенного продукта восстановления нитротетразолия супероксидантными радикалами, активность ГПО – по содержанию восстановленного глутатиона в цветной реакции с реактивом Эллмана.

Для проведения морфологических исследований почки фиксировали в 10%-м растворе формалина, обрабатывали по стандартной методике и изготавливали поперечный срез толщиной 6 мкм через почечный сосочек. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, метенамин-серебром. Кальциевые депозиты идентифицировали гистохимическим методом Косса, при помощи компьютерной программы на снимках подсчитывали количество кальциевых депозитов в поле зрения и определяли их размер. Морфометрические исследования проводили с использованием программных пакетов ImageJ 1.43 и AxioVision 3.1.

Нормальность распределения проверяли с использованием W-критерия Шапиро – Уилка. Результаты биохимических исследований представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (25 %; 75 %)), результаты морфометрических исследований – в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Для выявления статистической значимости межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Разница считалась достоверной при значении $p \leq 0,05$ [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В почках крыс контрольной группы наблюдались характерные признаки развития окислительного стресса (табл. 1). Так, в сравнении с показателями интактных крыс в 1,2 раза увеличивалась концентрация ТБРП, в 3,5 раза снижалась ОАА и в 1,4 раза возрастала активность СОД. Не исключено, что активация СОД при нефролитиазе может носить компенсаторный характер в ответ на гиперпродукцию супероксидного анион-радикала. При этом в подопытной группе, где крысам 3 недели вводился пептид Leu-Ile-Lys-Met, наблюдалась совершенно иная картина. Оказалось, что концентрация ТБРП относительно контроля снижалась в 1,3 раза и не отличалась от уровня интактных крыс. ОПА снизилась в 9 раз относительно контрольной группы и была меньше показателей интактных крыс в 10,9 раза. ОАА в сравнении с контролем возросла в 3,8 раза и не отличалась от уровня интактных животных. Активность СОД и каталазы снижалась относительно показателей контрольной группы в 2,4 и 1,5 раза соответственно. Данное изменение тоже логично вписывается в общую картину уменьшения выраженности окислительного стресса на фоне применения пептида Leu-Ile-Lys-Met. Как известно, функция СОД тесно связана с работой каталазы, поскольку образующаяся в процессе дисмутации супероксида перекись водорода впоследствии инактивируется каталазой. Вероятно, в наших экспериментах, когда активность СОД снижалась вследствие подавления окислительного стресса, уменьшалась и стационарная концентрация субстрата каталазы. Активность ГПО, напротив, увеличилась в 1,5 раза относительно контроля.

На этом фоне концентрация ЦОГ-1 в моче крыс контрольной группы за 6 недель эксперимента возросла в 4,4 раза (табл. 2), содержание ЦОГ-2 достоверно увеличилась с нулевого уровня до 0,051 нг/мл. В подопытной группе концентрация ЦОГ-1 в целом не изменялась в сравнении с исходным уровнем, в результате чего к концу эксперимента уступала величине показателя крыс контрольной группы в 1,9 раза, а содержание ЦОГ-2 увеличилась в 46 раз.

Таблица 1

Показатели активности процессов СРО в почках крыс экспериментальных групп

Table 1

Indicators of free radical oxidation activity in the kidneys of rats of experimental groups

Показатель	Группа сравнения	Контрольная группа	Подопытная группа
Концентрация ТБРП, мкмоль/мг	6,1 (5,4; 6,9)	7,6 (7,2; 7,6) $p_{инт}$ = 0,004	5,8 (4,5; 9,7) $p_{к}$ = 0,016
ОПА, %	65,1 (63,4; 68,0)	54,0 (49,9; 56,8) $p_{инт}$ = 0,0002	6,0 (1,0; 8,2) $p_{инт}$ = 0,0002 $p_{к}$ = 0,0002
ОАА, %	41,7 (40,2; 43,3)	12,0 (10,4; 13,2) $p_{инт}$ = 0,0002	46,0 (42,0; 47,1) $p_{к}$ = 0,0002
Активность ГПО, %	38,5 (25,2; 41,6)	42,2 (32,2; 47,9)	62,2 (61,0; 68,4) $p_{инт}$ = 0,000003 $p_{к}$ = 0,00004
Активность каталазы, %	14,4 (10,2; 15,6)	12,2 (9,0; 15,8)	8,2 (3,2; 11,8) $p_{инт}$ = 0,028
Активность СОД, %	18,2 (13,0; 18,5)	25,1 (23,6; 32,1) $p_{инт}$ = 0,0002	10,4 (8,7; 16,1) $p_{инт}$ = 0,017 $p_{к}$ = 0,0002

Примечание. $p_{инт}$ – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя группы сравнения; $p_{к}$ – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя контрольной группы.

Таблица 2

Концентрация ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в моче крыс экспериментальных групп, нг/мл

Table 2

Concentration of COX-1 and COX-2 in the urea of rats of experimental groups, ng/ml

Группа	Исходный уровень		6 недель нефролитиаза	
	ЦОГ-1	ЦОГ-2	ЦОГ-1	ЦОГ-2
Контрольная	0,98 (0,91; 1,85)	0,000 (0,000; 0,002)	4,32 (3,00; 4,87) $p_{исх}$ = 0,008	0,051 (0,049; 0,065) $p_{исх}$ = 0,05
Подопытная	1,51 (0,97; 2,70)	0,001 (0,000; 0,065)	2,27 (1,51; 2,63) $p_{к}$ = 0,006	0,046 (0,024; 0,071)

Примечание. $p_{исх}$ – уровень статистической значимости отличия от исходной величины соответствующего показателя; $p_{к}$ – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя контрольной группы.

Морфологическое исследование почек крыс контрольной группы показало, что при окраске гематоксилином и эозином на участках нефролитиаза эпителий канальцев находился в состоянии гиалиново-капельной дистрофии. Апикальный край клеток местами был разрушен, щеточная кайма видна не везде. Канальцы при этом выглядели кистозно-растянутыми. Клетки нефротелия, выстилающего канальцы, были разрушены либо уплощены или атрофичны. Вокруг канальцев определялась слабо или умеренно выраженная воспалительная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Отмечались явления нефросклероза. Сосуды находились в состоянии выраженного полнокровия. При гистохимическом окрашивании на кальций по методу Косса в канальцах почек крыс контрольной группы отмечали распложенные поодиночке или группами кристаллы депозитов камней коричневато-черного цвета различной формы и размера (рис. 1). Число депозитов в просветах канальцев варьировало от 6 до 19 и в среднем составляло 7,9 ± 1,6 в поле зрения при увеличении ×400, при модальном значении 6. Компьютерная морфометрия показала, что площадь депозитов камней составляет от 48,8 до 789,9 мкм^2, в среднем 298,8 ± 34,2 мкм^2. На этом фоне морфологическое исследование почек крыс подопытной группы свидетельствовало об отсут-

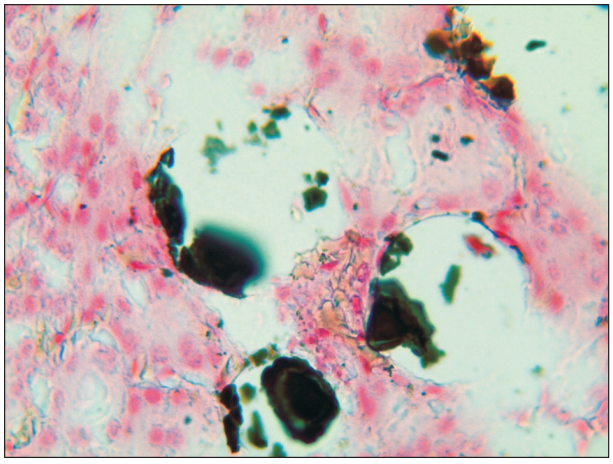

Рис. 1. *Депозиты кальция в множестве канальцев почек животных контрольной группы. Окраска по фон Косса. Увеличение × 1000*

Fig. 1. *Calcium deposits in a variety of kidney tubules of animals in the control group. Von Kossa staining, 1000× magnification*

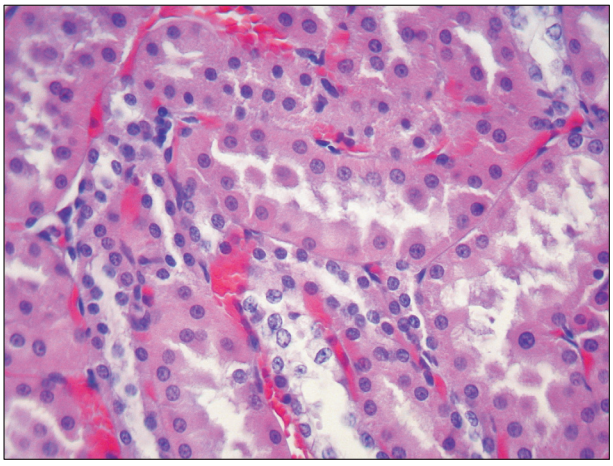

Рис. 2. *Отсутствие признаков камнеобразования в почках крыс подопытной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 400.*

Fig. 2. *The absence of stone formation signs in the kidneys of rats of the experimental group. Hematoxylin and eosin staining, 400× magnification*

ствии явлений нефролитиаза (рис. 2). Ткани почки находились в состоянии нормы, ни инкрустации канальцев солями кальция, ни формирования крупных конкрементов не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая полученные результаты, отметим, что в условиях моделирования нефролитиаза в почечной ткани крыс ожидаемо произошло развитие окислительного стресса, важная патогенетическая роль которого в развитии литогенеза сегодня общепризнанна [4]. На этом фоне у крыс контрольной группы в моче после 6 недель моделирования нефролитиаза по сравнению с исходным уровнем значительно повысилась концентрация ЦОГ-1. Это было несколько неожиданно, поскольку хорошо известно, что ЦОГ-1 – конститутивная, а не индуцибельная изоформа. В данной ситуации можно предположить, что такое увеличение могло быть следствием массивного разрушения нефроцитов и выхода ЦОГ-1 в свободном виде в мочу на фоне развивающегося нефролитиаза. Кроме того, в контроле заболевания наблюдалось значительное увеличение концентрации в моче ЦОГ-2, что хорошо согласуется с общепринятыми представлениями о роли индуцибельной ЦОГ-2 в воспалительных процессах. Логично предположить, что зафиксированное изменение указывает на развитие воспалительных процессов в почках при экспериментальном нефролитиазе.

Сегодня существуют сведения о том, что свободнорадикальное окисление и воспалительные процессы, в частности, регулирующиеся посредством циклооксигеназного пути, тесно сопряжены, в том числе при оксалатном нефролитиазе [7, 10, 12]. По всей видимости, в наших экспериментах при моделировании патологии происходила одновременно активация процессов СРО и воспаления. Это хорошо согласуется с общепринятой сегодня теорией литогенеза, гласящей, что камни в почках формируются из первичного очага литогенеза, в появлении которого ключевую роль играет повреждение нефроцитов [4]. Подтверждением формирования почечных конкрементов стали результаты морфологических исследований, показавших наличие крупных уролитов.

На этом фоне трехнедельное применение тетрапептида Leu-Ile-Lys-Met привело к значительному ослаблению свободнорадикального повреждения почек. Вероятно, этому способствовало наличие в структуре пептида концевой аминокислоты метионина, являющегося мощным антиоксидантном [9]. Примечательно, что у крыс, получавших лечение, концентрация ЦОГ-1 в моче не изменилась относительно исходного уровня и была статистически значимо меньше, чем в контроле. Это может свидетельствовать о сохранности целостности клеточных структур нефроцитов, что препятствовало выходу в мочу данного фермента. Любопытно также, что концентрация ЦОГ-2 в моче крыс подопытной группы увеличивалась, как и у животных контрольной группы, возможно, указывая на то, что повреждение клеток было значительно ослаблено, но воспалительные процессы продолжали развиваться.

Как бы то ни было, на фоне применения разработанного пептида наблюдалось полное отсутствие морфологических признаков развития нефролитиаза. Конкременты в почках не формировались. В совокупности, исходя из вышесказанного, можно полагать, что данный пептид подавляет свободнорадикальное повреждение почечных тканей, что нивелирует камнеобразование, не влияя при этом на воспалительные процессы в почках. Следует также отметить, что существует прецедент разработки антиоксидантного пептида на основе метионина; синтетический гексапептид His-Met-His-Met-His-Met существенно повышал устойчивость клеток к действию ионизирующей радиации [8]. Однако возможность коррекции нефролитиаза метионинсодержащим пептидом в настоящем исследовании показана впервые.

Таким образом, результаты исследования создают весомые предпосылки для дальнейшего изучения антилитогенного действия тетрапептида Leu-Ile-Lys-Met с целью разработки на его основе нового лекарственного средства для лечения мочекаменной болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брюханов В.М., Жарикова Г.В. Современые представления о методах лечения мочекаменной болезни. *Бюл. мед. науки*. 2018; (1): 42–54.

Bryukhanov V.M., Zharikova G.V. Modern ideas about the treatment of urolithiasis. *Byulleten' meditsinskoy nauki = Bulletin of Medical Science*. 2018; (1): 42–54. [In Russian].

2. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В., Жариков А.Ю., Талалаева О.С. Методы доклинического (экспериментального) исследования влияния лекарственных средств на функцию почек. Новосибирск: Гео, 2013. 84 с.

Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Zharikov A.Yu., Talalaeva O.S. Methods of preclinical (experimental) study of the effect of drugs on renal function. Novosibirsk: Geo, 2013. 84 p. [In Russian].

3. Жариков А.Ю., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза. *Нефрология*. 2008; 12 (4): 28–35.

Zharikov A.Yu., Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V. Modern methods of modeling oxalate nephrolithiasis. *Nefrologiya = Nephrology*. 2008; 12 (4): 28–35. [In Russian].

4. Жариков А.Ю., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе. *Нефрология*. 2009; 13 (4): 37–50.

Zharikov A.Yu., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Lampatov V.V. The mechanism of crystal formation in oxalate nephrolithiasis. *Nefrologia = Nephrology*. 2009; 13 (4): 37–50. [In Russian].

5. Жариков А.Ю., Якушев Н.Н., Жарикова Г.В. Фармакологическое средство для лечения мочекаменной болезни. Пат. 2679120 РФ; Опубл. 29.10.2018.

Zharikov A.Yu., Yakushev N.N., Zharikova G.V. Pharmacological agent for the treatment of urolithiasis. Patent 2679120 RF; Published 29.10.2018. [In Russian].

6. Хафазиянова Р.Х., Бурыкин И.М., Алеева Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии. Казань: Медицина, 2006. 374 с.

Khafaziyanova R.Kh., Burykin I.M., Aleeva G.N. Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology. Kazan: Meditsina, 2006. 374 p. [In Russian].

7. Aslan Z., Aksoy L. Anti-inflammatory effects of royal jelly on ethylene glycol induced renal inflammation in rats. *Int. Braz. J. Urol*. 2015; 41 (5): 1008–1013. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0470.

8. Berlett B.S., Levine R.L. Designing antioxidant peptides. *Redox Rep*. 2014; 19 (2): 80–86.

9. Bin P., Huang R., Zhou X. Oxidation resistance of the sulfur amino acids: Methionine and cysteine. *Biomed. Res. Int*. 2017; 2017: ID 9584932. doi: 10.1155/2017/9584932.

10. Hernanz R., Briones A.M., Salaices M., Alonso M.J. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase in hypertension. *Clin. Sci*. (*Lond*). 2014; 126 (2): 111–121.

11. Khan S.R. Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases. *Minerva Med*. 2013; 104 (1): 23–30.

12. Mittal A., Tandon S., Singla S.K., Tandon C. Mechanistic insights into the antilithiatic proteins from Terminalia arjuna: A proteomic approach in urolithiasis. *PLoS One*. 2016; 11 (9): 1–33.

13. Selvam R., Ravichandran V. Restoration of tissue antioxidants and prevention of renal stone deposition in vitamin B6 deficient rats fed with vitamin E or methionine. *Indian J. Exp. Biol*. 1993; 31 (11): 882–887.

Сведения об авторах:

Жариков А.Ю., д.б.н., e-mail: zharikov_a_y@mail.ru
Якушев Н.Н., к.м.н., e-mail: yakushevnn@mail.ru
Жарикова Г.В., e-mail: ganna1704@mail.ru
Мазко О.Н., к.б.н., e-mail: olesia.mazko@yandex.ru
Макарова О.Г., к.фарм.н., e-mail: olesia552@mail.ru
Брюханов В.М., д.м.н., e-mail: bvm@agmu.ru
Кореновский Ю.В., к.м.н., e-mail: timidin@gmail.com
Азарова О.В., д.б.н., e-mail: kunaza00@mail.ru

Information about authors:

Zharikov A.Yu., doctor of biological sciences, e-mail: zharikov_a_y@mail.ru
Yakushev N.N., candidate of medical sciences, e-mail: yakushevnn@mail.ru
Zharikova G.V., e-mail: ganna1704@mail.ru
Mazko O.N., candidate of biological sciences, e-mail: olesia.mazko@yandex.ru
Makarova O.G., candidate of pharmacological sciences, e-mail: olesia552@mail.ru
Bryukhanov V.M., doctor of medical sciences, e-mail: bvm@agmu.ru
Korenovskiy Yu.V., candidate of medical sciences, e-mail: timidin@gmail.com
Azarova O.V., doctor of biological sciences, e-mail: kunaza00@mail.ru

УДК 616-001.59 DOI: 10.15372/SSMJ20190411

СТИМУЛЯЦИЯ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ОПОРНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ОТСРОЧЕННОГО СОПОСТАВЛЕНИЯ ОТЛОМКОВ

Светлана Александровна ЛЕПЕХОВА[1], Гуанда ЦЯО[1], Олег Аронович ГОЛЬДБЕРГ[2], Николай Валерьевич ТИШКОВ[2], Лида ЦЯО[3], Илья Сергеевич КУРГАНСКИЙ[1,2], Павел Олегович ИНОЗЕМЦЕВ[1], Людмила Ивановна ФЕДОРОВА[1]

[1] *Иркутский научный центр СО РАН*
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 134

[2] *Иркутский научный центр хирургии и травматологии*
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1

[3] *Иркутская городская клиническая больница № 1*
664046, г. Иркутск, ул. Байкальская, 118

Цель исследования заключается в изучении репаративной регенерации опорной ткани в зоне дефекта с использованием методов иглорефлексотерапии со стимуляцией биологически активных точек при моделировании отсроченного сопоставления отломков. **Материал и методы.** Работа выполнена с использованием кроликов породы «Шиншилла», в возрасте 6 месяцев. У всех животных моделировали отсроченное сопоставление отломков костей голени. После сопоставления отломков и фиксации животных с помощью методов рандомизации разделили на две группы – контрольную и основную, в последней выполняли стимуляцию биологически активных точек. В динамике исследования оценивали рентгенологические и морфологические изменения в области костного дефекта. **Результаты и их обсуждение.** Оценка регенерации опорной ткани зоны дефекта под воздействием на комбинацию предложенных биологически активных точек методом иглорефлексотерапии в условиях отсроченного сопоставления отломков костей голени позволила выявить сращение костей голени с физиологической сменой фаз регенерации и образованием дифференцированной костной ткани, элементами структуризации к 50-м суткам исследования и костномозговым пространством. Отмечалось преобладание в 2 раза костной ткани, в 2 раза костномозгового вещества, уменьшение хрящевой ткани, отсутствие волокнистой соединительной ткани по сравнению с контрольной группой, где наблюдалось замедление физиологической смены фаз регенерации и формирование регенерата опорной ткани в виде ложного сустава.

Ключевые слова: регенерация, ложный сустав, голень, морфометрия костной ткани, биологически активные точки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Автор для переписки: Федорова Л.И., e-mail: ludiko@list.ru

Для цитирования: Лепехова С.А., Цяо Г., Гольдберг О.А., Тишков Н.В., Цяо Л., Курганский И.С., Иноземцев П.О., Федорова Л.И. Стимуляция репаративной регенерации опорной ткани в условиях отсроченного сопоставления отломков. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 85–92. doi: 10.15372/SSMJ20190411.

STIMULATION OF REPARATIVE REGENERATION OF SUPPORTING TISSUE UNDER CONDITIONS OF DELAYED APPOSITION OF FRAGMENTS

Svetlana Alexandrovna LEPEKHOVA[1], Guanda QIAO[1], Oleg Aronovich GOLDBERG[2], Nikolay Valer`evich TISHKOV[2], Lida QIAO[3], Ilya Sergeevich KURGANSKIY[1,2], Pavel Olegovich INOZEMTSEV[1], Lyudmila Ivanovna FEDOROVA[1]

[1] *Irkutsk Scientific Center of SB RAS*
664033, Irkutsk, Lermontov str., 134

[2] *Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology*
664003, Irkutsk, Bortsov Revolyutsii str., 1

[3] *Irkutsk City Clinical Hospital № 1*
664046, Irkutsk, Baykal'skaya str., 118

The study is devoted to reparative regeneration of supporting tissue in the area of the defect using the methods of acupuncture with stimulation of biological active points when modeling delayed apposition of fragments. **Material and methods.** The work was performed using laboratory animals of the Chinchilla rabbits, at the age of 6 months. The delayed apposition of shin bone fragments was simulated in all animals. In the dynamics of the study, an assessment of radiological and morphological changes in the area of the bone defect was performed. After the fragments were compared and fixed using animal randomization methods, the animals were divided into two groups – the control and the main group, in which the biologically active points were stimulated. **Results and discussion.** The evaluation of the supporting tissue regeneration in the defect zone under the influence of proposed biologically active points combination by the method of acupuncture within the conditions of delayed apposition of shin bone fragments has revealed physiological change of regeneration phases with the formation of differentiated bone tissue and bone marrow elements to the 50th day of the study. The 2 fold predominance of bone tissue, 2 fold — the bone marrow substance, a decrease in cartilage tissue, the absence of fibrous connective tissue have been revealed compared with the control group, where the slowdown in the physiological change of regeneration phases and the formation of regenerate supporting tissue in the form of pseudarthrosis have been revealed.

Key words: regeneration, pseudarthrosis, shin, bone morphometry, biologically active points.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests
Correspondence author: Fedorova L.I., e-mail: ludiko@list.ru
Citation: Lepekhova S.A., Qiao G., Goldberg O.A., Tishkov N.V., Qiao L., Kurganskiy I.S., Inozemtsev P.O., Fedorova L.I. Stimulation of reparative regeneration of supporting tissue under conditions of delayed apposition of fragments. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 85–92. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190411.

Проблема стимуляции регенерации костной ткани приобретает особую актуальность в связи с увеличением числа травм, большая часть которых приходится на кости голени. Технологическое направление травматологических методов лечения активно развивается, при этом высокий процент осложнений стимулирует поиск эффективных способов влияния на посттравматическую регенерацию костной ткани, что затрудняется недостаточной изученностью патогенеза регенерации опорных тканей. Вместе с тем основным критерием эффективности стимуляции регенерации является изменение характеристики опорных тканей при формировании костно-фиброзно-хрящевых регенератов в зоне перелома [9]. Осложнения при формировании костного регенерата приводят к ухудшению результатов лечения и, как следствие, к инвалидизации пациентов [7]. Количество осложнений значительно возрастает в случае нарушения тактики лечения, а развитию ложного сустава в зоне костного дефекта после травмы способствуют неблагоприятные местные условия [4]. Признаки нарушения процесса репарации кости при отсроченной иммобилизации отломков выявляются после трех суток исследования, при этом срок сращения увеличивается в 1,5 раза [3]. При отсроченном сопоставлении отломков костей голени на 14-е сутки происходит образование ложного сустава [10, 13], а при условии отсутствия стабильной фиксации костных отломков периостальное костное сращение формируется в 4 раза дольше [8].

Для оценки течения репаративной регенерации опорной ткани и эффективности лечения используется комбинация рентгенологических и морфологических исследований зоны формирования регенерата [2, 12]. Методы лечения ложного сустава традиционно включают в себя устранение причин нарушенной репаративной регенерации (реканализация, продольная кортикотомия, иссечение склерозированных концов, фиксация, трансплантация клеток и тканей, и др.) и стимуляцию регенерации [10]. Одним из перспективных направлений улучшения регенерации костной ткани является воздействие на биологически активные точки [16, 17]. В то же время механизмы действия и результативность применения иглорефлексотерапии требуют детальной проработки и проведения экспериментальных исследований.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования явилась оценка регенерации опорной ткани зоны дефекта под воздействием методом иглорефлексотерапии на биологически активные точки в условиях отсроченного сопоставления отломков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено с использованием 48 кроликов породы «Шиншилла» в возрасте 6 месяцев массой 3 кг, которых содержали в условиях вивария соответственно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных

в питомниках НИИ», при свободном доступе к воде и пище с соблюдением стандартных операционных процедур [5]. Эксперименты выполнялись в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), Приказ № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 742 от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23 января 1985 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных», а также основывались на положениях Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг. Все оперативные вмешательства проводили под общим обезболиванием в стерильных условиях.

У всех кроликов моделировали ложный сустав по оригинальной методике [13]. Схема наложения аппарата внешней фиксации:

$$\frac{\text{II } 2-8,4-10}{¾\ 45} - \frac{\text{IV } 2-8,4-10}{¾\ 45} - \frac{\text{V } 2-8,4-10}{¾\ 45} - \frac{\text{VII } 2-8,4-10}{¾\ 45}.$$

Наложение аппарата внешней фиксации выполняли с использованием спиц диаметром 1 мм; натяжение проводили тарированным спиценатягивателем. После монтажа аппарата на левую заднюю конечность осуществляли остеоперфорацию спицей диаметром 1,5 мм с последующей остеоклазией обеих костей голени до полной подвижности костных отломков во всех плоскостях. Далее выполняли фиксацию секторов аппарата с одномоментным разведением между средними секторами на 1 см. В местах выхода чрескостных элементов накладывали асептические повязки. На 14-е сутки исследования проводили одномоментную компрессию костных отломков с фиксацией аппарата в этом положении.

После сопоставления отломков и фиксации животных с помощью методов рандомизации разделили на две группы в зависимости от способа воздействия: контрольная группа 1 (n = 24) и основная группа 2 (n = 24). В группе 2 начиная с 15-х суток ежедневно методом иглорефлексотерапии выполняли стимуляцию биологически активных точек BL17, BL18, BL19, BL20, BL23, GB34, ST36, ST 41, SP6, K3, CV12: первые семь дней, для стимуляции регенерации, в режиме «ограничение», в дальнейшем в течение 14 дней в режиме «стимуляция». На протяжении всего исследования до 50-х суток при внешнем осмотре у кроликов обеих групп аппарат внешней фиксации был стабилен, отмечалось сохранение аппетита, все животные опирались на конечность в аппарате.

У всех животных выполняли рентгенологические, денситометрические исследования с использованием рентгенодиагностического аппарата «Optimus CP» («Philips», Голландия) до и после операции, на 35-е и 50-е сутки (денситометрию – также на 15-е сутки). Для изучения плотности тканей в зоне дефекта использовали метод непрямой компьютерной денситометрии изображений рентгенограмм (оцифровано сканером «Epson Expression 10000XL», «Seiko Epson Corporation», США) и выполняли трехмерную реконструкцию рентгенограммы голени кролика по плотности костной ткани, измеряли интенсивность в пикселях. Для оценки результатов использовали программу ImageJ версии 1,48 (National Institutes of Health, США) [15].

Морфологические исследования гистологических препаратов проводили на 35-е и 50-е сутки с использованием светового микроскопа «Olympus BX41» («Olympus Corporation», Япония). Соотношение площади костной и соединительно-хрящевой тканей в зоне дефекта оценивали с использованием тест-системы [1, 14], результаты представлены в процентах. Измерения выполняли в 40 полях зрения.

Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 10.0 (лицензия № AXAR402G263414FA-V) и представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентили). Значимость различий полученных данных (p) в сравниваемых выборках определяли с использованием непараметрических методов (критерий Манна – Уитни, критерий Вилкоксона) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных морфологических критериев, характеризующих регенерацию в зоне дефекта, является оценка состава костно-фиброзно-хрящевых регенератов. По результатам рентгенологических исследований на 35-е сутки эксперимента (рис. 1, *а*, *б*) у всех животных был выявлен поперечный дефект между отломками костей голени до 0,1 см с сохранением оси конечности, в краевой зоне отломков – участки уплотнения костной ткани. При рентгенологическом исследовании на 50-е сутки у кроликов

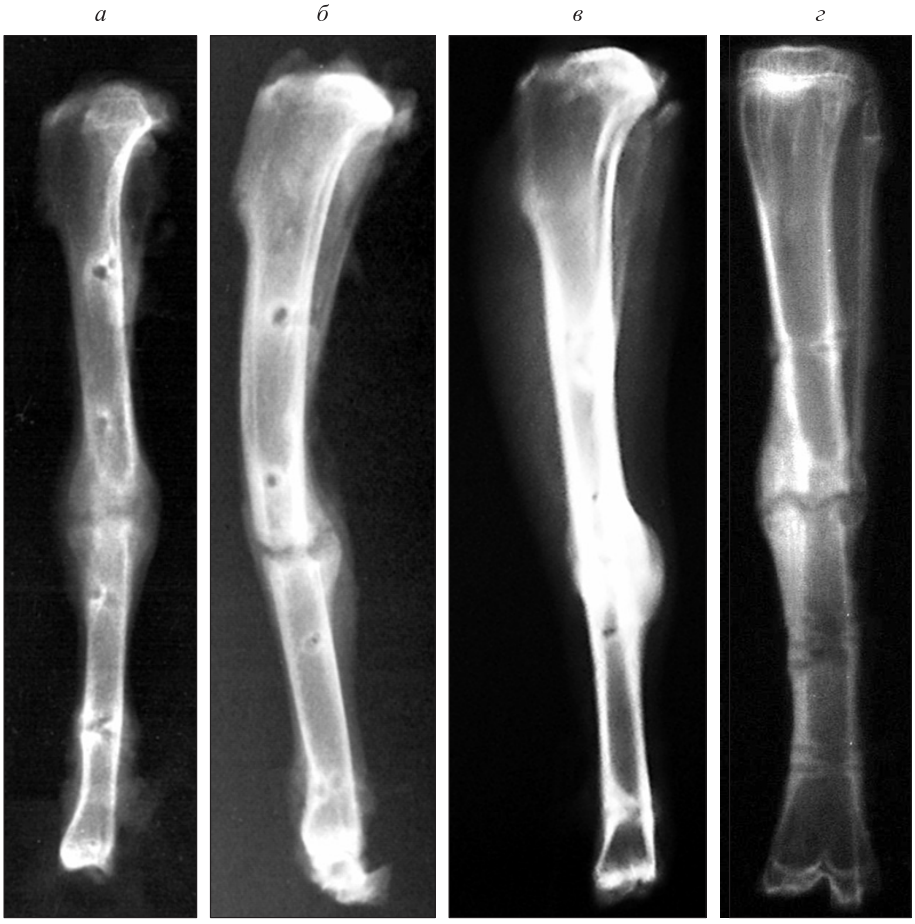

Рис. 1. *Обзорная рентгенограмма голени кроликов группы 2 (воздействие на биологически активные точки) (а, в) и контрольной группы 1 (б, г) на 35-е (а, б) и 50-е сутки эксперимента (в, г)*

Fig. 1. *Review radiograph of the lower leg of rabbits of group 2 (impact on biologically active points) (a, c) and control group 1 (b, d) on the 35th (a, b) and 50th day of the experiment (c, d)*

двух групп были выявлены разнонаправленные процессы. У животных группы 2 при стимуляции биологически активных точек методом иглорефлексотерпии (рис. 1, *в*) регенерат опорной ткани был представлен однородной костной мозолью. Зона дефекта состояла из костного регенерата с плотностью кортикальной пластины и участками пониженной плотности, где отмечалось образование костномозгового канала. При этом в группе 1 (рис. 1, *г*) наблюдались изменения в регенерате опорной ткани, характерные для формирования ложного сустава, морфологические закономерности изменений которых были представлены в наших предыдущих публикациях [11, 13].

Анализ показателей денситометрии выявил однонаправленные изменения со снижением плотности костной ткани на 15-е сутки у животных обеих групп по сравнению с исходной величиной, на 35-е сутки исследования плотность ткани продолжала уменьшаться. На 50-е сутки исследования в группе со стимуляцией биологически активных точек отмечали повышение плотности до исходной величины, тогда как в контрольной группе аналогичный показатель на протяжении всего исследования характеризовался низкими значениями (рис. 2).

Для оценки регенерации опорных тканей в рамках исследования в зоне дефекта проведено морфометрическое исследование, оценивали костную ткань, костномозговое пространство, хрящевую ткань, полости, волокнистую соединительную ткань (таблица). Обнаружено, что на 35-е сутки в группе со стимуляцией биологически активных точек методом иглорефлексотерапии в зоне дефекта в регенерате опорной ткани формируются островки губчатой структуры кости, очаги гиалинового хряща с хондробластами, сосуды. Оценка характеристики опорной ткани регенерата в зоне дефекта в группе 2 на 35-е сутки выявила преобладание костной ткани. Данный

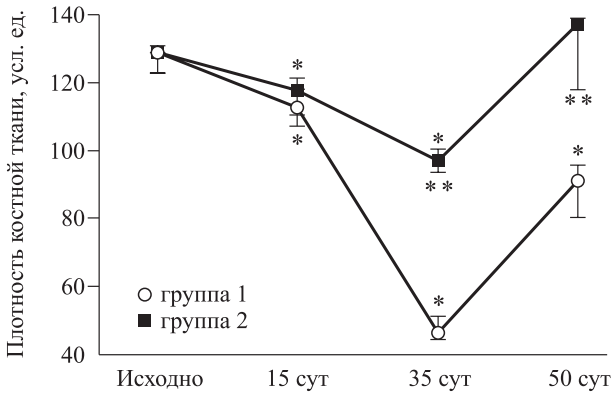

Рис. 2. *Плотность костной ткани голени кроликов контрольной группы 1 и группы 2 (воздействие на биологически активные точки) в динамике исследования (результаты денситометрии). Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от исходной величины внутри группы (*) и величины показателя группы 1 в этой же временной точке (**)*

Fig. 2. *Bone density of the lower leg of the rabbits of the control group 1 and group 2 (effects on biologically active points) in dynamics (results of densitometry). Statistically significant ($p < 0.05$) differences from the original value within the group (*) and from the value of the indicator of group 1 at the same time point (**) are indicated*

показатель был существенно выше, чем в контрольной группе, хрящевая ткань составляла до 10 % от всех тканей. В группе 1 показатель хрящевой ткани был существенно выше, чем в группе 2, и составлял более 35 % от всех тканей.

При гистологическом исследовании на 50-е сутки (рис. 3) у кроликов группы 2 в зоне дефекта выявляли костный регенерат в виде губчатой структуры костной ткани и небольших островков хондроцитов. Новообразованные костные балки регенерата в диафизарной части перелома утолщены, структура приближается к компактной костной ткани, срастается с кортикальной пластинкой диафиза, отмечается консолидация перелома костей голени при отсроченном сопоставлении отломков на 14-е сутки.

При морфометрической оценке состава регенерата опорной ткани в группе 2 на 50-е сутки (см. таблицу) было характерно преобладание костной ткани. При этом величина показателя не отличалась от значения 35-х суток, но была существенно выше, чем в группе 1. Следует отметить, что в группе 1 на 50-е сутки исследования доля хрящевой ткани была значительно больше, чем в группе 2; она характеризовалась наличием полостей, которые отсутствовали в группе 2.

В результате исследования определена структура регенерата в зоне дефекта при отсроченном сопоставлении отломков на 14-е сутки и после воздействия на биологически активные точки, к 50-м суткам представленная губчатой костной тканью и небольшими островками хондроцитов, новообразованными костными балками регенерата. Структура соответствует компактной костной ткани, срастается с кортикальной пластинкой диафиза. Морфометрическое исследование опорной ткани выявило преобладание в 1,8 раза

Таблица

Результаты морфометрического исследования ткани зоны дефекта у животных при стимуляции биологически активных точек

Table

The results of a morphometric study of defect zone tissue in animals during stimulation of biologically active points

Структура, %	Группа	Время после начала эксперимента, сут	
		35	50
Костная ткань	1	33,76 (32,05–37,19)	25,03 (21,19–35,07)
	2	60,08 (58,64–61,26)*	54,69 (53,47–59,96)*
Костномозговое пространство	1	26,15 (23,40–29,12)	20,67 (18,74–22,51)
	2	28,51 (27,11–29,30)	43,75 (39,97–46,49)*.**
Хрящевая ткань	1	34,12 (31,88–35,64)	44,34 (32,10–50,02)
	2	9,64 (8,45–11,62)*	0,56 (0,05–1,04)*
Полость	1	0,00 (0,00–0,00)	6,97 (5,35–7,66)**
	2	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,00)*
Волокнистая соединительная ткань	1	5,76 (4,97–6,69)	3,97 (3,44–4,34)**
	2	1,89 (1,13–2,15)*	0,00 (0,00–0,00)*.**

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – группы 1 (критерий Манна – Уитни), ** – предыдущего срока наблюдения (критерий Вилкоксона).

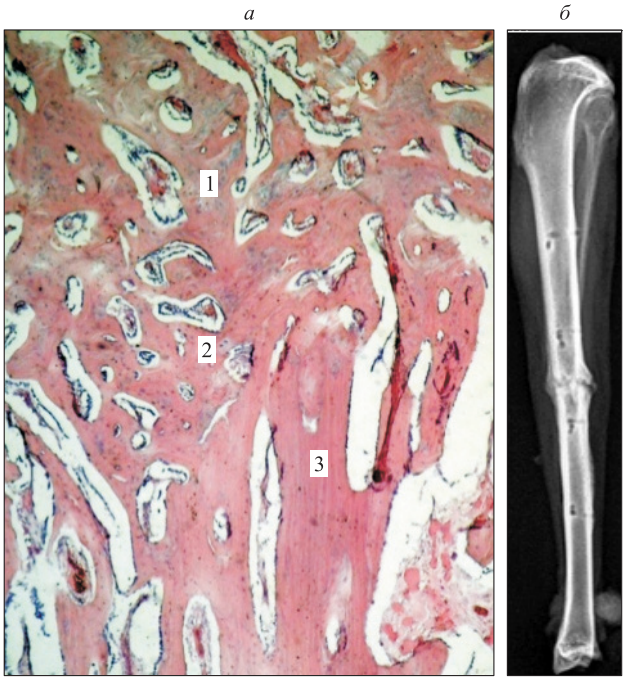

Рис. 3. *Гистологическое (а) и рентгенологическое (б) исследование зоны регенерации между отломками костей голени кроликов группы 2 (воздействие на биологически активные точки) на 50-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×100; 1 – губчатая структура кости; 2 – хондроциты; 3 – костные балки*

Fig. 3. *Histological (a) and X-ray (b) examination of the regeneration zone between tibia bone fragments of group 2 rabbits (effect on biologically active points) on the 50th day of the experiment. Stained with hematoxylin and eosin, ×100; 1 – spongy bone structure; 2 – chondrocytes; 3 – bone beams*

костной и в 3,5 раза уменьшение хрящевой ткани; на 50-е сутки – преобладание в 2,2 раза костной ткани и превалирование в 2 раза костномозгового вещества; уменьшение хрящевой ткани в 80 раз и отсутствие полостей и волокнистой соединительной ткани по сравнению с группой 1, где формировался ложный сустав. Полученные результаты морфометрического исследования совпадают с данными денситометрии, свидетельствующими о повышении плотности тканей регенерата в зоне дефекта до исходной величины на 50-е сутки в группе 2, тогда как в группе 1 наблюдались низкие значения показателя, характерные для ложного сустава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация биологически активных точек при переломе костей голени в условиях нарушенной репаративной регенерации предотвращает формирование ложного сустава к 50-м суткам исследования. Эквивалентом эффективности установлен сросшийся перелом на 50-е сутки исследования, который характеризовался костной мозолью с плотностью, соответствующей плотности кортикальной пластины. Выявлено статистически значимое увеличение площади костной ткани, уменьшение доли хрящевой ткани, отсутствие полостей по сравнению с группой 1, в которой отмечено формирование регенерата опорной ткани в виде ложного сустава.

Таким образом, воздействие на биологически активные точки BL17, BL18, BL19, BL20, BL23, GB34, ST36, ST 41, SP6, K3, CV12 методом иглорефлексотерапии первые семь дней в режиме «ограничение», в дальнейшем в течение 14 дней в режиме «стимуляция» с использованием правила *бу-се* приводит к стимуляции регенерации, в результате чего к 50-м суткам исследования отмечается сращение дефекта с формированием однородной и минерализованной костной мозоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.

Avtandilov G.G. Medical morphometry. manual. Moscow: Meditsina, 1990. 384 p. [In Russian].

2. Бауэр И.В., Головнев В.А., Королева А.М., Казарезов В., Головнев А.В., Косицин А.А. Клинико-морфологическая характеристика различных видов ложных суставов длинных трубчатых костей. *Вестн. НГУ. Сер. Биол., клин. медицина*. 2007; (1): 61–66.

Bauer I.V., Golovnev V.A., Koroleva A.M., Kazarezov V., Golovnev A.V., Kositsyn A.A. Clinical and morphological characteristic of long tubular bone pseudoarthroses of different types. Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. *Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina = Journal of the Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*. 2007; (1): 61–66. [In Russian].

3. Еманов А.А., Горбач Е.Н., Шевцов В.И. Репаративная регенерация костной ткани при лечении переломов костей предплечья у собак методом чрескостного остеосинтеза в условиях ургентной и отсроченной репозиций отломков. *Вет. патология*. 2009; (3): 84–88.

Emanov A.A., Gorbach E.N., Shevtsov V.I. Reparative regeneration of bone tissue in treatment of canine forearm bone fractures by transosseous osteosynthesis method under urgent and delayed reposition of fragments. *Veterinarnaya patologiya = Veterinary Pathology*. 2009; (3): 84–88. [In Russian].

4. Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. М.: Медицина, 1996. 208 с.

Lavrishcheva G.I., Onoprienko G.A. Morphological and clinical aspects of reparative regeneration of the supporting organs and tissues. Moscow: Meditsina, 1996. 208 p. [In Russian].

5. Лепехова С.А. Программа стандартных операционных процедур: лабораторные животные (прием, содержание, уход и контроль здоровья животных в виварии медицинского учреждения): учеб. пособие. Иркутск: НЦРВХ СО РАМН; ИГМУ, 2012. 96 с.

Lepekhova S.A. The program of standard operation procedures: laboratory animals (receiving, keeping, care and control of animals' health in vivarium of a medical institution): a tutorial. Irkutsk, 2012. 96 p. [In Russian].

6. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика: учеб. пособие, 3-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 216 с.

Petri A., Sebin K. Visual medical statistics: a tutorial. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 216 p. [In Russian].

7. Санникова Е.В., Мистиславская И.А., Иванцова И.В. Экспертиза отдаленных результатов лечения переломов костей как эффективный метод контроля качества травматологической помощи. *Травматология и ортопедия России*. 2006; (2): 265.

Sannikova E.V., Mistislavskaia I.A., Ivantsova I.V. Examination of long-term results of treating bone fractures as an efficient method of controlling the quality of traumatological care. *Travmatologiya i ortopediya Rossii = Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2006; (2): 265. [In Russian].

8. Силантьева Т.А., Кочетков С.Ю., Ирьянов Ю.М., Кирсанов К.П. Репаративная регенерация при лечении центральных переломов вертлужной впадины с подвывихом головки бедра в условиях применения метода чрескостного остеосинтеза (экспериментально-морфологическое исследование). *Гений ортопедии*. 2011; (1): 98–103.

Silantiyeva T.A., Kochetkov S.Yu., Iryanov Yu.M., Kirsanov K.P. Reparative regeneration for treatment of central acetabular fractures accompanied by femoral head subluxation under the conditions of transosseous osteosynthesis. *Geniy ortopedii = Genius of Orthopaedics*. 2011; (1): 98–103. [In Russian].

9. Ташпулатов А.Г., Исроилов Р., Яхшимуратов К.Х. Морфологическая оценка репаративной регенерации тканей в зоне ложных суставов и дефектов длинных костей в условиях гнойной инфекции. *Гений ортопедии*. 2010; (4): 51–54.

Tashpulatov A.G., Isroilov R., Yakhshimuratov K. Kh. Morphological assessment of tissue reparative regeneration in the zone of pseudoarthroses and long bone defects under purulent infection. *Geniy ortopedii = Genius of Orthopaedics*. 2010; (4): 51–54. [In Russian].

10. Цяо Г. Закономерности восстановления нарушенной репаративной регенерации костной ткани при воздействии на биологически активные точки: дис. … канд. мед. наук. Иркутск, 2017.

Qiao G., Regularities in the restoration of impaired reparative bone tissue regeneration when exposed to biologically active points: thesis. … cand. med. sciences. Irkutsk, 2017. [In Russian].

11. Цяо Г., Гольберг О.А., Лепехова С.А., Тишков Н.В., Селиверстов П.В., Гуманенко В.В., Ахмедов А.Е. Характеристика изменений костной ткани в зоне дефекта в условиях нарушенной репаративной регенерации. *Гений ортопедии*. 2014; (3): 77–81.

Qiao G., Goldberg O.A., Lepekhova S.A., Tishkov N.V., Seliverstov P.V., Gumanenko V.V., Akhmedov A.E. Characterization of bone tissue changes in the zone of defect under disorde reparative regeneration. *Geniy ortopedii = Genius of Orthopaedics*. 2014; (3): 77–81. [In Russian].

12. Цяо Г., Лепехова С.А., Гольберг О.А., Верхозина Т.К., Селиверстов П.В., Тишков Н.В., Цяо Л., Бубнов А.С. Способ предупреждения формирования ложного сустава при нарушении условий репаративной регенерации кости. Пат. 2547384 РФ; Опубл. 10.04.2015.

Qiao G., Lepekhova S.A., Goldberg O.A., Verkhozina T.K., Seliverstov P.V., Tishkov N.V., Qiao L., Bubnov A.S. Method for preventing false joint formation in abnormal conditions for reparative regeneration of bone. Patent 2547384 RF; Published 10.04.2015. [In Russian].

13. Цяо Г., Тишков Н.В., Лепехова С.А., Гольдберг О.А., Гуманенко В.В. Способ моделирования нарушенной посттравматической регенерации костей голени. *Сиб. мед. журн*. (Иркутск). 2013; 122 (7): 131–134.

Qiao G., Tishkov N.V., Lepekhova S.A., Goldberg O.A., Gumanenko V.V. The way to model the impared post-traumatic regeneration of tibia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal* (Irkutsk). 2013; 122 (7): 131–134. [In Russian].

14. Baak J.P.A., Oork J. A manual of morphometry in diagnostic pathology. New York; Tokyo: Springer Nature, 1983. 205 p.

15. Ferreira T. Image J User Guide IJ 1,48 m. URL http://imagej.nih.gov/ij (access date 13.11.2014).

16. Gao Ch., Zhao J., Yang D. Efficacy of acupuncture in pain management of chronic diseases of bone and joint: a review of literature. *Int. J. Exp. Med*. 2017; 10 (6): 8788–8800.

17. Takeda A., Koike T., Urata S., Ishida T., Oshida Y. Effect of acupuncture at acupoint of Shenshu (BL 23) on the bones of ovariectomized rats. *J. Tradit. Chin. Med*. 2018; 38 (1): 54–60.

Сведения об авторах:

Лепехова С.А., д.б.н., e-mail: lepekhova_sa@mail.ru
Цяо Г., к.м.н., e-mail: qgd@mail.ru
Гольберг О.А., к.м.н., e-mail: scrrs.irk@gmail.com
Тишков Н.В., к.м.н., e-mail: zdrav@iscst.ru
Цяо Л., e-mail: qgd@mail.ru
Курганский И.С., e-mail: kurg.is@mail.ru
Иноземцев П.О., к.фарм.н., e-mail: thiopentalum@yandex.ru
Федорова Л.И., к.б.н., e-mail: ludiko@list.ru

Information about the authors:

Lepekhova S.A., doctor of biological sciences, e-mail: lepekhova_sa@mail.ru
Qiao G., candidate of medical sciences, e-mail: qgd@mail.ru
Goldberg O.A., candidate of medical sciences, e-mail: scrrs.irk@gmail.com
Tishkov N.V., candidate of medical sciences, e-mail: zdrav@iscst.ru
Qiao L., e-mail: qgd@mail.ru
Kurganskiy I.S., e-mail: kurg.is@mail.ru
Inozemtsev P.O., candidate of pharmacological sciences, e-mail: thiopentalum@yandex.ru
Fedorova L.I., candidate of biological sciences, e-mail: ludiko@list.ru

УДК 547.96: 616.24-002 DOI: 1015372/SSMJ20190412

НОВЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ

Михаил Иванович ВОЕВОДА[1,2,3,4], Юлия Игоревна РАГИНО[1], Константин Юрьевич НИКОЛАЕВ[1,4], Ольга Сергеевна ХАРЛАМОВА[1], Екатерина Михайловна СТАХНЁВА[1], Елена Владимировна КАШТАНОВА[1], Яна Владимировна ПОЛОНСКАЯ[1], Динара Евгеньевна ИВАНОЩУК[1,3], Маргарита Витальевна КРУЧИНИНА[1,5], Владимир Николаевич КРУЧИНИН[6]

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

[2] *ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

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

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

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

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

Целью настоящего исследования явилась оценка ассоциаций белков легочного сурфактанта A (SP-A) и D (SP-D) с тяжестью внебольничных пневмоний. **Материал и методы.** Проведено обследование 188 пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония» (ВП). Средний возраст больных составил 54,3 ± 16,5 года (M ± SD). У 102 человек (54,3 %) верифицирована тяжелая ВП. Всем пациентам проведены клиническое, функционально-диагностическое и лабораторное исследование. **Результаты и их обсуждение.** Уровень SP-A и SP-D был существенно выше у пациентов с тяжелой ВП по сравнению с больными нетяжелого течения этого заболевания. Подтверждена выявленная в ранних исследованиях прямая ассоциация тяжелого течения ВП с повышенным содержанием SP-A, прямо связанная с увеличением концентрации С-реактивного белка в крови и скоростью оседания эритроцитов. С помощью парциального корреляционного анализа установлено, что тяжелое течение ВП прямо связано с содержанием SP-A ($r = 0{,}221$; $p = 0{,}003$) и SP-D ($r = 0{,}262$; $p < 0{,}001$) независимо от возраста, курения и массы тела. Таким образом, прямые ассоциации SP-A и SP-D с тяжелым течением ВП отражают высокую значимость этих защитных факторов при инфекционном поражении легких и могут быть использованы впоследствии для оценки степени тяжести заболевания.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, тяжелая пневмония, белки легочного сурфактанта A и D, сыворотка крови, парциальный корреляционный анализ.

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».

Автор для переписки: Кручинина М.В., e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Для цитирования: Воевода М.И., Рагино Ю.И., Николаев К.Ю., Харламова О.С., Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Иванощук Д.Е., Кручинина М.В., Кручинин В.Н. Новые аспекты использования белковых тканеспецифичных маркеров в оценке степени тяжести внебольничных пневмоний. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 93–98. doi: 1015372/SSMJ20190412.

NEW ASPECTS OF THE USE OF PROTEIN TISSUE-SPECIFIC MARKERS IN THE ESTIMATION OF SEVERITY OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

Mikhail Ivanovich VOEVODA[1,2,3,4], Yuliya Igorevna RAGINO[1], Konstantin Yuryevich NIKOLAEV[1,4], Olga Sergeevna KHARLAMOVA[1], Ekaterina Mikhaylovna STAKHNEVA[1], Elena Vladimirovna KASHTANOVA[1], Yana Vladimirovna POLONSKAYA[1], Dinara Evgenyevna IVANOSHCHUK[1,3], Margarita Vitalyevna KRUCHININA[1,5], Vladimir Nikolaevich KRUCHININ[6]

[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] *Federal Research Center for Fundamental and Translational* Medicine *630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

[3] *The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 10*

[4] *Novosibirsk State University 630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2*

[5] *Novosibirsk State Medical University 630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

[6] *Rzhanov Institute of Semiconductor Physics of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 13*

The purpose of the study was to assess the associations of proteins of pulmonary surfactants A (SP-A) and D (SP-D) with the severity of community-acquired pneumonia. **Material and methods.** A survey of 188 patients diagnosed with community-acquired pneumonia (CAP). The average age of the examined patients was 54.3 ± 16.5 years (M ± SD). In 102 patients (54.3 %) severe CAP was verified. All patients underwent clinical, functional, diagnostic and laboratory studies. **Results and discussion.** It was determined that SP-A and SP-D content was significantly higher in patients with severe CAP compared to patients with a mild course of this disease. The direct association of severe CAP with an elevated SP-AP level, directly associated with an increase in the concentration of C-reactive protein in the blood and erythrocyte sedimentation rate, have been confirmed in early studies. Using partial correlation analysis, it was established that the severe course of CAP is directly related to SP-A ($r = 0.221$; $p = 0.003$) and SP-D content ($r = 0.262$; $p < 0.001$) regardless of age, smoking, and body weight. Thus, direct associations of SP-A and SP-D with a severe course of CAP reflect the high pathogenetic significance of these protective factors in infectious lung damage.

Key words: community-acquired pneumonia, severe pneumonia, pulmonary surfactant proteins A and D, blood serum, partial correlation analysis.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Kruchinina M.V., e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Citation: Voevoda M.I., Ragino Yu.I., Nikolayev K.Yu., Kharlamova O.S., Stakhneva E.M., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Ivanoshchuk D.E., Kruchinina M.V., Kruchinin V.N. New aspects of the use of protein tissue-specific markers in the estimation of severity of community-acquired pneumonia. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 93–98. [In Russian]. doi: 1015372/SSMJ20190412.

Известно, что смертность от внебольничных пневмоний (ВП) у лиц молодого и среднего возраста без сопутствующих заболеваний составляет 1–3 %, у пациентов старше 60 лет при тяжелом течении пневмонии и наличии сопутствующих заболеваний – 15–30 %. В России смертность от пневмонии остается высокой. Этому способствуют климатические факторы, невысокая доступность медицинской помощи, обусловленная значительными расстояниями от населенных пунктов до центров специализированной медицинской помощи, а также недооценка степени

тяжести ВП [2]. В связи с этим изучение новых маркеров тяжести ВП является актуальным направлением в современной пульмонологии.

Известно, что белки легочного сурфактанта A (SP-A) и D (SP-D) синтезируются альвеолоцитами и участвуют в патогенезе различных клинических состояний с воспалением слизистых оболочек дыхательных путей, а также паренхимы легких [8]. В настоящее время установлена целесообразность изучения эффективности применения SP-A и SP-D в качестве специфических маркеров воспалительных заболеваний легких [1]. При этом исследования, посвященные оценке связей SP-A и SP-D с клиническими характеристиками пневмоний, единичны [12].

Целью настоящего исследования явилась оценка ассоциаций SP-A и SP-D с тяжестью ВП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 188 пациентов (102 мужчины (54,3 %) и 86 женщин (45,7 %)), поступивших в Городскую клиническую больницу № 25 г. Новосибирска с диагнозом ВП, установленным согласно диагностическим критериям Российского респираторного общества 2010 г. [5]. Средний возраст больных составил 54,3 ± 16,5 года ($M \pm SD$). У 103 пациентов (54,8 %) верифицирована тяжелая ВП в соответствии с «Клиническими рекомендациями по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых» 2014 г. [4]: при выраженной дыхательной недостаточности, при наличии признаков сепсиса и органной дисфункции, также в случае высокого риска летального исхода и необходимости госпитализации больного в отделение интенсивной терапии, а также при высокой вероятности декомпенсации сопутствующей патологии. Всем пациентам помимо сбора анамнеза и рутинного физикального обследования (табл. 1) проводилась обзорная рентгенография органов грудной полости в передней прямой проекции (по показаниям – также и в боковой), пульсоксиметрия, развернутый общий анализ крови, биохимический анализ крови. Содержание SP-A и SP-D в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа на микропланшетном фотометре «Multiskan EX» («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием тест-систем компании «BioVendor» (Чехия).

Исследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (протокол № 15 от 10.04.2018). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью лицензионного пакета программ SPSS 13.0. Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD) (M ± SD).

Таблица 1

Результаты сопоставления клинических показателей у пациентов с нетяжелой и тяжелой ВП

Table 1

The results of the comparison of clinical indicators in patients with non-severe and severe community-acquired pneumonia

Показатель	Пациенты с нетяжелой ВП, $n = 85$	Пациенты с тяжелой ВП, $n = 103$
Возраст, лет	55 ± 16	61 ± 16
Мужской пол	42 (49,4 %)	60 (58,3%)
Курение	13 (15,1 %)	35 (34,3 %)*
Рост, см	168,1 ±9,5	168,6 ± 8,8
Масса тела, кг	75 (68; 85)	70 (61; 78)
АД систолическое, мм рт. ст.	133 ± 14	130 ± 19
АД диастолическое, мм рт. ст.	80 ± 7	80 ± 9
ЧСС в 1 мин	90,0 ± 15,1	94,6 ± 16,3*
ЧДД в 1 мин	19,6 ± 2,0	22,4 ± 2,6**
Температура тела, °С	37,6 (36,9; 37,9)	37,9 (37,5; 38,2)**
Сатурация, %	98,3 (98,0; 99,0)	96,7 (96,0; 98,0)*

Примечание. АД – артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЧДД – частота дыхательных движений; здесь и в табл. 2 обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей пациентов с нетяжелой ВП: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,001$.

При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался *t*-тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялись медиана (Me), 25 и 75 % процентили (25 %; 75 %) (Me (25 %; 75 %)) и применялся тест Манна – Уитни. Связи между признаками оценивались с помощью парциального корреляционного анализа. Номинальные данные представлены в виде относительных частот объектов исследования (*n*, %), для оценки их различий использовался критерий χ^2. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (*p*) принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты сопоставления клинических характеристик пациентов с нетяжелой и тяжелой ВП. Пациенты с тяжелой ВП были старше, чаще курили, а значения массы тела у них были меньше, чем у больных с нетяжелой ВП. В группе пациентов с тяжелой ВП частота сердечных сокращений, частота дыхательных движений и температура тела были больше, а сатурация крови кислородом – меньше, чем у пациентов с нетяжелой ВП, что напрямую характеризует выраженность повреждения дыхательной системы и находит отражение в критериях тяжести данного заболевания [4].

В табл. 2 отражено сопоставление лабораторных показателей острофазовых реакций (лейкоцитоз, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), содержание С-реактивного белка, фибриногена), маркеров тяжелого течения и необходимости госпитализации в отделение интенсивной терапии (содержание мочевины, креатинина) [4], концентрация SP-A и SP-D у пациентов с нетяжелой и тяжелой ВП.

Определено, что содержание лейкоцитов и СОЭ при ВП тяжелой степени достоверно выше, что достаточно давно используется в клинической практике в качестве маркеров тяжелого течения [6]. Мы получили существенно более высокие показатели сывороточного уровня SP-A и SP-D у пациентов с тяжелой ВП по сравнению с больными нетяжелого течения этого заболевания. В литературе уже показана прямая связь между повышением содержания SP-D и риском развития жизнеугрожающих осложнений и летальности при ВП [7, 9, 10]; в исследовании S. Spoorenberg и соавторов обнаружено, что пациенты с тяжелой ВП имели достоверно более высокий уровень SP-D, чем пациенты с нетяжелой ВП, и установлено, что SP-D является значимым предиктором для долгосрочной смертности [11]. Выявленная прямая ассоциация тяжелого течения ВП с SP-A корреспондируется с ранее проведенным нами исследованием, в котором продемонстрировано повышение содержания SP-A у пациентов с пневмонией, прямо связанное с увеличением концентрации СРБ и СОЭ. Вероятно, это обусловлено участием SP-A в патогенезе развития клинических проявлений пневмонии, отражающих активный воспалительный процесс и повреждение паренхимы легких [3].

С помощью парциального корреляционного анализа установлено, что тяжелое течение ВП прямо связано с содержанием SP-A (r = 0,221; p = 0,003) и SP-D (r = 0,262; p < 0,001) независимо от возраста, курения и массы тела. Полученные результаты подтверждают важную роль SP-A и SP-D в патогенезе развития внебольничной пневмонии и отражают наличие активного воспали-

Таблица 2

Результаты сопоставления лабораторных показателей у пациентов с нетяжелой и тяжелой ВП

Table 2

The results of the comparison of laboratory parameters in patients with non-severe and severe community-acquired pneumonia

Показатель	Пациенты с нетяжелой ВП, n = 85	Пациенты с тяжелой ВП, n = 103
Содержание лейкоцитов, 10^9/л	10,4 (8,1; 13,3)	13,3 (9,6; 17,0) **
СОЭ, мм/ч	20,0 (12,0; 30,0)	29,0 (19,0; 40,0) **
Содержание С-реактивного белка, мг/л	12 (0; 24)	24 (12; 48)
Содержание фибриногена, г/л	5,0 (4,1; 6,8)	5,8 (4,4; 7,2)
Содержание креатинина, мкмоль/л	93,6 (80,3; 106,0)	90,4 (80,5; 120,7)
Содержание мочевины, ммоль/л	5,4 (4,3; 7,5)	6,4 (4,8; 8,7)
Содержание SP-A, нг/мл	36,88 (28,79; 46,77)	57,58 (39,70; 92,88) **
Содержание SP-D, нг/мл	273,90 (189,39; 425,66)	411,83 (249,32; 649,88) **

тельного процесса в ответ на чужеродную инвазию легких. SP-A и SP-D могут рассматриваться в качестве новых биомаркеров тяжелой внебольничной пневмонии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, прямые ассоциации SP-A и SP-D с тяжелым течением ВП отражают высокую значимость этих защитных факторов при инфекционном поражении легких, что позволяет рассматривать их как новые биохимические маркеры тяжелой ВП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалькова Н.А., Рагино Ю.И., Логвиненко Н.И., Мерекина Е.В., Воевода М.И. Значение сурфактантных белков в диагностике терапевтических заболеваний. *Терапевт. архив*. 2015; (1): 115–119.

Kovalkova N.A., Ragino Yu.I., Logvinenko N.I., Merekina E.V., Voevoda M.I. The value of surfactant proteins in the diagnosis of therapeutic diseases. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*. 2015; (1): 115–119. [In Russian].

2. Круглякова Л.В., Нарышкина С.В. Тяжелая внебольничная пневмония: диагностика и лечение (обзор литературы). *Бюл. физиол. и патол. дыхания*. 2016; (59): 98–108.

Kruglyakova L.V., Naryshkina S.V. Severe community-acquired pneumonia: diagnostics and treatment (review). *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration*. 2016; (59): 98–108 [In Russian].

3. Рагино Ю.И., Николаев К.Ю., Харламова О.С., Стахнева Е.М., Воевода М.И. Ассоциации уровня в крови сурфактантного белка А с клиническими характеристиками пневмонии. *Сиб. науч. мед. журн*. 2017; 37 (5): 16–20.

Ragino Yu.I., Nikolaev K.Yu., Kharlamova O.S., Stakhneva E.M., Voevoda M.I. Associations of blood level of surfactant protein A with the clinical characteristics of pneumonia. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2017; 37 (5): 16–20. [In Russian].

4. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Авдеев С.Н., Тюрин И.Е., Руднов В.А., Рачина С.А., Фесенко О.В. Российское респираторное общество (РРО), Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). *Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. Пульмонология*. 2014; (4): 13–48.

Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Kozlov R.S., Avdeev S.N., Tyurin I.E., Rudnov V.A., Rachina S.A., Fesenko O.V. Russian Respiratory Society (RRO), Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC). *Clinical recommendations for the diagnosis, treatment and prevention of severe community-acquired pneumonia in adults. Pulmonologiya = Pulmonology*. 2014; (4): 13–48. [In Russian].

5. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике (пособие для врачей). *Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерапия*. 2010; 12 (3): 186–225.

Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Kozlov R.S., Tyurin I.E., Rachina S.A. Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of community acquired pneumonia in adults (physician's manual). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 12 (3): 186–225. [In Russian].

6. Brown J. Community-acquired pneumonia. *Clin. Med*. 2012; 12 (6): 538–543. doi: 10.7861/clinmedicine.12-6-538.

7. Du J., Abdel-Razek O., Shi Q., Hu F., Ding G., Cooney R.N., Wang G. Surfactant protein D attenuates acute lung and kidney injuries in pneumonia-induced sepsis through modulating apoptosis, inflammation and NF-κB signaling. *Sci. Rep*. 2018; 8 (1): 15393.

8. Eisner M.D., Parsons P., Matthay M.A., Ware L., Greene K. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax*. 2003; 58 (11): 983–988.

9. Garcia-Laorden M.I., Rodriguez de Castro F., Sole-Violan J., Rajas O., Blanquer J., Borderias L., Aspa J., Briones M.L., Saavedra P., Marcos-Ramos J.A., Gonzalez-Quevedo N., Sologuren I., Herrera-Ramos E., Ferrer J.M., Rello J., Rodriguez-Gallego C. Influence of genetic variability at the surfactant proteins A and D in community-acquired pneumonia: a prospective, observational, genetic study. *Crit. Care*. 2011; 15: ID R57. doi: 10.1186/cc10030.

10. Leth-Larsen R., Nordenbaek C., Tornoe I., Moeller V., Schlosser A., Koch C., Teisner B., Junker P., Holmskov U. Surfactant protein D (SP-D) serum levels in patients with community-acquired pneumonia. *Clin. Immunol*. 2003; 108 (1): 29–37. doi: 10.1016/s1521-6616(03)00042-1.

11. Spoorenberg S., Vestjens S., Rijkers G.T., Meek B., van Moorsel C.H., Grutters J.C., Bos W.J. YKL-40, CCL18 and SP-D predict mortality in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Respirology*. 2016; 22 (3): 542–550. doi: 10.1111/resp.12924.

12. Wang L.L., Zheng S.Y., Ren L., Xiao Q.Y., Long X.R., Luo J., Li Q.B., Deng Y., Xie X.H., Liu E.M. Levels of surfactant proteins A and D in bronchoalveolar lavage fluid of children with pneumonia and their relationships with clinical characteristics. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2016; 18 (5). 386–390. [In Chinese].

Сведения об авторах:

Воевода М.И., д.м.н., проф., академик РАН, ORCID 0000-0001-9425-413X
Рагино Ю.И., д.м.н., проф., член-корр. РАН
Николаев К.Ю., д.м.н., ORCID 0000-0003-4601-6203
Харламова О.С.
Стахнёва Е.М., к.б.н.
Каштанова Е.В., д.б.н., ORCID 0000-0003-0780-7723
Полонская Я.В., д.б.н.
Иванощук Д.Е.
Кручинина М.В., д.м.н, ORCID 0000-0003-0077-3823, e-mail: kruchmargo@yandex.ru
Кручинин В.Н., к.х.н., ORCID 0000-0002-9905-9031

Information about authors:

Voevoda M.I., doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, ORCID 0000-0001-9425-413X
Ragino Yu.I., doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS
Nikolaev K.Yu., doctor of medical sciences ,ORCID 0000-0003-4601-6203
Kharlamova O.S.
Stakhneva E.M., candidate of biological sciences
Kashtanova E.V., doctor of biological sciences, ORCID 0000-0003-0780-7723
Polonskaya Ya.V., doctor of biological sciences
Ivanoshchuk D.E.
Kruchinina M.V., doctor of medical sciences, ORCID 0000-0003-0077-3823, e-mail: kruchmargo@yandex.ru
Kruchinin V.N., candidate of chemical sciences, ORCID 0000-0002-9905-9031

УДК 616-006.484.04 DOI: 10.15372/SSMJ20190413

НАЧАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ РЕЦИДИВНЫХ ГЛИОБЛАСТОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕЗЕКЦИИ В СОЧЕТАНИИ С ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ БАЛЛОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ БРАХИТЕРАПИЕЙ

Орхан Альзамин-оглы АБДУЛЛАЕВ[1,2], Алексей Сергеевич ГАЙТАН[2], Нидаль САЛИМ[2], Глеб Сергеевич СЕРГЕЕВ[2], Илья Владимирович МАРМАЗЕЕВ[2], Эвалдас ЧЕСНУЛИС[3], Алексей Леонидович КРИВОШАПКИН[1,2]

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

[2] *АО «Европейский медицинский центр» 129090, г. Москва, ул. Щепкина, 35*

[3] *Клиника Хирсланден, Центр нейрохирургии, Швейцария, 8008, г. Цюрих, Вителликерштрассе, 40*

Глиобластомы головного мозга (ГБ) характеризуются ранним локальным рецидивом после стандартного комбинированного лечения. Технологии лечения при рецидивах ГБ требуют дальнейшего развития и изучения. Радикальность резекции злокачественных глиом коррелирует с показателями выживаемости пациентов, но не является исцеляющей и должна быть обязательно дополнена адъювантными методами лечения. Интраоперационная баллонная электронная брахитерапия (ИБЭБ) недавно введена в общую онкологическую практику и потенциально может быть успешно применена в лечении рецидивных ГБ. В данной статье представлены начальные результаты лечения пациентов с рецидивом ГБ с использованием повторной резекции в сочетании с ИБЭБ. **Материал и методы.** Пациентам (n = 11) с рецидивом ГБ после стандартного комбинированного лечения выполнена максимальная безопасная микрохирургическая резекция в сочетании с ИБЭБ. Период наблюдения после ИБЭБ составил от 1 до 30 мес. **Результаты.** Медиана общей выживаемости (от момента постановки диагноза до смерти или до момента представления рукописи для живых) для пациентов, включенных в анализ показателей выживаемости (n = 9), составила 27 мес. (от 17 до 47 мес.). В подгруппе больных (n = 4) с контраст-накапливающим объемом опухоли, составлявшим после резекции, по данным магнитно-резонансной томографии, $\leq$ 2,5 см^3, медиана выживаемости без локального прогрессирования (locPFS) равнялась 21,25 мес. (от 10 до 30 мес.). **Заключение.** Первичные результаты использования рассматриваемого в статье метода лечения рецидивных ГБ являются обнадеживающими, особенно в случае контраст-накапливающего объема опухоли менее 2,5 см^3 и отсутствия признаков мультифокального роста новообразования.

Ключевые слова: глиобластома, резекция глиом, радикальность резекции, лучевая терапия, брахитерапия, интраоперационная лучевая терапия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Автор для переписки: Абдуллаев О.А., e-mail: orkhan-ali@yandex.ru

Для цитирования: Абдуллаев О.А., Гайтан А.С., Салим Н., Сергеев Г.С., Мармазеев И.В., Чеснулис Э., Кривошапкин А.Л. Начальные результаты лечения рецидивных глиобластом головного мозга с применением резекции в сочетании с интраоперационной баллонной электронной брахитерапией. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 99–109. doi: 10.15372/SSMJ20190413.

INITIAL RESULTS IN RECURRENT BRAIN GLIOBLASTOMAS MANAGEMENT WITH MAXIMAL SAFE RESECTION FOLLOWED BY INTAOPERATIVE BALLOON ELECTRONIC BRACHYTERAPY

Orkhan Al'zamin-ogly ABDULLAEV[1,2], Aleksey Sergeevich GAYTAN[2], Nidal SALIM[2], Gleb Sergeevich SERGEEV[2], Il'ya Vladimirovich MARMAZEEV[2], Evaldas CHESNULIS[3], Aleksey Leonidovich KRIVOSHAPKIN[1,2]

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

[2] *European Medical Center*
129090, Moscow, Schepkin str., 35

[3] *Klinik Hirslanden, Neurochirurgie Hirslanden Zürich*
Switzerland, 8008, Zürich, Witellikerstrasse, 40

Brain glioblastomas (GBM) are notorious for their early local recurrence despite of standard combined treatment. Technologies for recurrent GBM management require further development and research. Resection of malignant gliomas must be followed by an adjuvant treatment. Intraoperative balloon electronic brachytherapy (IBEB) has been recently introduced into clinical practice and could be successfully applied to recurrent GBM management. This article presents the initial results of recurrent GBM management with maximal safe resection followed by IBEB. **Material and methods.** Patients (n = 11) with recurrent GBM after standard combined treatment were managed with maximal safe microsurgical resection followed by IBEB. The follow-up period after IBEB ranged from 1 to 30 months. **Results.** The median overall survival for the entire study group of patients included in the statistical analysis (n = 9) was 27 months (range 17–47 months). In the subgroup of patients (n = 4) with contrast-enhanced tumor MRI volume after resection ≤ 2.5 cm^3, the median local progression free survival (locPFS) was 21.25 months (range 10–30 months). **Conclusion.** Initial results in recurrent brain GBMs management with resection followed by IBEB seems to be promising, especially in case of contrast-enhanced tumor volume detected on MRI after resection is less than 2.5 cm^3 without signs of multifocal tumor growth.

Key words: glioblastoma, glioma resection, radical resection, radiation therapy, brachytherapy, intraoperative radiation therapy.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.
Acknowledgments. The study had no sponsorship.
Correspondence author: Abdullaev O.A., e-mail: orkhan-ali@yandex.ru
Citation: Abdullaev O.A., Gaytan A.S., Salim N., Sergeev G.S., Marmazeev I.V., Chesnulis E., Krivoshapkin A.L. Initial results in recurrent brain glioblastomas management with maximal safe resection followed by intaoperative balloon electronic brakheterapy. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 99–109. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190413.

Глиобластомы головного мозга (ГБ) – наиболее часто встречающиеся первичные новообразования головного мозга, характеризующиеся выраженным инфильтративным ростом и агрессивным клиническим течением [1]. Сама по себе резекция злокачественной инфильтративной внутримозговой опухоли не является исцеляющей и требует применения технологий адъювантного лечения в отношении макро- и микроскопических элементов опухоли в инфильтративной зоне [4]. Существует стандартный протокол комбинированного лечения впервые выявленных ГБ, предложенный в 2005 г. R. Stupp и соавт., включающий резекцию новообразования с последующим (в пределах четырех недель после операции) наружным конформным фракционным облучением суммарной очаговой дозой 60 Гр одновременно с химиотерапией темозоломидом с переходом на 6 поддерживающих циклов тем же препаратом. Этот протокол достоверно улучшил результаты лечения пациентов, страдающих ГБ [15].

В большинстве случаев ранний локальный рецидив опухоли возникает в пределах 2 см от пострезекционной полости [14]. Однозначного мнения о том, как лечить пациентов с рецидивными ГБ, нет. Ведутся активные поиски новых путей терапии рецидивных опухолей, поскольку существующие подходы (различные технологии повторного наружного облучения, химиотерапия второй линии, иммунотерапия, TTF (tumour

treating fields, противоопухолевые поля)) не обеспечивают удовлетворительных показателей выживаемости пациентов [11, 16].

В многочисленных исследованиях, посвященных лечению впервые выявленных ГБ, показано, что степень резекции контрастируемого объема ГБ по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) позитивно коррелирует с показателями безрецидивной и общей выживаемости пациентов. Данный факт объясняется тем, что адъювантные методы химиолучевой терапии, а также собственные иммунные реакции организма относительно эффективны только при малых объемах малигнизированной ткани [6, 10, 13]. Эффективность повторной резекции при рецидиве ГБ все еще требует накопления достаточной доказательной базы.

Лучевая терапия также показала свою эффективность в лечении злокачественных глиом головного мозга. Однако повторное и относительно безопасное применение наружного облучения при рецидивах внутримозговых опухолей очень часто ограничено ввиду высоких рисков лучевых осложнений [5]. Кроме того, известен факт, что митотический цикл стволовой клетки ГБ составляет всего 24 ч, поэтому продолжительность ожидания до начала лучевой терапии отрицательно коррелирует с показателями выживаемости [7]. С этой позиции применение интраоперационной лучевой терапии (ИОЛТ) потенциально может улучшить результаты лечения пациентов с ГБ. Попытки использования различных технологий ИОЛТ в лечении пациентов с различными злокачественными глиомами головного мозга ведутся уже на протяжении нескольких десятилетий [9]. В ряде исследований сообщалось о лучших показателях выживаемости пациентов после ИОЛТ по сравнению с контролем или литературными данными. Однако большинство исследований было выполнено на малочисленных группах пациентов как без надежного контроля за степенью радикальности резекции опухоли, так и без оценки изодозного распределения облучения по причине отсутствия необходимых технологических решений.

Интраоперационная баллонная электронная брахитерапия (ИБЭБ) – новый способ, который успешно применяется в онкологической практике на протяжении последних нескольких лет для лечения локальных форм рака молочной железы и некоторых других новообразований [8]. К его техническим преимуществам относятся относительная простота выполнения, возможность тщательного предоперационного планирования облучения и интраоперационный контроль за ходом процесса, непродолжительное время сеанса, позволяющего получить требуемую предписываемую разовую очаговую дозу, эквивалентную многократным сеансам фракционного наружного облучения, а также возможность минимизировать лучевую нагрузку на окружающие здоровые ткани пациента и медицинский персонал.

В данной статье впервые в международной нейроонкологической практике приводятся начальные результаты применения технологии повторной резекции рецидивных ГБ головного мозга в сочетании с ИБЭБ. Коллективом авторов получен патент РФ на изобретение [3].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование носит проспективный когортный характер и проходит на базе клиники АО «Европейский медицинский центр» после одобрения локальным этическим комитетом Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 17 от 11.05.2017). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии включения в исследование: признаки рецидива ГБ по данным МРТ головного мозга с контрастированием, МР-перфузии и/или позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией (ПЭТ-КТ), головного мозга с 18F-DOPA, возраст ≥18 лет, индекс Карновского ≥50 %. Критерии исключения: наличие противопоказаний к общей анестезии, декомпенсированные хронические заболевания, острый воспалительный процесс инфекционной и неинфекционной природы, невозможность проходить МРТ с контрастированием и/или ПЭТ с аминокислотными трейсерами, грудное вскармливание или беременность.

Окончательное решение о включении пациента в исследование принимал мультидисциплинарный консилиум с обязательным участием нейрохирурга, специалиста по лучевой диагностике, радиотерапевта и химиотерапевта. Оценка изодозного распределения и разработка плана проведения ИБЭБ осуществлялись радиотерапевтом и нейрохирургом на предоперационном этапе в системе планирования лечения «BrachyVision™» («Varian Medical Systems», США, программное обеспечение). Для расчета поглощенной дозы облучения были использованы данные предполагаемого объема наполненного баллона-аппликатора, полученные достоверными методиками предоперационной нейровизуализации (мультиспиральная КТ (МСКТ) и МРТ головного мозга), цифровая модель источника рентгеновского излучения марки «Axxent» («The Xoft® ElectronicBrachytherapy System®», США) (размер 25 см), заведенного в планирующую систе-

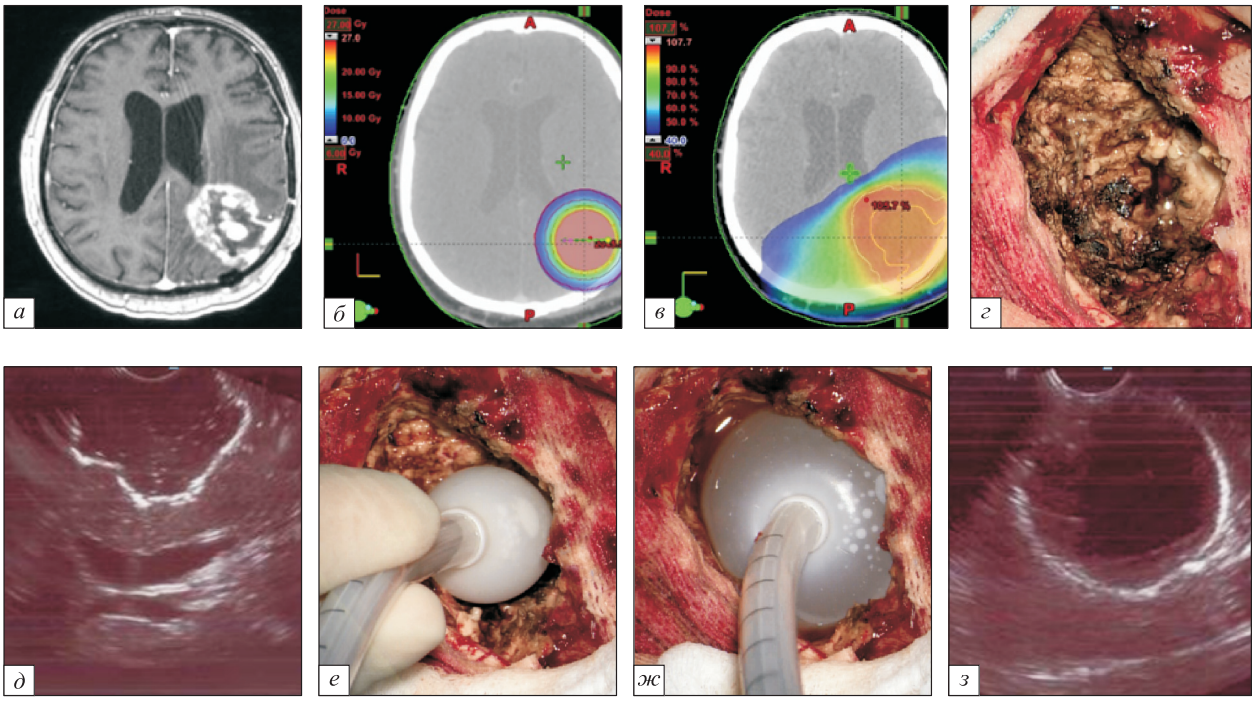

Рис. 1. *Этапы ИБЭБ: а – МРТ головного мозга с контрастированием до повторной резекции и ИБЭБ, рецидив ГБ левой теменной доли; б – предоперационная оценка изодозного распределения области облучения на основании предоперационных данных МСКТ в планирующей системе «BrachyVision™»; в – для сравнения представлено изодозное распределение повторного наружного облучения, рассчитанного в системе планирования лечения «Eclipse™» («Varian Medical Systems») на тех же предоперационных данных МСКТ; г – общий вид пострезекционной полости; д – ультразвуковое сканирование области пострезекционной полости демонстрирует ее конфигурацию и подтверждает отсутствие макроскопической остаточной неопластической ткани; е – введение баллона-аппликатора в пострезекционную полость; ж – окончательная позиция раздутого баллона-аппликатора в пострезекционной полости; з – ультразвуковое сканирование подтверждает адекватное позиционирование баллона-аппликатора с плотным его прилежанием к стенкам пострезекционной полости*

Fig. 1. *Stages of IBEB: a – MRI of the brain before re-resection and IBEB, recurrence of GBM of the left parietal lobe; b – preoperative assessment of the isodose distribution of the irradiation area on the basis of preoperative CT in the planning system «BrachyVision ™»; c – for comparison, the isodose distribution of repeated external exposure calculated in the Eclipse™ treatment planning system (Varian Medical Systems) on the same preoperative CT scan is presented; d – a general view of the post-resection cavity; e – ultrasound scanning of the post-resection cavity shows its configuration and confirms the absence of macroscopic residual neoplastic tissue; f – introduction of the balloon applicator into the post-resection cavity; g – final position of the inflated balloon applicator in the post-resection cavity; h – ultrasound scan confirms adequate positioning of the balloon applicator with its dense attachment to the walls of the post-resection cavity*

му «BrachyVision™», предоперационная МСКТ головного мозга (рис. 1).

Хирургическое вмешательство выполнялось под общей анестезией с соблюдением принципа максимальной и безопасной микрохирургической резекции, под контролем компьютерной безрамной (МРТ с контрастированием) и метаболической навигации (Аласенс), а также нейрофизиологического мониторинга моторных вызванных потенциалов. В случае мультифокального роста резекции подвергался наиболее крупный неопластический фокус, как правило, определявший масс-эффект и клиническую картину заболевания. В отношении остальных очагов применялись различные варианты химиолучевого лечения. ИБЭБ проводили с использованием устройства электронной брахитерапии «Axxent» (регистрационное удостоверение РФ на медицинское изделие от 17.04.2015 № РЗН 2015/2593) (рис. 2).

После завершения этапа микрохирургического удаления новообразования объем пострезекционной полости измерялся путем ее заполнения изотоническим раствором натрия хлорида (рис. 1, *г*, *д*). Затем в данную полость вводился пустой баллон-аппликатор системы «Axxent», который заполнялся уже известным объемом изотонического раствора натрия хлорида и принимал сферическую форму, плотно прилегая к

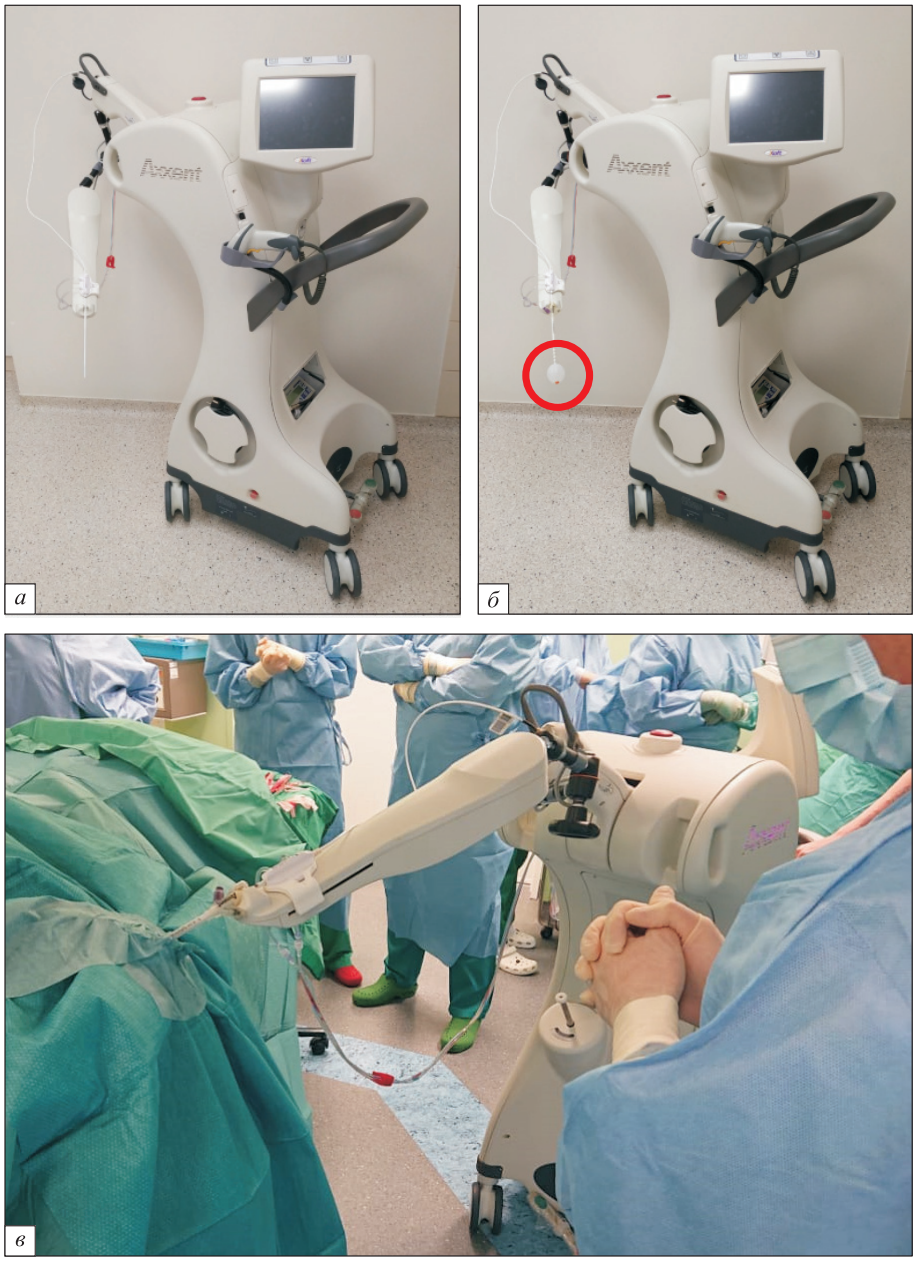

Рис. 2. *Система «Axxent» с источником облучения: а – общий вид; б – баллон-аппликатор для проведения ИБЭБ (в кружке); в – работа системы в операционной – баллон-аппликатор присоединен к системе, введен источник облучения*

Fig. 2. *The Axxent system with a source of radiation: a – general view; b – applicator balloon for carrying out IBEB (circle); c – the work of the system IBEB in the operating room – the applicator balloon is connected to the system, the radiation source is introduced*

стенам ложа удаленной опухоли по всей площади под контролем ультразвукового сканирования (рис. 1, *е*, *ж*, *з*). После введения портативного источника рентгеновского излучения марки «Axxent» в канал баллона-аппликатора проводили сеанс ИБЭБ с однократным подведением дозы 20 Гр, предписанной на поверхность баллона-аппликатора, по всей площади ложа удаленной опухоли (рис. 2, *в*). После завершения сеанса рентгеновский источник извлекали из канала баллона-аппликатора. Перед удалением баллона-аппликатора из пострезекционной полости проводили его дефляцию путем аспирации изотонического раствора натрия хлорида. Окончание операции выполняли по общепринятым в нейрохирургии правилам. Резецированные фрагменты

опухоли направлялись на патоморфологический анализ, включающий гистологическое, иммуногистохимическое (GFAP, p53, Ki-67) и молекулярно-генетическое (IDH1 (R132H), MGMT) исследование.

Для оценки безрецидивной и общей выживаемости, а также наличия и выраженности побочных эффектов проводился томографический контроль с применением МРТ головного мозга с контрастированием и перфузией в течение 24 ч после операции, а затем МРТ головного мозга с контрастированием и перфузией и/или ПЭТ-КТ головного мозга с L-6-[^{18}F]фтор-3,4-диоксифенилаланином (18F-DOPA) 1 раз в 3 месяца до возникновения рецидива опухоли. Также осуществлялся ежемесячный контроль общего состояния пациента по шкале Карновского с оценкой общесоматического и неврологического статусов.

Контраст-накапливающий объем опухоли (КНО) до и после резекции рассчитывался в программе «НейроСегмент» («Свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ» № 2015660634 от 05.10.2015) на основании DICOM МРТ.

МРТ головного мозга проводилось до оперативного лечения и в первые 24 ч после на аппарате «MAGNETOM Aera 1.5 T» («Siemens AG», Германия). Протокол МРТ: 1. Локализатор; 2. T2 tse аксиальные срезы 4 мм; FOV 220 мм; матрица 448; TR/TE 5640/91 мс; 3. FLAIR аксиальные срезы 4 мм; FOV 220 мм; матрица 320; TR/TE 9000/82 мс; 4. T1 mprage 3D преконтрастное исследование 1 мм; FOV 227 мм матрица 256; TR/TE 2200/3.2 мс TI 900 мс; 5. DWI (b 0,50, 1000 с/мм^2) 4 мм; FOV 230 мм; матрица 176; TR/TE 7300/109 мс; 6. SWI; FOV 230 мм; матрица 256.; 7. DCE (T1 перфузия) 4 мм; FOV 230 мм; матрица 192; TR/TE 4,5/1,8 мс; 8. DSC (T2* перфузия) 5 мм; FOV 230 мм; матрица 128; TR/TE 1810/38 мс; 9. T1 mprage постконтрастное исследование (идентично пункту 4); 10. T1 tse fatsat аксиальные срезы, постконтрастное исследование 4 мм; FOV 230 мм; матрица 320; TR/TE 582/8.9 мс.

С целью дифференциальной диагностики постлучевых изменений и рецидива опухоли проводился анализ постконтрастных МРТ-изображений, перфузионных карт и результатов ПЭТ-КТ головного мозга с 18F-DOPA. Для стандартизированной оценки возможных нежелательных явлений, в том числе развития радионекроза в зоне проведения ИБЭБ, использовали критерии, принятые Национальным институтом здоровья США (CTCAE версии 4.03).

Основываясь на результатах исследований, опубликованных нами ранее, в отношении влияния КНО ГБ, выявляемого по результатам МРТ в пределах 24 ч после операции [2], все пациенты были разделены на две подгруппы: с величиной КНО опухоли более 2,5 см^3 (1-я подгруппа) и 2,5 см^3 и более (2-я подгруппа).

В качестве основных контрольных показателей эффективности технологии повторной резекции рецидивных ГБ в сочетании с ИБЭБ выступали продолжительность периода без локального прогрессирования опухоли в зоне проведения резекции и ИБЭБ (locPFS), а также продолжительность общей выживаемости пациентов (ОВ) с момента поставки диагноза.

Эмпирические данные, полученные при формировании исследуемых групп, обрабатывались с помощью дескриптивной статистики и описывались посредством показателей меры среднего уровня и меры рассеяния (медиана, максимальное и минимальное значение, среднее значение, стандартная ошибка и отклонение среднего значения, дисперсия случайной величины). Влияние ИБЭБ и радикальности удаления опухоли на общую и локальную безрецидивную выживаемость пациентов проверялось с помощью графика Каплана – Мейера и логрангового критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование включено 11 пациентов с рецидивом ГБ головного мозга (Grade IV по классификации ВОЗ 2016 г.). Средний возраст пациентов составил 51 год (от 40 до 64 лет). Среди них было пять (45,5 %) мужчин и шесть (54,5 %) женщин. Большинство пациентов находилось в удовлетворительном состоянии: медиана по шкале Карновского – 90 % (от 70 до 100 %). Основные характеристики пациентов (пол, возраст, контрастируемый объем опухоли и пр.) представлены в табл. 1. Период наблюдения после проведения ИБЭБ варьировал от 1 до 30 мес.

У всех пациентов рецидив ГБ наблюдался после комбинированного лечения. Перед включением в исследование резекция опухоли проводилась однократно с последующей адъювантной химиолучевой терапией (фракционная лучевая терапия + темозоломид с последующими поддерживающими циклами темозоламида) у 10 пациентов. При этом средняя продолжительность безрецидивного периода составила 11 мес. (от 6 до 23 мес.). Одна пациентка к моменту включения в исследования дважды подвергалась резекции опухоли. Во время первой резекции опухоли пациентке не проводилась ИБЭБ в связи с отсутствием в нейроонкологической практике данной технологии на тот момент. Продолжительность безрецидивного периода после 2-й операции у данной пациентки составила 9 мес., а продолжи-

Таблица 1

Основные клинические-томографические характеристики пациентов и показатели их выживаемости

Table 1

The main clinical and tomographic characteristics of patients and their survival rates

Номер пациента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Пол	М	Ж	М	М	Ж	Ж	М	Ж	М	Ж	Ж
Возраст, лет	57	40	43	50	62	45	54	49	64	43	57
KPS, баллы	80	90	80	90	90	100	100	100	60	70	60
Локализация	Теменная	Лобная	Лобная	Лобная	Височная	Теменная	Височная	Теменная	Височная	Лобная	Затылочная
Мультифокальный рост	–	–	–	+	+	–	–	+	–	+	+
Объем опухоли, см^3	22	27	31	27	14	18	18	30	40	16	14
IDH1	+	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
Экспрессия Ki-67, %	<10	30–45	60–90	15–60	< 60	< 60	53	54	10–30	6	50
MGMT	н/о	н/о	н/о	н/о	–	+	–	–	–	–	+
Количество перенесенных операций	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Радиотерапия, СОД Гр	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	44,8
Радиотерапия + TMZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Количество циклов TMZ	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	17
Безрецидивный период до ИБЭБ, мес.	8	14	10	6	10	8	11	9	9	11	22,5
КНО, см^3	2	1,5	4,8	7	4,5	0,8	2,5	6,7	5,5	6	1,5
Остаточные мультифокальные очаги	–	–	–	+	+	–	–	+	–	+	+
Объем баллона, см^3	30	70	30	30	80	20	70	120	30	85	20
Длительность ИБЭБ, мин	9	14	7	7,3	17	5,4	15,4	25	8	22	6
Период наблюдения после ИБЭБ, мес.	20	30	7	6,5	4	22,5	14	9	7,5	1	1
Радионекроз, CTCAE grade	2	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–
Локальный безрецидивный период, мес.	–	30	4	6,5	4	–	10	5	5,5	1	1
Начало прогрессирования сопутствующих очагов, мес.	–	–	–	6	1	–	–	2	–	–	–
Статус	Умер	Жив	Умер	Умер	Умер	Жив	Жив	Умер	Умер	Жив	Жив
Непосредственная причина смерти	ТЭЛА	–	Прогрес-сирование ОО	Прогрес-сирование МФО и ОО	Прогрес-сирование МФО и ОО	–	–	Прогрес-сирование МФО	Прогрес-сирование ОО	–	–
ОВ, мес.	28,7	47	17	17	17,5	34,5	27	47	17	–	–

Примечание. KPS – индекс общего состояния по шкале Карновского; н/о – не определялось; IDH1 – наличие мутации R132H гена изоцитратдегидрогеназы-1; MGMT – наличие метилирования гена O^6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы; TMZ – темозоломид; ОО – основной очаг; МФО – мультифокальные очаги.

тельность жизни после постановки диагноза до включения в исследование – 35,5 мес.

У шести пациентов отмечался локальный рецидив опухоли в непосредственной близости от пострезекционной полости без признаков мультифокального роста. В остальных пяти случаях помимо основного очага ГБ отмечался рост опухоли на отдалении от него. Локализация основных очагов опухоли, подвергавшихся резекции, представлена в табл. 1. Среднее значение КНО опухолевого очага, подвергавшегося резекции в сочетании с ИБЭБ, составило 23,3 ± 0,91 см^3 (от 8 до 40 см^3).

Мутация в 132-м кодоне гена *IDH1* методом прямого секвенирования по Сэнгеру выявлена у трех пациентов. Метилирование промотора гена *MGMT* методом бисульфитной модификации ДНК с последующей метил-специфической ПЦР в режиме «реального времени» исследовано у семи пациентов, положительный результат получен только в двух случаях (в одном случае в сочетании с мутацией гена *IDH1*). Результаты исследований индекса пролиферации Ki-67 (MIB-1) и значения КНО основного очага после резекции по каждому пациенту приведены в табл. 1. Средняя продолжительность сеанса ИБЭБ составила 12,36 ± 0,82 мин, средний объем баллона-аппликатора – 53,2 ± 1,8 см^3.

В большинстве случаев развития радионекроза в зоне проведения ИБЭБ не отмечалось, за исключением двух пациентов. У пациента 1 развитие умеренного радионекроза отмечалось на 4-м месяце после ИБЭБ. Однако это не потребовало хирургического вмешательства (CTCAE Grade 2) и ограничилось временным назначением глюкокортикостероидов. Появление и прогрессирование клинико-топографических признаков радионекроза у пациента 6 наблюдались через 5 мес. после ИБЭБ, несмотря на повышение доз глюкокортикостероидов (CTCAE Grade 3), что потребовало хирургического вмешательства (некрэктомия) через 7 мес. после ИБЭБ. Патоморфологическое исследование удаленной некротической ткани не показало признаков опухолевого роста. После проведения некрэктомии состояние пациента стабилизировалось, введение глюкокортикостероидов прекращено.

Из статистического анализа показателей безрецидивной и общей выживаемости исключены пациенты 10 и 11, поскольку период их наблюдения на момент представления рукописи составил только 1 мес. Медиана выживаемости без локального прогрессирования (locPFS) для всей группы пациентов составила 6,5 мес. (от 4 до 30 мес.), в подгруппе пациентов (n = 5) с послеоперационным КНО опухоли >2,5 см^3 – 5,0 мес. (от 4,0 до 6,5 мес.; у трех больных ГБ имела мультифокальный рост), в подгруппе пациентов с ПКНО опухоли ≤2,5 см^3 (n = 4) – 21,2 мес. (от 10 до 30 мес.; случаев с мультифокальным ростом ГБ не было). Лечебные подходы при наличии мультифокальных очагов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Лечебные подходы, примененные к мультифокальным очагам ГБ

Table 2

Therapeutic approaches applied to the multifocal lesions of GBM

Номер пациента	Локализация	Проведенное лечение
4	Лобная (1) и теменная (1) доли правого большого полушария	Резекция очага правой лобной доли с последующими сеансами фракционной конформной лучевой терапии РОД 4,5 Гр, 6 фракций СОД 27 Гр; фракционная конформная лучевая терапии на очаг в правой теменной доле РОД 5 Гр, 6 фракций СОД 30 Гр
5	Правая лобная доля с распространением на валик мозолистого тела (1)	Стереотаксическая конформная фракционная лучевая терапия на очаг глиобластомы правой лобной доли и колена мозолистого тела РОД 2,5 Гр 12 фракций до СОД 30 Гр
8	Валик мозолистого тела (1)	Стереотаксическая конформная фракционная лучевая терапия на очаг в колене мозолистого тела в РОД 8 Гр 3 фракции
10	Зрительный перекрест справа, правый зрительный нерв, медиобазальные отделы правой височной доли	Лечение не проводилось
11	Подушка левого таламуса по краю пострезекционной полости	Сеансы фракционной конформной лучевой терапии на очаг в таламусе РОД 5 Гр, 5 фракций СОД 25 Гр

Примечание. РОД – разовая очаговая доза.

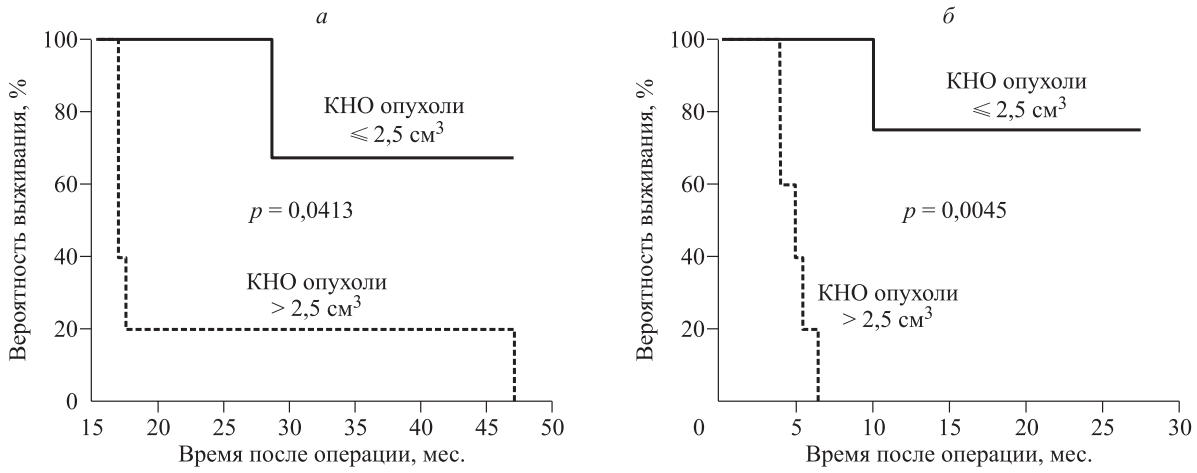

Рис. 3. *Общая выживаемость (а) и локальный безрецидивный период (б) после повторной резекции рецидивных ГБ в сочетании с ИБЭБ*

Fig. 3. *Overall survival (A) and local relapse-free period (b) after re-resection of recurrent GBM in combination with IBEB*

Медиана ОВ для всей группы пациентов (от момента постановки диагноза до смерти или до момента представления рукописи для живых), включенных в анализ показателей выживаемости (n = 9), составила 27 мес. (от 17 до 47 мес.), в подгруппе больных с послеоперационным КНО опухоли >2,5 см^3 – 17 мес. (от 17 до 47 мес.), в подгруппе пациентов с послеоперационным КНО ГБ ≤2,5 см^3 – 30,6 мес. (от 27 до 44 мес.). Быстрое прогрессирование отмечалось у всех пациентов с наличием КНО опухоли >2,5 см^3, несмотря на наличие или отсутствие мультифокального роста опухоли. Кривые локальной безрецидивной и общей выживаемости больных обеих подгрупп после повторной резекции рецидивных ГБ в сочетании с ИБЭБ, построенные по методу Каплана – Майера, приведены на рис. 3.

Пациент 1 умер через 20 мес. после ИБЭБ от тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) без признаков прогрессирования церебральной опухоли. У пациента 3 смерть наступила через 7 мес. после ИБЭБ в результате локального прогрессирования в зоне остаточного пострезекционного объема опухоли (4,8 см^3). У пациентов 4 и 5 смерть наступила через 6,5 мес. после ИБЭБ в результате локального прогрессирования в зоне остаточного пострезекционного объема ГБ (соответственно 7,0 и 4,5 см^3) опухоли, а также очагов на отдалении. Пациент 8 умер через 9,0 мес. после ИБЭБ в результате локального прогрессирования в зоне остаточного пострезекционного объема ГБ (6,7 см^3), а также очагов на отдалении с появлением новых. У пациента 9 смерть наступила через 7,5 мес. после ИБЭБ в результате изолированного локального прогрессирования в зоне остаточного пострезекционного объема (5,5 см^3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемую когорту вошли пациенты преимущественно среднего возраста с первичными (IDH1-wild type) рецидивными супратенториальными ГБ без метилирования промотора гена *MGMT*, находившиеся в удовлетворительном общем состоянии после первого рецидива опухоли и получившие комбинированное лечение согласно международным стандартам. При этом примерно в половине случаев наблюдался мультифокальный рост опухоли. Медиана ОВ для пациентов, включенных в статистический анализ, значительно превышала приводимые в литературных источниках (в пределах 12–15 мес.) [12]. В качестве оценки возможности локального контроля опухоли в зоне ее резекции с применением рассматриваемой в статье технологии особый интерес представляет показатель locPFS, величина которого у пациентов с КНО ГБ ≤2,5 см^3 оказалась достоверно больше, с учетом результатов процедуры Каплана – Мейера, чем в подгруппе с КНО опухоли >2,5 см^3 (рис. 3, *а*), также как и ОВ (рис. 3, *б*).

У пациентов с наличием мультифокальных очагов отмечалась быстрая прогрессия как в зоне повторной резекции и ИБЭБ основного очага, так и самих мультифокальных очагов с появлением новых. Следует отметить, что у этих пациентов объем КНО после резекции превышал условный критический порог в 2,5 см^3.

Время проведения ИБЭБ было непродолжительным и существенно не увеличивало общее время операции. Каких-либо осложнений раннего послеоперационного периода также не наблюдалось. Несмотря на то что все пациенты по-

лучали ранее наружное облучение в суммарной очаговой дозе (СОД) 60 Гр, развитие клинически значимого радионекроза в области проведения ИБЭБ отмечено только у двух пациентов (22 %) в течение первых 6 мес. после проведенного лечения. У этих больных каких-либо явных предикторов возникновения данных лучевых осложнений выявить не удалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные к настоящему времени данные позволяют надеяться на улучшение результатов лечения рецидивных ГБ с использованием рассматриваемого метода. Наиболее перспективными в отношении потенциального ответа на данный способ лечения, с учетом уже имеющихся данных, рассматриваются случаи тотальной резекции локального рецидива опухоли без признаков одновременного мультифокального роста новообразования. Необходим дальнейший набор клинического материала с продолжением исследования эффективности и безопасности повторной резекции в сочетании с интраоперационной баллонной электронной брахитерапией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горяйнов С.А., Гольдберг М.Ф., Голанов А.В., Золотова С.В., Шишкина Л.В., Рыжова М.В., Пицхелаури Д.И., Жуков В.Ю., Усачев Д.Ю., Беляев А.Ю., Кондрашов А.В., Шурхай В.А., Потапов А.А. Феномен длительной выживаемости пациентов с глиобластомами. Часть I: Роль клинико-демографических факторов и мутации IDH1 (R132H). *Вопр. нейрохирургии*. 2017; 81 (3): 5–16. doi: 10.17116/neiro20178135-16.

Goryaynov S.A., Gol'dberg M.F., Golanov A.V., Zolotova S.V., Shishkina L.V., Ryzhova M.V., Pitskhelauri D.I., Zhukov V.Yu., Usachev D.Yu., Belyaev A.Yu., Kondrashov A.V., Shurkhay V.A., Potapov A.A. The phenomenon of long-term survival in glioblastoma patients. Part I: the role of clinical and demographic factors and an IDH1 mutation (R132H). *Voprosy neyrokhirurgii imeni Nikolaya Nikolaevicha Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2017; 81 (3): 5–16. [In Russian]. doi: 10.17116/neiro20178135-16.

2. Кривошапкин А.Л., Сергеев Г.С., Гайтан А.С., Курбатов В.П., Киселев Р.С., Кальнеус Л.Е. Влияние до- и послеоперационных волюмометрических показателей опухоли на продолжительность жизни пациентов с глиобластомами головного мозга. *Вестн. неврологии, психиатрии и нейрохирургии*. 2016; (6): 59–67.

Krivoshapkin A.L., Sergeev G.S., Gaytan A.S., Kurbatov V.P., Kiselev R.S., Kalneus L.E. Impact of pre- and postoperative tumor volumetric data on survival of patiens with glioblastomas. *Vestnik nevrologii, psikhiatrii i neyrokhirurgii = Bulletin of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2016; (6): 59–67. [In Russian].

3. Кривошапкин А.Л., Шайман Л.М., Гайтан А.С., Сергеев Г.С., Абдуллаев О.А., Ислим Н., Мармазеев И.В. Способ лечения рецидива злокачественных глиом головного мозга. Пат. 218110143 РФ; Опубл. 22.03.2018.

Krivoshapkin A.L., Shayman L.M., Gaytan A.S., Sergeev G.S., Abdullaev O.A., Islim N., Marmazeev I.V. A method for the treatment of malignant gliomas of the brain. Patent 2684019 RF; Published 22.03.2018. [In Russian].

4. Салим Н., Кривошапкин А.Л., Гайтан А.С., Мармазеев И.В., Абдуллаев О.А., Сергеев Г.С., Шонус Д.Х. Применение интраоперационной лучевой терапии у пациентов с рецидивирующими глиомами высокой степени злокачественности. *Злокачеств. опухоли*. 2017; 7 (3 S1): 110.

Salim N., Krivoshapkin A.L., Gaytan A.S., Marmazeev I.V., Abdullaev O.A., Sergeev G.S., Schonus D.C. The use of intraoperative radiotherapy in patients with recurrent high-grade gliomas. *J. Malignant Tumors*. 2017; 7 (3): 110. [In Russian].

5. Barney C., Shukla G., Bhamidipati D., Palmer J.D. Re-irradiation for recurrent glioblastoma multiforme. *Chin. Clin. Oncol*. 2017; 6 (4): 36. doi: 10.21037/cco.2017.06.18.

6. D'Amico R.S., Englander Z.K., Canoll P., Bruce J.N. Extent of resection in glioma: A review of the cutting edge. *World Neurosurg*. 2017; 103: 538–549. doi: 10.1016/j.wneu.2017.04.041.

7. Do V., Gebski V., Barton M.B. The effect of waiting for radiotherapy for grade III/IV gliomas. *Radiother. Oncol*. 2000; 57 (2): 131–136.

8. Epstein M.S., Silverstein M.J., Lin K., Kim B., de Leon C., Khan S., Guerra L.E., Snyder L., Coleman C., Lopez J., Mackintosh R., Chen P. Acute and chronic complications in patients with ductal carcinoma in situ treated with intraoperative radiation therapy. *Breast J*. 2016; 22 (6): 630–636. doi: 10.1111/tbj.12650.

9. Giordano F.A., Abo-Madyan Y., Brehmer S., Herskind C., Sperk E., Schneider F., Clausen S., Welzel G., Schmiedek P., Wenz F. Intraoperative radiotherapy (IORT) – a resurrected option for treating glioblastoma? *Transl. Cancer Res*. 2014; 3 (1): 94–105. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2014.01.03.

10. Hervey-Jumper S.L., Berger M.S. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *J. Neurooncol*. 2016; 130 (2): 269–282. doi: 10.1007/s11060-016-2110-4.

11. Johnson D.R., Omuro A.M.P., Ravelo A., Sommer N., Guerin A., Ionescu-Ittu R., Shi S., Macalalad A., Uhm J.H. Overall survival in patients with

glioblastoma before and after bevacizumab approval. *Curr. Med. Res. Opin*. 2018; 34 (5): 813–820. doi: 10.1080/03007995.2017.1392294.

12. Kelly C., Majewska P., Ioannidis S., Raza M.H., Williams M. Estimating progression-free survival in patients with glioblastoma using routinely collected data. *J. Neurooncol*. 2017; 135 (3): 621–627. doi: 10.1007/s11060-017-2619-1.

13. Krivosheya D., Prabhu S.S., Weinberg J.S., Sawaya R. Technical principles in glioma surgery and preoperative considerations. *J. Neurooncol*. 2016; 130 (2): 243–252. doi: 10.1007/s11060-016-2171-4.

14. Rapp M., Baernreuther J., Turowski B., Steiger H.J., Sabel M., Kamp M.A. Recurrence pattern analysis of primary glioblastoma. *World Neurosurg*. 2017; 103: 733–740. doi: 10.1016/j.wneu.2017.04.053.

15. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med*. 2005; 352 (10): 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330.

16. Van Linde M.E., Brahm C.G., de Witt Hamer P.C.3, Reijneveld J.C., Bruynzeel A.M.E., Vandertop W.P., van de Ven P.M.6, Wagemakers M., van der Weide H.L., Enting R.H., Walenkamp A.M.E., Verheul H.M.W. Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme: a retrospective multicenter analysis. *J. Neurooncol*. 2017; 135 (1): 183–192. doi: 10.1007/s11060-017-2564-z.

Сведения об авторах:

Абдуллаев О.А., e-mail: orkhan-ali@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9824-3868
Гайтан А.С., к.м.н., e-mail: lanceter@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1003-0292
Салим Н., к.м.н., e-mail: nsalim@emcmos.ru
Сергеев Г.С., к.м.н., e-mail: dr.gssergeev@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3558-810X
Мармазеев И.В., медицинский физик, imarmazeev@emcmos.ru
Чеснулис Э., д.м.н., проф., e-mail: info@cesnulis.ch
Кривошапкин А.Л., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0789-8039, e-mail: alkr01@yandex.ru

Information about authors:

Abdullaev O.A., e-mail: orkhan-ali@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9824-3868
Gaytan A.S., candidate of medical sciences, e-mail: lanceter@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1003-0292
Salim N., candidate of medical sciences, e-mail: nsalim@emcmos.ru
Sergeev G.S., candidate of medical sciences, e-mail: dr.gssergeev@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3558-810X
Marmazeev I.V., medical physicist, e-mail: imarmazeev@emcmos.ru
Cesnulis E., doctor of medical sciences, professor, e-mail: info@cesnulis.ch
Krivoshapkin A.L., doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0789-8039, e-mail: alkr01@yandex.ru

УДК 616-008.9-055.1-056.52-073.175/176.7 DOI: 10.15372/SSMJ20190414

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МАРКЕРОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИСЦЕРАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ У МУЖЧИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Денис Андреевич ДЕЕВ, Борис Борисович ПИНХАСОВ, Вера Георгиевна СЕЛЯТИЦКАЯ, Татьяна Рэмоновна МАЦИЕВСКАЯ, Ираида Георгиевна МОХОВА

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

Цель исследования – проведение сравнительной количественной оценки суррогатных маркеров выявления висцерального ожирения и их связи с выраженностью клинико-биохимических и гормональных нарушений у мужчин с метаболическим синдромом на фоне ожирения. **Материал и методы.** Обследовано 136 мужчин – пациентов терапевтической клиники, в возрасте от 23 до 68 лет; проведено общеклиническое, антропометрическое, биохимическое и гормональное обследование, а также эхокардиография. Для выявления метаболического синдрома применяли критерии Консенсуса международных экспертов в областях кардиологии и эндокринологии 2009 г. **Результаты и их обсуждение.** Показано, что среди всех исследованных суррогатных маркеров висцерального ожирения (окружность талии; окружность талии в положении лежа; окружность талии без толщины подкожной жировой ткани; отношение окружности талии к окружности бедер; сагиттальный абдоминальный диаметр; толщина эпикардиальной жировой ткани) наибольшее количество статистически значимых корреляционных связей с клинико-биохимическими, гормональными и адипокиновыми характеристиками мужчин выявлено для окружности талии, измеренной в положении лежа, и окружности талии, измеренной без толщины подкожной жировой ткани. Промежуточную позицию среди оцениваемых маркеров занимал показатель окружность талии в положении стоя. Меньшее количество корреляционных связей обнаружено для толщины эпикардиального жира, сагиттального абдоминального диаметра и отношения окружности талии к окружности бедер. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют об объективности выбора использованных в работе суррогатных маркеров выраженности висцерального ожирения, среди которых наибольшей эффективностью обладает показатель окружности талии, измеренной лежа.

Ключевые слова: мужчины, висцеральное ожирение, метаболический синдром, окружность талии, отношение окружности талии к окружности бедер, толщина эпикардиального жира.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие возможного конфликта интересов.

Автор для переписки: Пинхасов Б.Б., e-mail: pin@centercem.ru

Для цитирования: Деев Д.А., Пинхасов Б.Б., Селятицкая В.Г., Мациевская Т.Р., Мохова И.Г. Сравнительный анализ эффективности маркеров выявления висцерального ожирения у мужчин с метаболическим синдромом. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 110–118. doi: 10.15372/SSMJ20190414.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MARKERS EFFICIENCY OF VISCERAL OBESITY DETECTION IN MEN WITH METABOLIC SYNDROME

Denis Andreevich DEEV, Boris Borisovich PINKHASOV, Vera Georgievna SELYATITSKAYA, Tatyana Remonovna MATSIEVSKAYA, Iraida Georgievna MOKHOVA

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

The purpose of the study was to carry out comparative and quantitative assessment of surrogate markers of visceral obesity and their connection with the severity of clinical, biochemical and hormonal disorders in men with the metabolic syndrome and obesity. **Material and methods.** 136 men, aged from 23 to 68 years, who were patients of therapeutic clinic were observed. Clinical, anthropometric, biochemical and hormonal screening was taken. Transthoracic echocardiography was performed in all patients. Criteria of international experts' consensus in the fields of cardiology and endocrinology (2009) were used to identify metabolic syndrome. **Results and discussion.** It was shown that among

the all surrogate markers of visceral obesity (waist circumference; waist circumference measured in the lying position; waist circumference measured without the thickness of the subcutaneous tissue; the ratio of waist circumference to the circumference of the hips; sagittal abdominal diameter; thickness of epicardial adipose tissue) the largest number of statistically significant correlations with the clinical-biochemical, hormonal and adipokine characteristics of men was found for the waist circumference, measured in the lying position, and the waist circumference, measured without the thickness of the subcutaneous tissue. Intermediate position among the estimated markers was taken by a waist circumference measured in a standing position. Fewer number of correlation connections were revealed for thickness of the epicardial fat, sagittal abdominal diameter and the ratio of waist circumference to the circumference of the hips. **Conclusion.** The received results demonstrate objectivity of the selection of the surrogate markers of the severity of visceral obesity reviewed in the study, among which the waist circumference measured in the lying position had the greatest efficiency.

Key words: men, visceral obesity, metabolic syndrome, waist circumference, waist to hip circumference ratio, epicardial fat thickness.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Pinkhasov B.B., e-mail: pin@centercem.ru

Citation: Deev D.A., Pinkhasov B.B., Selyatitskaya V.G., Matsievskaya T.R., Mokhova I.G. Comparative analysis of markers efficiency of visceral obesity detection in men with metabolic syndrome. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 110–118. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190414.

Кардиометаболический риск в высокой степени ассоциирован с накоплением висцеральной жировой ткани в абдоминальной области [1, 7, 15]. Точное определение количества висцерального жира требует применения дорогостоящих методов исследования, таких как магнитно-резонансная и компьютерная томография [25]. В то же время в эпидемиологических исследованиях и в медицинской практике широко используется ряд суррогатных маркеров наличия и выраженности висцерального ожирения, в частности, антропометрических, таких как окружность талии (ОТ), отношение окружности талии к окружности бедер (ОТ/ОБ), сагиттальный абдоминальный диаметр [2, 3, 10, 16, 18, 26, 28]. Эти показатели используются и в качестве маркеров метаболических нарушений, отражающих активность висцерального жира [16, 22, 26].

Величина ОТ в качестве показателя абдоминального ожирения входит в перечень критериев выявления метаболического синдрома (МС), который представляет собой кластер модифицируемых кардиометаболических факторов риска развития сахарного диабета 2 типа, ишемической болезни сердца и других форм сердечно-сосудистых заболеваний [16, 22]. При антропометрических измерениях иногда для повышения точности измерения ОТ используют измерение ОТ в положении лежа. Данный способ наиболее информативен при выраженном ожирении, когда жировая ткань в абдоминальной области начинает обвисать и затрудняет измерение окружности талии в положении стоя [9]. При измерении ОТ одновременно с висцеральным жиром оценивается и количество подкожной жировой клетчатки, что приводит к необходимости разработки подходов к уменьшению связанной с ней погрешности при оценке выраженности висцерального ожирения с помощью ОТ [22].

Величину отношения ОТ/ОБ в Национальных клинических рекомендациях 2017 г. по диагностике, лечению и профилактике ожирения предлагают использовать для определения метаболически здорового и нездорового фенотипов ожирения [14]. Сагиттальный абдоминальный диаметр также используется исследователями в качестве маркера висцерального ожирения при оценке кардиоваскулярного риска [2].

В последние годы в качестве маркера висцерального ожирения предложено измерение толщины эпикардиального жира (ЭЖ), определяемой при эхокардиографическом исследовании. В ЭЖ синтезируются те же адипокины и цитокины: лептин, адипонектин, резистин, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, что и в висцеральной жировой ткани абдоминальной полости [5, 6, 21, 27]. В ряде работ показано, что увеличение толщины ЭЖ является значимым предиктором атеросклероза коронарных артерий, ИБС и сахарного диабета 2 типа [5, 13, 19, 20]. При этом четких граничных критериев для данного показателя пока не предложено, а имеющиеся литературные сведения о толщине ЭЖ, полученные на разных контингентах здоровых лиц и пациентов с сердечно-сосудистой патологией, различаются. Одной из причин могут быть технические возможности используемых для эхокардиографии аппаратов.

Несмотря на необходимость доступного и объективного метода определения выраженности висцерального ожирения для прогнозирования и

ранней диагностики кардиометаболического риска, сравнительных исследований эффективности использования с этой целью указанных суррогатных критериев крайне мало.

Целью работы было проведение сравнительной количественной оценки суррогатных маркеров выявления висцерального ожирения и их связи с выраженностью клинико-биохимических и гормональных нарушений у мужчин с метаболическим синдромом на фоне ожирения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 136 мужчин в возрасте от 23 до 68 лет (средний возраст 50,5 ± 9,6 года), проходивших обследование и лечение в терапевтической клинике НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск). Пациенты имели в качестве основного диагноза заболевания сердечно-сосудистой системы (гипертоническую болезнь, ИБС, нарушения ритма) и были включены в исследование методом случайной последовательной выборки. Критериями исключения были злокачественные новообразования в анамнезе; острые нарушения мозгового и коронарного кровообращения; органические заболевания ЦНС; острые гепатиты в стадии обострения; хроническая печеночная и почечная недостаточности; гнойные и деструктивные воспалительные процессы любой локализации. Проведение исследования было одобрено локальным Комитетом по биомедицинской этике (протокол № 9 от 06.05.2019), оно соответствовало этическим стандартам, разработанным в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и приказами Минздрава РФ. С пациентами проводили беседу, объясняя цель и задачи исследования; от каждого было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Пациентам было проведено общеклиническое обследование с измерением систолического (САД) и диастолического артериального давления (ДАД); антропометрическое обследование, включающее определение массы тела, роста стоя, ОТ в положении стоя путем наложения сантиметровой ленты на середине между гребнем подвздошных костей и нижним краем ребер, ОТ в положении лежа (ОТл) путем наложения сантиметровой ленты между теми же анатомическими ориентирами, ОТ в положении стоя без учета толщины подкожной жировой клетчатки (ОТбпжк). Для этого на уровне измерения ОТ калипером определяли толщину подкожной жировой клетчатки (ТПЖК) в двух местах – по средней линии живота (СЛЖ) и по средней аксилярной линии справа (САЛ), складку измеряли в вертикальном положении; ОТбпжк рассчитывали по формуле ОТ – [($ТПЖК_{СЛЖ}$ + $ТПЖК_{САЛ}$)/2 × 3,14]. Измеряли ОБ в положении стоя на уровне вертельных бугров, а также сагиттальный абдоминальный диаметр. Сагиттальный абдоминальный диаметр измеряли у пациента, лежащего на спине с согнутыми коленями, с использованием кронциркуля. Определяли расстояние между ножками кронциркуля у позвоночного столба на уровне L5-L4 и поверхностью передней брюшной стенки.

Измеряли толщину эпикардиального жира (ТЭЖ) за передней стенкой правого желудочка в В-режиме с использованием парастернальной позиции по длинной оси левого желудочка в конце систолы по линии, максимально возможно перпендикулярной аортальному кольцу, которое использовали как анатомический ориентир. Измерения проводили в течение трех сердечных циклов с определением среднего значения из трех последовательных величин**.** Эпикардиальный жир визуализировали как эхонегативное пространство между внешней стенкой миокарда и висцеральным слоем перикарда. Эхокардиографию выполняли на аппарате «Vivid» E9 («GE», США) с использованием матричного секторного датчика M5S (1.5–4.6 МГц) с синхронизацией ЭКГ в стандартных эхографических позициях.

Относительное (Жир, %) и абсолютное (Жир, кг) содержание жира в организме определяли методом импедансометрии с использованием прибора фирмы «OMRON» (Япония).

В сыворотке крови, взятой в утреннее время натощак, определяли уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов (ТГ) колориметрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab 30i» («Thermo Electron», Финляндия). Содержание глюкозы в капиллярной крови определяли с использованием ферментативного метода на анализаторе «Photometer 5010» («Boehringer Mannheim», Германия). Концентарцию в сыворотке крови иммунореактивного инсулина (ИРИ), адипонектина и лептина измеряли иммуноферментным методом на анализаторе «Access 2» («Beckman Coulter», США) с использованием коммерческих наборов.

На основании полученных параметров рассчитывали индекс массы тела (ИМТ) как отношение МТ к росту в квадрате (кг/м^2) и отношение ОТ/ОБ. Индекс висцерального ожирения VAI вычисляли по формуле для мужчин: VAI = [ОТ/39,68 + (1,88 × ИМТ)] × (ТГ/1,03) × × (1,31/ЛПВП) [17]. Индекс инсулинорезистент-

ности HOMA-IR рассчитывали по формуле: HOMA-IR = (ИРИ × глюкоза)/22,5.

Для выявления МС и определения частоты встречаемости его компонентов у обследованных пациентов применяли критерии Консенсуса международных экспертов в областях кардиологии и эндокринологии 2009 г. [16]. По результатам обследования пациенты были разделены на три группы: группа 1 – мужчины с нормальной массой тела без МС (n = 16); группа 2 – мужчины с избыточной массой тела и ожирением без МС (n = 33); группа 3 – мужчины с избыточной массой тела, ожирением и МС (n = 87).

Результаты в таблицах и тексте представлены в виде средней арифметической величины показателя и стандартного отклонения ($M \pm SD$) или частоты случаев в %. Для оценки различий использовали непараметрические критерии Крускала – Уоллиса и Манна – Уитни, для характеристики зависимости параметров применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Минимальную вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5%-м уровне значимости ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациенты из группы 3 имели достоверно большие величины антропометрических показателей, характеризующих относительное и абсолютное количество жировой ткани, а также ОТ, ОТл, ОТбпжк, ОТ/ОБ и сагиттальный абдоминальный диаметр, относительно пациентов из группы 2 с избыточной массой тела и ожирением, но без МС, и пациентов из группы 1 с нормальной массой тела (табл. 1).

Анализ клинико-биохимических и гормональных показателей также выявил изменения, характерные для МС. С ростом ИМТ и выраженности висцерального ожирения нарушения углеводно-жирового обмена усиливались. В связи с тем, что у многих пациентов, особенно из группы 3,

Таблица 1

Антропометрическая, клиническая и гормонально-метаболическая характеристики пациентов разных групп

Table 1

Anthropometric, clinical and hormone-metabolic characteristics of the patients from different groups

Показатель	Группа 1, n = 16	Группа 2, n = 33	Группа 3, n = 87	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
Возраст, лет	45,4±11,3	49,7±9,9	51,7±8,9	0,196	0,043	0,357
Рост стоя, см	174,8±5,7	174,7±5,6	174,9±7,4	0,765	0,830	0,642
Масса тела, кг	68,9±7,2	88,9±8,9	100,9±16,3	0,000	0,000	0,000
Индекс массы тела, кг/м^2	22,5 ± 1,5	29,2 ± 2,9	33,0 ± 5,6	0,000	0,000	0,000
Жир, %	19,0 ± 6,0	27,2 ± 4,2	30,7 ± 5,3	0,000	0,000	0,000
Жир, кг	14,0 ± 5,9	24,7 ± 5,9	31,2 ± 10,0	0,000	0,000	0,000
ОТ, см	82,8 ± 7,0	100,9 ± 8,8	110,2 ± 10,7	0,000	0,000	0,000
$ОТ_{д}$, см	76,8 ± 4,9	95,9 ± 7,4	105,6 ± 10,8	0,000	0,000	0,000
$ОТ_{бпжк}$, см	76,0 ± 4,4	88,9 ± 6,4	97,2 ± 8,8	0,000	0,000	0,001
ОБ, см	89,6 ± 5,2	100,1 ± 5,7	103,2 ± 9,0	0,000	0,000	0,057
ОТ/ОБ	0,93 ± 0,06	1,01 ± 0,07	1,07 ± 0,09	0,001	0,000	0,000
Сагиттальный абдоминальный диаметр, см	22,5 ± 6,1	32,1 ± 6,5	36,4 ± 5,0	0,000	0,000	0,013
САД, мм рт. ст.	143 ± 31	144 ± 26	163 ± 27	0,904	0,027	0,001
ДАД, мм рт. ст.	85 ± 10	87 ± 11	95 ± 13	0,572	0,004	0,002
Содержание глюкозы, ммоль/л	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,5	6,7 ± 2,0	0,354	0,000	0,000
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л,	1,35 ± 0,32	1,31 ± 0,22	1,25 ± 0,25	0,915	0,472	0,218
Содержание триглицеридов, ммоль/л	1,2 ± 0,7	1,7 ± 1,1	2,5 ± 1,3	0,015	0,000	0,000
Содержание инсулина, мЕ/л	5,3 ± 3,0	8,0 ± 3,1	16,2 ± 10,1	0,142	0,009	0,009
Индекс инсулинрезистентности HOMA, у.е.	1,2 ± 0,7	1,9 ± 0,7	5,0 ± 3,5	0,105	0,005	0,003
Содержание адипонектина, нг/мл	11,6 ± 6,8	12,1 ± 6,9	7,0 ± 3,4	0,846	0,059	0,006
Содержание лептина, нг/мл	5,7 ± 4,8	9,3 ± 13,3	18,5 ± 14,8	0,308	0,003	0,001
VAI, у.е.	1,2 ± 0,8	1,8 ± 1,2	2,8 ± 1,6	0,029	0,000	0,000

Таблица 2

Характеристика показателей ультразвукового исследования сердца у пациентов разных групп

Table 2

Characteristics of heart ultrasound indicators in the patients from different groups

Показатель	Группа 1, *n* = 16	Группа 2, *n* = 33	Группа 3, *n* = 87	Р 1-2	Р 1-3	Р 2-3
Конечный диастолический размер, см	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,4	0,284	0,284	0,993
Конечный систолический размер, см	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,5	0,180	0,180	0,911
Толщина задней стенки левого желудочка, см	1,00 ± 0,13	1,05 ± 0,15	1,12 ± 0,16	0,010	0,010	0,043
Толщина межжелудочковой перегородки, см	1,10 ± 0,15	1,16 ± 0,16	1,25 ± 0,21	0,002	0,002	0,018
Толщина стенки правого желудочка, см	2,16 ± 0,17	2,20 ± 0,20	2,26 ± 0,23	0,120	0,120	0,233
Фракция выброса, %	70,3 ± 4,1	68,3 ± 5,8	67,4 ± 7,9	0,331	0,331	0,874
Фракция укорочения, %	43,2 ± 15,1	38,5 ± 4,6	38,0 ± 5,7	0,290	0,290	0,844
Конечный диастолический объем, мл	118,9 ± 16,9	121,0 ± 17,6	122,8 ± 20,8	0,594	0,594	0,895
Ударный объем, мл	82,4 ± 10,9	81,9 ± 11,7	80,9 ± 14,0	0,475	0,475	0,558
Конечный систолический объем, мл	36,7 ± 9,6	39,0 ± 11,6	42,0 ± 18,2	0,336	0,336	0,830
Индекс массы миокарда левого желудочка	124,1 ± 25,4	125,0 ± 29,2	131,6 ± 35,5	0,426	0,426	0,448
ТЭЖ, мм	2,4 ± 1,4	3,3 ± 1,2	4,5 ± 1,7	0,023	0,000	0,000

проводилась гиполипидемическая терапия, различия по уровню ХС ЛПВП в исследуемых группах отсутствовали (см. табл. 1). Известно, что в основе МС лежит гиперинсулинемия и инсулинрезистентность [11, 14]. В проведенном исследовании увеличение содержания ИРИ и величины индекса инсулинрезистентности HOMA-IR отчетливо прослеживалось от группы 1 к группе 3 (см. табл. 1). Относительно ключевых адипокинов, синтезируемых жировой тканью, выявлено, что с ростом ИМТ увеличивался уровень лептина и снижалась концентрация адипонектина в сыворотке крови.

Таким образом, полученные результаты отражают известную картину развития МС, когда по мере увеличения массы тела преимущественно за счет увеличения количества и активности висцеральной жировой ткани начинают проявляться и нарастать нарушения углеводно-жирового обмена [8, 12].

Анализ показателей эхокардиографии выявил лишь достоверное увеличение толщины стенок левого желудочка у мужчин в группах 2 и 3 относительно мужчин из группы 1 и у мужчин группы 3 относительно мужчин из группы 2 (табл. 2). Выявленные изменения в большей степени являются отражением уровня и продолжительности артериальной гипертензии у обследованных пациентов. Толщина ЭЖ от группы 1 к группе 3 также увеличивалась (см. табл. 2), аналогично тому, как повышались величины и других маркеров висцерального ожирения у мужчин в исследуемых группах, таких как ОТ, ОТл, ОТбпжк, ОТ/ОБ, сагиттальный абдоминальный диаметр (см. табл. 1).

Для характеристики связей суррогатных маркеров висцерального ожирения с гормонально-метаболическими нарушениями был проведен корреляционный анализ между величинами соответствующих показателей у мужчин в группе 3, поскольку у них метаболические нарушения были выражены в большей степени, чем у мужчин двух других групп (табл. 3). Оказалось, что наиболее высокие коэффициенты корреляции и наибольшее количество статистически значимых корреляционных связей с клинико-биохимическими и гормональными параметрами проявили два маркера, а именно ОТл (семь связей из 11 возможных) и ОТбпжк (шесть связей). Промежуточную позицию среди оцениваемых маркеров занимал показатель ОТ в положении стоя (пять связей). Меньшее количество корреляционных связей выявлено для ТЭЖ (три связи), сагиттального абдоминального диаметра (три связи) и отношения ОТ/ОБ (две связи).

Корреляционный анализ также позволил выделить показатели, которые имели достоверные корреляционные связи практически с каждым из анализируемых маркеров висцерального ожирения, а именно уровень глюкозы в крови и САД.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сведения из научной и медицинской литературы ясно показывают, что с количеством и активностью висцеральной жировой ткани в аб-

Таблица 3

Корреляционный анализ величин маркеров висцерального ожирения с клиническими и гормонально-метаболическими показателями у мужчин группы 3 с метаболическим синдромом и ожирением, r (p)

Table 3

Correlation analysis of surrogate markers of visceral obesity with clinical and hormone-metabolic indicators in men with metabolic syndrome and obesity (the 3 group)

Показатель	ОТ	ОТл	ОТбпжк	ОТ/ОБ	Сагиттальный абдоминальный диаметр	ТЭЖ
САД	**0,29** (0,006)	**0,32** (0,011)	**0,34** (0,008)	0,14 (0,186)	**0,34** (0,007)	**0,28** (0,009)
ДАД	0,03 (0,802)	0,05 (0,722)	0,03 (0,810)	0,10 (0,336)	0,07 (0,605)	0,17 (0,121)
Содержание глюкозы	**0,22** (0,037)	0,24 (0,062)	0,23 (0,079)	**0,23** (0,029)	**0,26** (0,040)	**0,31** (0,030)
Содержание ХС ЛПВП	**–0,24** (0,028)	**–0,30** 0,017	**–0,26** (0,043)	–0,20 (0,066)	–0,07 (0,586)	–0,06 (0,573)
Содержание триглицеридов	0,19 (0,076)	0,19 (0,147)	**0,28** (0,031)	**0,26** (0,016)	0,22 (0,081)	**0,29** (0,006)
Содержание инсулина	0,23 (0,196)	**0,52** (0,033)	0,36 (0,158)	0,16 (0,353)	0,11 (0,662)	0,02 (0,898)
Индекс инсулинрезистентности HOMA	0,24 (0,178)	**0,48** (0,049)	0,30 (0,239)	0,21 (0,225)	0,18 (0,491)	0,08 (0,633)
Содержание адипонектина	–0,24 (0,155)	–0,35 (0,118)	**–0,43** (0,050)	–0,16 (0,351)	–0,10 (0,671)	–0,12 (0,503)
Содержание лептина	**0,39** (0,008)	**0,41** (0,035)	0,34 (0,092)	0,21 (0,157)	**0,43** (0,027)	–0,01 (0,949)
Гипертрофия задней стенки левого желудочка	**0,23** (0,035)	**0,38** (0,002)	**0,42** (0,001)	0,06 (0,596)	0,20 (0,121)	0,10 (0,343)
Гипертрофия межжелудочковой перегородки	0,20 (0,065)	**0,33** (0,010)	**0,34** (0,007)	0,17 (0,119)	0,10 (0,451)	0,17 (0,105)
Количество статистически значимых корреляционных связей	5	7	6	2	3	3

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляционные связи.

доминальной области связаны негативные метаболические нарушения у мужчин и женщин с ожирением [14, 16, 26]. Именно эти данные выводят суррогатный показатель ОТ на лидирующие позиции для выявления абдоминального ожирения, которое в свою очередь является обязательным компонентом метаболического синдрома. Однако погрешности при измерении ОТ у лиц с ожирением 3-й степени и морбидным ожирением снижают диагностическую значимость этого показателя, на что прямо указывают полученные нами результаты о больших количестве и силы корреляционных связей с метаболическими нарушениями величины не ОТ, а ОТл и ОТбпжк. Однако для измерения ОТбпжк требуются две дополнительные процедуры, что удорожает процедуру обследования, а для измерения ОТл этого осложняющего момента нет. Следовательно, показатель ОТл наиболее эффективно из всех исследованных в работе суррогатных показателей может характеризовать выраженность висцерального ожирения.

Показатель ОТ/ОБ, который показал наиболее низкую эффективность определения выраженности висцерального ожирения, используется в основном для разделения мужчин и женщин на группы с разными типами распределения жировой ткани – верхним (абдоминальным) и нижним (подкожным); границей для этого распределения для мужчин является величина 0,95 условных единиц [26]. Верхний и нижний типы распределения жира ассоциированы с высоким и низким рисками развития метаболических нарушений и, соответственно, сердечно-сосудистых заболева-

ний и сахарного диабета 2 типа [14]. В группе 3 у обследованных нами мужчин средняя величина показателя ОТ/ОБ равнялась 1,07 (см. табл. 1), а число мужчин в этой группе с величиной ОТ/ОБ менее 0,95 составило всего 3 из 87 человек. Таким образом, практически все мужчины в этой группе оказались с верхним типом распределения жира, что привело к потере эффективности показателя ОТ/ОБ.

Исследования последних лет показали, что толщина ЭЖ имеет прямую связь с развитием коронарного атеросклероза, а в сочетании с другими признаками повышение толщины ЭЖ указывает на развитие инсулинрезистентности и сахарного диабета 2 типа [4–6]. В работе О.М. Драпкиной и соавт. были определены значимые корреляционные связи между толщиной ЭЖ и величинами биохимических показателей, что подтверждает ассоциацию накопления ЭЖ с гормонально-метаболическими нарушениями [5]. В проведенном исследовании показано, что количество достоверных корреляционных связей ТЭЖ с величинами исследуемых показателей меньше по сравнению с ОТ (см. табл. 2). Поскольку количество ЭЖ существенно уступает количеству внутриабдоминальной висцеральной жировой ткани, можно предполагать, что избыточное накопление ЭЖ не будет оказывать выраженного системного действия на организм. ЭЖ имеет преимущественно локальное паракринное действие, которое наиболее явно ассоциировано с развитием и прогрессированием атеросклероза в коронарных артериях [23, 24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Два показателя, а именно САД и уровень глюкозы в крови, имели достоверные прямые корреляционные связи практически со всеми суррогатными маркерами висцерального ожирения. Прямые корреляционные связи с уровнем САД подтверждают, что исследуемые суррогатные маркеры ассоциированы с кардиометаболическим риском, а корреляционные связи с уровнем глюкозы – что в основе патогенеза МС лежит инсулинрезистентность. Наличие прямых корреляционных связей величин измеренных суррогатных маркеров с уровнем лептина и обратных с уровнем адипонектина соответствует современным представлениям о роли этих адипокинов в генезе заболеваний, ассоциированных с висцеральным ожирением [21, 27], и подчеркивает объективность выбора использованных в работе суррогатных маркеров выраженности висцерального ожирения, среди которых наибольшей эффективностью обладает показатель ОТл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселовская Н.Г., Чумакова Г.А., Шенкова Н.Н., Осипова Е.С., Гриценко О.В. Модель прогнозирования риска коронарного атеросклероза у пациентов с висцеральным ожирением. *Рос. кардиол. журн*. 2015; 20 (4): 49–54.

Veselovskaya N.G., Chumakova G.A., Shenkova N.N., Osipova E.S., Gritsenko O.V. Model for predicting of the risk of coronary atherosclerosis in patients with visceral obesity. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2015; 20 (4): 49–54. [In Russian].

2. Воробьева Е.Н., Воробьев Р.И., Шарлаева Е.А., Фомичева М.Л., Соколова Г.Г., Казызаева А.С., Батанина И.А. Сагиттальный диаметр как маркер коронарного риска. *Acta Biol. Sib*. 2015; 1 (1-2): 38–50.

Vorobyeva E.N., Vorobyev R.I., Sharlayeva E.A., Fomicheva M.L., Sokolova G.G., Kazyzayeva A.S., Batanina I.A. Sagittal diameter as a coronary risk marker. *Acta Biol. Sib*. 2015; 1 (1-2): 38–50. [In Russian].

3. Воробьева Е.Н., Осипова И.В., Веселовская П.Г., Мордвинова П.П., Воробьев Р.И. Методы диагностики абдоминального ожирения в клинической практике. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2006; 5 (8): 74–78.

Vorobyeva E.N., Osipova I.V., Veselovskaya N.G., Mordvinova N.I., Vorobyev R.I. Abdominal obesity diagnostics in clinical practice. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2006; 5 (8): 74–78. [In Russian].

4. Драпкина О.М., Корнеева О.Н., Ивашкин В.Т. Способ диагностики инсулинорезистентности. Пат. 2553943 РФ; Опубл. 27.05.2014.

Drapkina O.M., Korneyeva O.N., Ivashkin V.T. Method for the diagnosis of insulin resistance. Patent 2553943 RF; Published 27.05.2014. [In Russian].

5. Драпкина О.М., Шепель Р.Н., Деева Т.А. Толщина эпикардиального жира – «визитная карточка» метаболического синдрома. *Ожирение и метаболизм*. 2018; 15 (2): 29–34.

Drapkina O.M., Shepel R.N., Deyeva T.A. Thickness of epikardialny fat – «business card» of a metabolic syndrome. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism*. 2018; 15 (2): 29–34. [In Russian].

6. Дружилов М.А., Кузнецова Т.Ю. Толщина эпикардиального жира как инструмент прогнозирования неосложненного ожирения. *Journal of Biomedical Technologies*. 2015; 2: 49–58.

Druzhilov M.A., Kuznetsova T.Yu. Epicardial fat thickness as a tool for predicting uncomplicated obesity. *Journal of Biomedical Technologies*. 2015; (2): 49–58. [In Russian].

7. Кологривова И.В., Винницкая И.В., Кошельская О.А., Суслова Т.Е. Висцеральное ожирение и кардиометаболический риск: особенности гормо-

нальной и иммунной регуляции. *Ожирение и метаболизм*. 2017; 14 (3): 3–10.

Kologrivova I.V., Vinnitskaya I.V., Koshelskaya O.A., Suslova T.E. Visceral obesity and cardiometabolic risk: features of hormonal and immune regulation. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism*. 2017; 14 (3): 3–10. [In Russian].

8. Лутов Ю.В., Васильева О.В., Новикова Е.Г., Селятицкая В.Г. Взаимосвязь метаболического синдрома и его компонентов с инсулинорезистентностью и дисфункцией висцеральной жировой ткани у мужчин. *Соврем. пробл. науки и образования*. 2017; (3): 48.

Lutov Yu.V., Vasilyeva O.V., Novikova E.G., Selyatitskaya V.G. The relationship of metabolic syndrome and its components with insulin resistance and dysfunction of visceral adipose tissue in men. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2017; (3): 48. [In Russian].

9. Методы исследования нутритивного статуса у детей и подростков: учебное пособие. Ред. В.П. Новикова, В.В. Юрьев. СПб.: СпецЛит, 2014. 143 с.

Research methods of nutritional status in children and teenagers: manual. Eds. V.P. Novikova, V.V. Yuryev. Saint-Petersburg: SpetsLit, 2014. 143 p. [In Russian].

10. Ожирение (клинические очерки). Ред. А.Ю. Барановский, Н.В. Ворохобина. СПб.: Невский Диалект, 2007. 240 с.

Obesity (clinical essays). Eds. A.Yu. Baranovskiy, N.V. Vorokhobina. Saint-Petersburg: Nevsky Dialect, 2007. 240 p. [In Russian].

11. Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты. Ред. И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. 456 с.

Obesity: etiology, pathogenesis, clinical aspects Eds. I.I. Dedov, G.A. Melnichenko. Moscow: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo, 2006. 456 p. [In Russian].

12. Сумин А.Н., Безденежных Н.А., Федорова Н.В., Безденежных А.В., Индукаева Е.В., Артамонова Г.В. Взаимосвязь висцерального ожирения и сердечно-лодыжечного сосудистого индекса с нарушениями углеводного обмена по данным исследования ЭССЕ – РФ в регионе Западной Сибири. *Клин. медицина*. 2018; 96 (2): 137–146.

Sumin A.N., Bezdenezhnykh N.A., Fedorova N.V., Bezdenezhnykh A.V., Indukayeva E.V., Artamonova G.V. Interrelation of visceral obesity and cardiovascular vascular index with impaired carbohydrate metabolism according to the ESSE-RF study in the region of Western Siberia. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*. 2018; 96 (2): 137–146. [In Russian].

13. Чумакова Г.А., Веселовская Н.Г., Гриценко О.В., Козаренко А.А., Субботин Е.А. Эпикардиальное ожирение как фактор риска коронарного атеросклероза. *Кардиология*. 2013; 53 (1): 51–55.

Chumakova G.A., Veselovskaya N.G., Gritsenko O.V., Kozarenko A.A., Subbotin E.A. Epicardial obesity as a risk factor for coronary atherosclerosis. *Kardiologiya = Cardiology*. 2013; 53 (1): 51–55. [In Russian].

14. Шляхто Е.В., Недогода С.В., Конради А.О., Баранова Е.И., Фомин В.В., Верткин А.Л., Чумакова Г.А. Концепция новых национальных клинических рекомендаций по ожирению. *Рос. кардиол. журн*. 2016; (4): 7–13.

Shlyakhto E.V., Nedogoda S.V., Konradi A.O., Baranova E.I., Fomin V.V., Vertkin A.L., Chumakova G.A. The concept of novel national clinical guidelines on obesity. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2016; (4): 7–13. [In Russian].

15. Abraham T.M., Pedley A., Massaro J.M., Hoffmann U., Fox C.S. Association between visceral and subcutaneous adipose depots and incident cardiovascular disease risk factors. *Circulation*. 2015; 132 (17): 1639–1647.

16. Alberti K.G.M.M., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.-Ch., James W.Ph.T., Loria C.M., Smith S.C. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; Hational Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint Interim statement of the International Diabetes Federation taskforce on epidemiology and prevention; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120: 1640–1645.

17. Amato M.C., Giordano C., Galia M., Criscimanna A., Vitabile S., Midiri M., Galluzzo A. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*. 2010; 33 (4): 920–922.

18. Hsieh S.D., Ashwell M. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int. J. Food Sci. Nutr*. 2005; 56 (5): 303–307.

19. Jeong J.W., Jeong M.H., Yun K.H., Oh S.K., Park E.M., Kim Y.K., Rhee S.J., Lee E.M., Lee J., Yoo N.J., Kim N.H., Park J.C. Echocardiographic epicardial fat thickness and coronary artery disease. *Circ. J*. 2007; 71: 536–539.

20. Kang J., Kim Y.C., Park J.J., Kim S., Kang S.H., Cho Y.J., Yoon Y.E., Oh I.Y., Yoon C.H., Suh J.W., Cho Y.S., Youn T.J., Chae I.H., Choi D.J. Increased epicardial adipose tissue thickness is a predictor of new-onset diabetes mellitus in patients with coronary artery disease treated with high-intensity statins. *Cardiovasc. Diabetol*. 2018; 17 (1): 10.

21. Karastergiou K., Evans I., Ogston N., Miheisi N., Nair D., Kaski J.C., Jahangiri M., Mohamed-Ali V. Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2010; 30: 1340–1346.

22. Klein S., Allison D.B., Heymsfield S.B., Kelley D.E., Leibel R.L., Nonas C., Kahn R. Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: a Consensus Statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Obesity* (*Silver Spring*). 2007; 15 (5): 1061–1067.

23. Natale F., Tedesco M.A., Mocerino R., de Simone V., di Marco G.M., Aronne L., Credendino M., Siniscalchi C., Calabrò P., Cotrufo M., Calabrò R. Visceral adiposity and arterial stiffness: echocardiographic epicardial fat thickness reflects, better than waist circumference, carotid arterial stiffness in a large population of hypertensives. *Eur. J. Echocardiography*. 2009; 10 (4): 549–555.

24. Nishio S., Kusunose K., Yamada H., Hirata Y., Ise T., Yamaguchi K., Yagi S., Soeki T., Wakatsuki T., Shimabukuro M., Sata M. Echocardiographic epicardial adipose tissue thickness is associated with symptomatic coronary vasospasm during provocative testing. *J. Am. Soc. Echocardiography*. 2017; 30 (10): 1021–1027.

25. Pescatori L.C, Savarino E., Mauri G., Silvestri E., Cariati M., Sardanelli F., Sconfienza L.M. Quantification of visceral adipose tissue by computed tomography and magnetic resonance imaging: reproducibility and accuracy. *Radiol. Bras*. 2019; 52 (1): 1–6.

26. Pinkhasov B.B., Selyatitskaya V.G., Karapetyan A.R., Astrakhantseva E.L. Metabolic syndrome in men and women with upper or lower types of body fat distribution. *Health*. 2012; 4 (12A): 1381–1389.

27. Eiras S., Teijeira-Fernández E., Shamagian L.G., Fernandez A.L., Vazquez-Boquete A., Gonzalez-Juanatey J.R. Extension of coronary artery disease is associated with increased IL-6 and decreased adiponectin gene expression in epicardial adipose tissue. *Cytokine*. 2008. 174–180.

28. Waist circumference and waist–hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8–11 December 2008. www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/

Сведения об авторах:

Деев Д.А., ORCID 0000-0002-7832-7439, e-mail: deevdmd@gmail.com
Пинхасов Б.Б., д.м.н., ORCID 0000-0002-4579-425X, e-mail: pin@centercem.ru
Селятицкая В.Г., д.б.н., проф., ORCID 0000-0003-4534-7289, e-mail: ccem@centercem.ru
Мациевская Т.Р.
Мохова И.Г., e-mail: igmokhova@gmail.com

Information about authors:

Deev D.A., ORCID 0000-0002-7832-7439, e-mail: deevdmd@gmail.com
Pinkhasov B.B., doctor of medical sciences, ORCID 0000-0002-4579-425X, e-mail: pin@centercem.ru
Selyatitskaya V.G., doctor of biological sciences, professor, ORCID 0000-0003-4534-7289, e-mail: ccem@centercem.ru
Matsievskaya T.R.
Mokhova I.G., e-mail: igmokhova@gmail.ru

УДК 611.819.5:616-006.328-089.168 DOI: 10.15372/SSMJ20190415

МЕНИНГИОМЫ НАМЕТА МОЗЖЕЧКА: РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Вячеслав Владимирович СТУПАК[1], Иван Сергеевич КОПЫЛОВ[1], Иван Викторович ПЕНДЮРИН[1], Сергей Борисович ЦВЕТОВСКИЙ[1], Дмитрий Андреевич ДОЛЖЕНКО[2], Александр Васильевич НОВОКШОНОВ[3], Тимур Мазамбекович ШОГУНБЕКОВ[4]

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

[2] *Краевая клиническая больница 656024, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1*

[3] *Областной клинический центр охраны здоровья шахтеров 652509, г. Ленинск-Кузнецкий, 7-й мкрн, 9*

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

Цель исследования – оценить результаты хирургического лечения больных с менингиомами намета мозжечка, оперированных в нейрохирургическом отделении № 1 Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна. **Материал и методы.** В исследование включены 64 пациента с менингиомами намета мозжечка различной локализации, находившиеся на лечении в период с 2008 по 2017 г. Среди них было 55 женщин (85,9 %, средний возраст 62,9 года) и 9 мужчин (14,1 %, средний возраст 56,7 года). С целью диагностики пациентам в предоперационном периоде проводились магнитно-резонансная томография и/или мультиспиральная компьютерная томография головного мозга (как нативная, так и с внутривенным контрастированием). В представленной серии 83 % опухолей были больших и гигантских размеров (поперечник последних превышал 4,0 см). В 63 случаях менингиомы представлены типическими доброкачественными и лишь в одном случае диагностирована анапластическая злокачественная менингиома. Всем больным проведено хирургическое лечение, проходившее в один или два этапа. В общей сложности выполнено 70 операций с применением современных методов микрохирургии. Для контроля функционального состояния ствола головного мозга интраоперационно с помощью электромиографа «Нейропак-2» («NIHON KOHDEN Corp.», Япония) регистрировались коротколатентные акустические (стволовые) вызванные потенциалы. При заинтересованности стенок синусов матрикс опухоли обрабатывался неодимовым лазером мощностью 20 Вт в режиме последовательной коагуляции и абляции. **Результаты.** В 63 случаях достигнута максимальная степень радикальности удаления опухоли – по Simpson I резекция достигнута в 76,6 % (n = 49), по Simpson II – в 21,8 % случаев (n = 14). У одного больного (1,6 %) из-за сложности хирургического подхода и развития массивного кровотечения из поперечного синуса и области стока синусов опухоль удалена субтотально. Послеоперационная летальность составила 3,1 % (два человека). Регистрация акустических стволовых вызванных потенциалов показала, что используемая хирургическая тактика не приводит к существенному ирритирующему или угнетающему воздействию на стволовую область мозга. Развитие инфекционных осложнений со стороны раны, оболочек и головного мозга, раневой ликвореи не наблюдалось. **Обсуждение.** Тенториальные менингиомы представляют собой группу редких опухолей головного мозга, основным методом лечения которых является по возможности их полная резекция хирургическим путем. Оперативное вмешательство приводило к небольшому ухудшению функционального состояния оперируемых согласно индексу Карновского, но спустя две недели оно восстанавливалась до исходного уровня. Осложнения в виде неврологических расстройств, возникшие у 12 оперированных (19 %), и послеоперационная летальность не превышали литературных данных. Основная часть очаговых неврологических симптомов регрессировала спустя две недели с момента проведения операции.

Ключевые слова: нейрохирургия, менингиома, намет мозжечка, задняя черепная ямка, опухоль головного мозга.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Автор для переписки: Ступак В.В., e-mail: vstupak@niito.ru

Для цитирования: Ступак В.В., Копылов И.С., Пендюрин И.В., Цветовский С.Б., Долженко Д.А., Новокшонов А.В., Шогунбеков Т.М. Менингиомы намета мозжечка: результаты хирургического лечения. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 119–126. doi: 10.15372/SSMJ20190415.

MENINGIOMAS OF THE CEREBELLAR TENTORIUM: THE RESULTS OF SURGICAL TREATMENT

Vyacheslav Vladimirovich STUPAK[1], Ivan Sergeevich KOPYLOV[1], Ivan Viktorovich PENDYURIN[1], Sergey Borisovich TSVETOVSKIY[1], Dmitriy Andreevich DOLZHENKO[2], Aleksandr Vasilyevich NOVOKSHONOV[3], Timur Mazambekovich SHOGUNBEKOV[4]

[1] *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan of Minzdrav of Russia 630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

[2] *Regional Clinical Hospital 656024, Barnaul, Lyapidevskogo str., 1*

[3] *Regional Clinical Center of the Miners Health Protection 652509, Leninsk-Kuznetsky, 7th district, 9*

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

Aim of the study was to evaluate the surgeries of tentorial meningiomas in Neurosurgical Department No.1 of the Novosibirsk Institute of Traumatology and Orthopedics. **Material and methods.** Study includes 64 patients with tentorial meningiomas of different location, treated surgically from 2008 to 2017. Among them 55 (85.9 %) were female patients and 9 were male (14.1 %) with average age of 62.9 years in females and 56.7 years in males. For diagnostic purposes, the patients were performed brain magnetic resonance imaging and/or computed tomography with or without contrast agents. In this series, 83 % of the tumors were of large or giant (with diameter of more than 4 cm). In 63 cases the tumors were typical meningiomas and only 1 case was a malignant anaplastic meningioma. **Results.** All patients were treated surgically in one or two steps. Overall, there were 70 standard microsurgical resections. Electromyography with Neuropack-2 («NIHON KOHDEN Corp.», Japan) was performed to control brain stem function during the surgery, with short latency auditory evoked potentials (SLAEPs) received. When sinus walls were affected, the tumor matrix was processed with 20W neodymium laser in coherent mode and ablation. In 63 cases, gross-total resection was achieved: Simpson I (76.6 %, $n = 49$) and Simpson II (21.8 %, $n = 14$). One patient (1.6 %) was treated with subtotal resection because of complicated surgical approach and massive transverse sinus and sinus confluence bleeding. Post-operative mortality was 3.1 % (2 cases). SLAEP data did not demonstrate any significant irritation or damage to the brain stem with performed surgical approaches. There were no infections of the surgical wound, meninges, brain or CSF leaks after the surgery. **Discussion.** Tentorial meningiomas are rare brain tumors treated with gross-total tumor resection when possible. Performed surgeries resulted in mild functional decrease in quality of life, but Karnofsky scale for each patient was returning to its original state in 2 weeks. Complications, including neurological disability, presented in 19 % ($n = 12$) of the patients, and post-operative mortality did not exceed the common literature data. Most of the focal neurological disabilities have disappeared in 2 weeks after the surgery.

Key words: neurosurgery, meningioma, tentorium, posterior cranial fossa, brain tumor.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Stupak V.V., e-mail: VStupak@niito.ru

Citation: Stupak V.V., Kopylov I.S., Pendyurin I.V., Tsvetovskiy S.B., Dolzhenko D.A., Novokshonov A.V., Shogunbekov T.M. Meningiomas of the cerebellar tentorium: the results of surgical treatment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 119–126. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190415.

Среди опухолей головного мозга особое место занимают менингиомы. Официально данный термин ввел в 1922 г. Harvey William Cushing как обозначение для объемных экстрацеребральных опухолей, растущих из твердой мозговой оболочки [3]. Менингиомы задней черепной ямки составляют 9–20 % от всех внутричерепных опухолей данной гистоструктуры [5]. Примерно 30 % всех менингиом задней черепной ямки возникают из тенториума мозжечка, при этом менингиомы намета мозжечка составляют 2–4 % среди всех опухолей оболочечно-сосудистого ряда [2]. Менингиомы фалькс-тенториального угла входят в подгруппу тенториальных и представляют

0,3–1,1 % внутричерепных менингиом [11, 12]. Менингиомы пинеальной области встречаются редко, составляя 2–8 % от всех опухолей этой области [6–8, 11, 12]. Хирургические осложнения и смертность после резекции менингиом тенториума неуклонно снижались по мере совершенствования нейрохирургической техники и операционно-анестезиологического оснащения. По данным литературы, смертность составляет не более 3,7 % [4, 13]. Удаление такого вида новообразований по Simpson I/II благодаря использованию микрохирургической техники может быть достигнуто в 77–91 % случаев [8]. Но несмотря на высокий уровень радикальности проводимых оперативных вмешательств, после субтотального удаления нередко наблюдается прогрессирование заболевания (до 26 % случаев) [13]. Кроме этого, при использовании современных хирургических технологий в 19–55 % случаев возникают послеоперационные осложнения, что говорит о сложности лечения данного вида опухолей и сохраняющейся актуальности поиска наиболее эффективных подходов к нему [4].

Цель исследования – оценить результаты хирургического лечения больных с менингиомами намета мозжечка, оперированных в нейрохирургическом отделении № 1 Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе проанализированы результаты хирургического лечения 64 больных с менингиомами намета мозжечка различной локализации и распространенности, находившихся в период с 2008 по 2017 г. в нейрохирургическом отделении № 1 Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна. Среди оперированных было 55 женщин (85,9 %) и 9 мужчин (14,1 %). Средний возраст пациентов составлял 60 ± 3 лет. Возраст мужчин варьировал от 15 до 75 лет (в среднем 56,7 года), женщин – от 23 до 84 лет (в среднем 62,9 года). Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

С целью уточнения диагноза, определения размеров новообразования и взаимоотношения с окружающими структурами головного мозга пациентам в предоперационном периоде на базе отделения лучевой диагностики Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии проводились магнитно-резонансная томография (МРТ) и мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) головного мозга. Для определения размеров новообразования, взаимоотношения с окружающими структурами головного мозга, артериальными и венозными коллекторами осуществлялась нейровизуализация с внутривенным введением контрастного вещества («Омнискан» при МРТ и «Омнипак» при МСКТ). Использовались томографы «Excelart Vantage» («Toshiba», Япония; напряженность магнитного поля 1,5 Тл, толщина срезов 4 мм, режимы T1, T2, FLAIR, DWI, в трех проекциях) и «Aquilion 64» («Toshiba»; толщина срезов 1 мм в аналогичных режимах). Предоперационная МРТ головы с контрастным усилением выполнена 48 пациентам, МСКТ с контрастным усилением в ангиорежиме – 16 больным. По данным МР-диагностики у шести (9 %) оперированных была выраженная гидроцефалия с блоком тока ликвора на уровне задних отделов третьего и четвертого желудочков. У 12 (19 %) больных, по данным венозной фазы сосудистого режима МСКТ, в опухолевый процесс были вовлечены от 1 до 2 синусов. У трех пациентов это был поперечный синус; у двух – нижний сагиттальный синус; в одном случае прямой и у шести поперечный, и сток синусов. В 8 % случаев (пять человек) выявлена полная окклюзия поперечного ($n = 3$) и нижнего сагиттального синуса ($n = 2$) опухолью. Согласно результатам МСКТ-ангиографии, в 9 из 15 случаев фалькс-тенториальных менингиом вена Галена находилась на передневерхней поверхности объемного образования, а у шести пациентов была локализована по нижней поверхности новообразования, без вовлечения в строму опухоли.

В представленной серии 83 % опухолей были больших и гигантских размеров, их поперечник превышал 4,0 см. Минимальный объем менингиомы составлял 18 см^3, самая крупная достигала 39,2 см^3; средний размер равнялся 26,8 ± 0,7 см.

По результатам гистологического заключения согласно классификация ВОЗ в пересмотре от 2016 г. [9] все опухоли диагностированы как менингиомы. В 63 случаях представлены типические доброкачественные менингиомы, в одном случае диагностирована анапластическая злокачественная менингиома.

В зависимости от локализации менингиомы и ее связи с тенториумом, все оперированные были распределены согласно классификации, предложенной M.G. Yaşargil [13], которая является наиболее удобной для практического использования с позиций топографической анатомии (рисунок). Настоящая классификация помогает локализовать матрикс опухоли относительно тенториума, предоставив хирургу возможность оценить ее взаимосвязь с окружающими структурами головного мозга, что позволит спланировать оптималь-

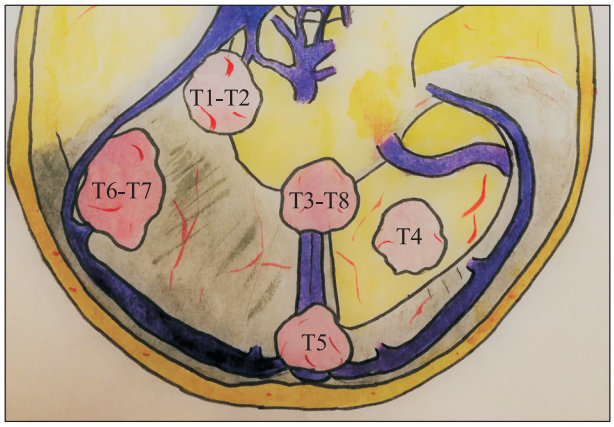

Рис. *Анатомическое изображение локализации и квалификации тенториальных менингиом. T1–T2 – медиальная «серединная» менингиома; T3–T8 – фалькс-тенториальная менингиома; T4 – парамедиальная «интрамедиальная» менингиома; T5 – менингиома в области синусового стока; T6–T7 – латеральная тенториальная менингиома*

Fig. *Anatomical image of tentorial meningiomas localization and qualification. T1–T2 – medial «middle» meningioma; T3–T8 – falx tentorial meningioma; T4 – paramedial «intramedial» meningioma; T5 – meningioma in sinus outflow region; T6–T7 – lateral tentorial meningioma*

ный хирургический доступ к новообразованию. В данной классификации выделяют пять групп опухолей тенториума, последние могут быть локализованы как в супратенториальном, так и в субтенториальном пространстве. Согласно данной классификации, в нашем исследовании оперированные были распределены на пять групп: у 15 (23,4 %) пациентов диагностирована медиальная «серединная» менингиома вырезки намета (T1-T2), у 16 (25,0 %) – фалькс-тенториальные менингиомы (T3-T8), у 12 (18,8 %) – парамедиальная «интрамедиальная» менингиома (T4), у шести (9,2 %) – менингиомы в области синусового стока (T5), у 15 (23,4 %) – латеральные тенториальные менингиомы (T6-T7). Среди всех опухолей 28 имели супратенториальную, 16 субтенториальную и 20 супра-субтенториальную локализацию.

Наиболее распространенными симптомами на момент госпитализации у пациентов были головные боли – 54 человека (85 %). Они носили общемозговой гипертензионный характер. Очаговые симптомы в виде мозжечковых расстройств (атаксия различной степени выраженности, нарушение равновесия и координации движений, головокружение) диагностированы у 74 % (n = 47) пациентов. Поражение черепно-мозговых нервов встретились в 15 % (n = 10) случаев. Среди них в большей степени (у семи человек, 70 %) страдала VII пара, на стороне локализации опухоли. В 15 % (n = 23) случаев выявлен гемипарез центрального типа различной степени выраженности. Ни в одном наблюдении при локализации менингиомы в области шишковидной железы и воздействии ее на четверохолмие не был диагностирован синдром Парино. До операции у 22 % (n = 14) пациентов общее функциональное состояние по шкале Карновского равнялась 70 %, у остальных 78 % (n = 50) – 80–90 %.

Всем пациентам нашей серии было осуществлено хирургическое лечение, проходившие в один или два этапа. В общей сложности 64 больным проведено 70 хирургических операций. У 9 % (n = 6) пациентов с МРТ-признаками и клиническими проявлениями субкомпенсированной гидроцефалии для компенсации состояния и в 3 % (n = 2) случаев для исключения усугубления неврологии первым этапом проводилась установка временного наружного дренажа по Арендту. Остальным 6 % (n = 4) оперированным выполнено вентрикуло-перитонеальное шунтирование. В последующем, через 3–5 дней, при стабилизации состояния пациента осуществлялся основной этап, направленный на резекцию новообразования.

С целью обеспечения оптимальной визуализации опухоли в момент ее удаления хирургические доступы планировались с учетом данных МРТ и МСКТ изображений. Учитывалась локализация опухоли относительно важных анатомических, сосудистых структур мозга, а также ее размер. Так, при медиальной «серединной» менингиоме вырезки намета (T1–T2) у 10 из 15 оперированных опухоль удалялась из двухстороннего супрацеребеллярного-супратенториального доступа. В трех случаях использован ретросигмовидный субокципитальный и в двух – подвисочный доступы. При 16 фалькс-тенториальных менингиомах (T3–T8) у четырех пациентов осуществлен межполушарный транскаллезный доступ, в одном варианте применен окципитальный межполушарный подход. У троих выполнен окципитальный транстенториальный подход. Восьми пациентам произведен двухсторонний субокципитальный доступ. У 12 человек с наличием парамедиальных «интрамедиальных» менингиом (T4), резекция осуществлялась из супрацеребеллярного-субтенториального доступа. В 15 случаях латеральных тенториальных менингиом (T6–T7) 7 новообразований удалялись из ретросигмовидного субокципитального доступа, остальным 8 выполнен односторонний супрацеребеллярный субтенториальный доступ. Шесть менингиом в области синусового стока (T5) резецированы из субокципитального доступа.

Все больные оперированы с применением современных методов микрохирургии. 35 пациентам оперативное вмешательство выполнялось в положении полусидя, 29 – в положении на боку. В 43 случаях, при удалении медиальных менингиом вырезки намета, фалькс-тенториальных и парамедиально расположенных опухолей контролировалось функциональное состояние стволовых отделов мозга с целью определения допустимых границ вмешательства, наиболее опасным последствием которого может быть нарушение регуляции витальных функций. Для контроля с помощью электромиографа «Нейропак-2» («NIHON KOHDEN Corp.», Япония) регистрировались коротколатентные акустические (стволовые) вызванные потенциалы (АСВП). Их параметры сопоставлялись с параметрами, контролируемыми анестезиологом: артериальным давлением, частотой сердечных сокращений, сатурацией кислорода и концентрацией CO_2 на выдохе. В ограниченном числе случаев (n = 6) осуществлялась одновременная регистрация АСВП и соматосенсорных ВП.

Для повышения степени радикальности удаления новообразования всегда стремились к иссечению матрикса опухоли – утолщенной твердой мозговой оболочки. При заинтересованности стенок синусов матрикс опухоли обрабатывали неодимовым лазером мощностью 20 Вт в режиме последовательной коагуляции и вапоризации, до появления венозного кровотечения, как это применяется при удалении парасагиттальных менингиом [1]. В пяти случаях, при полной окклюзии опухолью поперечного и нижнего сагиттального синусов, эту часть после коагуляции опухолевой ткани неодимовым лазером полностью иссекали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 63 из 64 случаев достигнута максимальная степень радикальности удаления опухоли. Резекция новообразования по Simpson I была достигнута в 76,6 % (n = 49) случаев, по Simpson II – в 21,8 % (n = 14). В одном случае (1,6 %) из-за сложности хирургического подхода и развития массивного кровотечения из поперечного синуса и области синусного стока опухоль удалена субтотально (Simpson III).

Опыт мониторинга функции ствола головного мозга показал, что наблюдавшееся в ходе операции постепенное увеличение латентного времени компонентов АСВП, в том числе собственно стволовых компонентов IV и V, при сохранении соотношения амплитуд и без грубых изменений соотношения межпиковых интервалов не является коррелятом каких-либо стволовых нарушений, угрожающих витальным функциям. Увеличение задержек компонентов ВП отражало в первую очередь не локальные изменения функционального состояния стволовых структур, а действие на скорость и характер проведения нервных сигналов наркоза определенной глубины и продолжительности, а также препаратов, регулирующих гемодинамику. Изменения амплитуды АСВП запаздывают по отношению к трансформациям артериального давления, таким образом, изменения функционального состояния ствола мозга не являются первичными.

У 19 % (n = 19) больных в послеоперационном периоде отмечено нарастание очаговой неврологической симптоматики, при этом наблюдалось уменьшение количества больных с головной болью гипертензивного характера – с 85 % (n = 54) до 20 % (n = 13). Чаще всего головная боль была локальной в зоне проведенной операции.

Имевшиеся исходно у 74 % (n = 47) оперируемых нарушения функции мозжечка стали выявляться уже у 80 % (n = 51) больных в виде небольших нарушений равновесия и координации движений. На 4 % (с 15 до 19 %) выросло количество пациентов с нарушениями функции черепно-мозговых нервов. Чаще (78 % случаев), как и до операции, страдала VII пара нервов на стороне новообразования. По-прежнему в 8 % (n = 5) случаев у оперированных была снижена острота зрения, связанная с застойной атрофией сосков зрительных нервов. С 15 до 18 % в послеоперационном периоде увеличилось число больных с гемипарезом центрального типа различной степени выраженности, обусловленное нарушением кровообращения в стволе мозга по типу негрубой ишемии. У 8 % (n = 5) человек появилась неврологическая симптоматика со стороны среднего мозга, в виде нерезко выраженного синдрома Парино (парез взора вверх).

В раннем послеоперационном периоде ухудшилось функциональное состояние пациентов (до 70 % по шкале Карновского), но на момент выписки часть симптомов регрессировала (80–90 % по шкале Карновского). Спустя две недели после проведенной операции отмечена отчетливая положительная динамика в виде регресса общемозговых и очаговых симптомов. Послеоперационная летальность составила 3,1 % (n = 2). В первом случае летальный исход развился в результате массивного интраоперационного кровотечения из пророщенного опухолью поперечного синуса, во втором – от нарушения мозгового кровообращения в раннем послеоперационном периоде по ишемическому типу. Развитие инфекционных осложнений со стороны раны, оболочек и головного мозга, а также раневой ликвореи не на-

блюдалось ни в одном случае. Ни у одного больного, оперированного в положении «полусидя», не были диагностированы симптомы воздушной эмболии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тенториальные менингиомы представляют собой группу редких опухолей головного мозга, основным методом лечения которых является по возможности полная резекция объемного образования хирургическим путем. Однако оперативное вмешательство должно выполняться из адекватного и малотравматичного для мозга доступа и не приводить к развитию новых неврологических осложнений, что ухудшает качество жизни оперируемого. Тщательное планирование оперативного доступа является ключевым моментом в подготовке хирурга к оперативному вмешательству. Исход хирургического лечения во многом зависит от расположения, размеров опухоли и ее взаимоотношения с окружающими структурами. С этих позиций, на наш взгляд, классификация тенториальных менингиом, предложенная M.G. Yaşargil (1996), является наиболее точной и удобной для практической нейрохирургии.

Определяющее значение в успешной хирургической резекции данных видов опухолей имеет и взаимосвязь последних со стенками синусов, степень их инвазии. Степень заинтересованности синусов, особенно в проекции прямого синуса и стока синусов, играет, как нам представляется, большое значение в объеме радикальности выполняемой операции. Тотального удаления новообразования при неполном проращении синусов достичь в силу технических сложностей резекции этой части менингиомы, при большой вероятности развития массивного венозного кровотечения и возникновения воздушной эмболии бывает довольно трудно. Такая ситуация возникла в одном из представленных случаев, когда в результате массивного венозного кровотечения не удалось резецировать опухоль тотально. Для повышения степени радикальности удаления опухоли, располагающейся в просвете синуса, мы коагулируем стенку синуса, а затем вапоризуем лучом неодимового лазера до появления венозного кровотечения.

При сложной локализации тенториальных менингиом считаем, что стремиться «любой ценой» радикально удалять доброкачественную опухоль с последующим высоким риском развития грубой неврологии нецелесообразно. Остаточную ее часть, при прогрессировании процесса, можно подвергнуть радиохирургии, о положительной ее роли которой как альтернативной терапии при рецидивах данного вида менингиом и первичных небольших новообразований свидетельствует работа H. Muthukumar et al. [10].

При фалькс-тенториальных менингиомах, особенно больших и гигантских размеров, возникает тесная связь последних с веной Галена. Повреждение вены при резекции новообразования является серьезнейшим осложнением, приводящим к грубым нарушениям венозного оттока головного мозга, вплоть до летального исхода. При этом в работе А.Н. Коновалова и соавт. показано, что при такой локализации менингиомы ее повреждение и последующая коагуляция, которая выполнялась только после адекватной интраоперационной верификации функциональной окклюзии кровотока и прекращения кровотока по вене Галена, не приводили не только к летальным исходам, но и к грубым неврологическим нарушениям [8]. В представленной нами работе взаимосвязь вены Галена и опухоли визуализирована у 15 пациентов, в этих случаях вена Галена находилась на капсуле верхнего или нижнего полюса опухоли и ни разу не была повреждена при ее удалении.

В случаях, когда опухоль полностью окклюзирует один из поперечных синусов, рекомендуем эту часть иссечь, как мы это делали у трех наших больных. При этом в послеоперационном периоде не отмечено возникновения грубых неврологических нарушений. При используемой хирургической тактике с применением, в том числе, лазерного хирургического инструмента по данным регистрации АСВП в ходе операции не наблюдалось существенного ирритирующего или угнетающего воздействия на стволовую область мозга, могущего привести к нарушению регуляции витальных функций. Хирургическое вмешательство приводило к небольшому снижению функционального состояния пациентов, но спустя две недели оно восстанавливалось до исходного уровня. Осложнения в виде неврологических расстройств возникли у 19 % (n = 12) оперируемых больных, что не превышает приводимых в литературе данных. Основная их часть регрессировала спустя две недели после проведенной операции.

ВЫВОДЫ

1. Использование современных методов нейровизуализации менингиом тенториума, адекватных, щадящих операционных доступов, микрохирургических приемов резекции данных опухолей, позволяет достигать хороших клинических результатов лечения.

2. Применение данных методов позволяет получить в ближайшем послеоперационном периоде отсутствие неврологических осложнений у 81 % (n = 52) оперированных пациентов и невысокий уровень послеоперационной летальности – 3,1 % (n = 2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ступак В.В., Струц С.Г., Садовой М.А., Майоров А.П. Неодимовый лазер в хирургии церебральных менингиом. Новосибирск: Наука, 2013. 267.

Stupak V.V., Struts S.G., Sadovoy M.A., Mayorov A.P. Neodymium laser in surgery of cerebral meningiomas. Novosibirsk: Nauka, 2013. 267. [In Russian].

2. Чиркин В.Ю. Менингиомы намета мозжечка: клиника, диагностика, хирургическое лечение. *Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки*. 2006; 11 (4): 474–476.

Chirkin V.Yu. Meningiomas of tentorium cerebelli: clinic, diagnostics and surgical treatment. *Vestnik Tambovskogo Universiteta. Seriya: Yestestvennyye i tekhnicheskiye nauki = Tambov University Reports. Series: Natural and Technical Sciences*. 2006; 11 (4): 474–476. [In Russian].

3. Язвенко А.В., Шмырев В.И., Рудас М.С., Васильев А.С. Множественные менингиомы головного мозга – обзор проблемы и клиническое наблюдение. *Кремл. мед. клин. вестн*. 2012; (2): 31–33.

Yazvenko A.V., Shmyrjev V.I., Rudas M.S., Vasiljev A.S. Multiple meningiomas of the brain: state-ofthe art and clinical observations. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik = Kremlin medicine. Clinical herald*. 2012; (2): 31–33. [In Russian].

4. Bassiouni H., Hunold A., Asgari S., Stolke D. Tentorial meningiomas: clinical results in 81 patients treated microsurgically. *Neurosurgery*. 2004; 55 (1): 108–116. doi: 10.1227/01.neu.0000126886.48372.49.

5. Castellano F., Ruggiero G. Meningiomas of the posterior fossa. *Acta Radiol Suppl*. 1953; 104: 1–177.

6. Goto T., Ohata K., Morino M., Takami T., Tsuyuguchi N., Nishio A., Hara M. Falcotentorial meningioma: surgical outcome in 14 patients. *J. Neurosurg*. 2006; 104 (1): 47–53. doi: 10.3171/jns. 2006. 104.1.47.

7. Zhang X.A., Qi S.T., Fan J., Huang G.L., Peng J.X. Arachnoid membranes in the posterior half of the incisural space: an inverted Liliequist membrane-like arachnoid complex. *J Neurosurg*. 2014; 121 (2):390–396. doi: 10.3171/2014.3.JNS132206.

8. Konovalov A.N., Spallone A., Pizkhelauri D.I. Meningioma of the pineal region: a surgical series of 10 cases. *J. Neurosurg*. 1996; 85 (4): 586–590. doi: 10.3171/jns.1996.85.4.0586.

9. 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. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.

10. Muthukumar H., Kondziolka D., Lunsford L.D., Flickinger J.C. Stereotactic radiosurgery for tentorial meningiomas. *Acta Neurochir*. (*Wien*). 1998; 140 (4): 315–320.

11. Nowak A., Dziedzic T., Czernicki T., Kunert P., Marchel A. Falcotentorial and velum interpositum meningiomas: two distinct entities of the pineal region. *Neurol. Neurochir. Pol*. 2014; 48 (6): 397–402. doi: 10.1016/j.pjnns.2014.09.009.

12. Obrador S., Soto M., Gutierrez-Diaz J.A. Surgical management of tumours of the pineal region. *Acta Neurochir*. (*Wien*). 1976; 34 (1-4): 159–171.

13. Pamir M.N., Black P.M., Fahlbush R. Meningiomas: A comprehensive text. Philadelphia: Saunders/ Elsevier, 2010. 773 p.

14. Samii M., Carvalho G.A., Tatagiba M., Matthies C., Vorkapic P. Meningiomas of the tentorial notch: surgical anatomy and management. *J. Neurosurg*. 1996; 84 (3): 375–381. doi: 10.3171/jns.1996.84.3.0375.

Сведения об авторах:

Ступак В.В., д.м.н., проф., e-mail vstupak@niito.ru
Копылов И.С., e-mail: iskopylov@yandex.ru
Пендюрин И.В., к.м.н., e-mail: ivan75nsk@yandex.ru
Цветовский С.Б., к.б.н., e-mail: sercvet@mail.ru
Долженко Д.А., д.м.н., проф., e-mail: hospital@hospital.e4u.ru
Новокшонов А.В., д.м.н., проф., e-mail: info@gnkc.kuzbass.net
Шогунбеков Т.М., e-mail: info@gnkc.kuzbass.net

Information about authors:

Stupak V.V., doctor of medical sciences, professor, e-mail: VStupak@niito.ru
Kopylov I.S., e-mail: IKopylov@niito.ru
Pendyurin I.V., candidate of medical sciences, e-mail: IPendyurin@niito.ru
Tsvetovskiy S.B., doctor of functional diagnostics, e-mail: STsvetovsky@niito.ru
Dolzhenko D.A., doctor of medical sciences, professor, e-mail: hospital@hospital.e4u.ru
Novokshonov A.V., doctor of medical sciences, professor, e-mail: info@gnkc.kuzbass.net
Shogunbekov T.M., e-mail: gnokb@oblmed.nsk.ru

УДК 617.77+616-006.81 DOI: 10.15372/SSMJ20190416

РАДИОХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ВЕК МАЛЫХ РАЗМЕРОВ

Светлана Ваговна СААКЯН, Марина Панаетовна ХАРЛАМПИДИ, Елена Борисовна МЯКОШИНА, Роберт Александрович ТАЦКОВ, Георгий Александрович ГУСЕВ

Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России
105062, г. Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19

Цель исследования – оценить отдаленные результаты использования радиохирургического метода с применением микрохирургической техники для лечения доброкачественных опухолей век малых размеров. **Материал и методы.** В отделе офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России за период с 2012 по 2018 г. обследовано и пролечено 248 пациентов (108 детей в возрасте 12 ± 1,2 года и 140 взрослых в возрасте 46 ± 8,1 года) с доброкачественными образованиями век: пигментными (невусами), сосудистыми (капиллярными гемангиомами), эпителиальными (фолликулярным кератозом, кератопапилломой). В качестве хирургических пособий использовали прибор для радиохирургии «Сургитрон EMC». У всех больных применяли микрохирургическую технику. Продольный и поперечный размер опухолей составлял 3,4 ± 0,5 и 6,0 ± 0,8 мм соответственно. После хирургического лечения пациентам проводили патогистологическое исследование. Период наблюдения – 6 ± 1,4 года. **Результаты.** У 133 (53,6 %) из 248 пациентов выявляли невусы, у 76 (30,7 %) – кератопапиллому и инвертированный фолликулярный кератоз, у 39 (15,7 %) – капиллярную гемангиому. В зависимости от локализации опухоли, ее размеров, степени активности использовали различные модификации радиохирургического лечения с применением различных режимов и мощностей от 1 до 4 Вт. Интраоперационных осложнений не отмечали. Ранний послеоперационный период сопровождался наличием признаков легкого воспаления, которое купировалось местной терапией. Формирование нежного рубца наблюдали в среднем через 7 ± 2 дней. Отмечали два случая (0,8 %) рецидива кератопапилломы через 2 года после первой операции. Опухоли были удалены методом радиоэксцизии. **Заключение.** Доброкачественные опухоли век, особенно меланоцитарного происхождения, подлежат обязательному динамическому наблюдению и при выявлении минимальных признаков прогрессии показано их хирургическое удаление. Радиохирургическое лечение с использованием микрохирургической техники является методом выбора в лечении малых доброкачественных опухолей век и зависит от размеров опухоли, ее локализации и характера опухолевого процесса. Применение радиохирургического метода с обязательной микрохирургической техникой для лечения доброкачественных опухолей век малых размеров с соблюдением правил радикальности и антибластичности позволяет сохранить зрительные функции с одномоментным проведением хирургического лечения, обеспечивая нормальные анатомо-топографические соотношения переднего отрезка глаза и высокое качество жизни пациента.

Ключевые слова: доброкачественные опухоли век, радиохирургия.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.
Автор для переписки. Мякошина Е.Б., E-mail: myakoshina@mail.ru
Для цитирования: Саакян С.В., Харлампиди М.П., Мякошина Е.Б., Тацков Р.А., Гусев Г.А. Радиохирургическое лечение доброкачественных опухолей век малых размеров. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 127–136. doi: 10.15372/SSMJ20190416.

RADIOSURGICAL TREATMENT OF BENIGN SMALL EYELID TUMORS

Svetlana Vagovna SAAKYAN, Marina Panaetovna KHARLAMPIDI, Elena Borisovna MYAKOSHINA, Robert Alexandrovich TATSKOV, Georgiy Alexandrovich GUSEV

Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases
105062, Moscow, Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19

Aim of the study – to evaluate the long-term results of the radiosurgical method using microsurgical techniques for the treatment of small benign eyelid tumors. **Material and methods.** In Ocular Oncology Centre of Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases for the period from 2012 to 2018 year 248 patients were examined and treated (108

children aged 12 ± 1.2 years and 140 adults aged 46 ± 8.1 years) with benign eyelid tumors: pigmented (nevus), vascular (capillary hemangiomas), epithelial (follicular keratosis, keratopapilloma). The Surgitron EMC radiosurgery device was used as surgical aids. All patients used microsurgical technique. The longitudinal size of the tumors was 3.4 ± 0.5 mm, transverse – 6 ± 0.8 mm. All patients after surgical treatment underwent histopathological study. The observation period is on average 6 ± 1.4 years. **Results.** In 133 (53.6 %) of 248 patients, nevi were detected, in 76 (30.7 %) – keratopapilloma and inverted follicular keratosis, in 39 (15.7 %) – capillary hemangioma. Various modifications of radiosurgical treatment were used depending on the location of the tumor, its size, the degree of activity using different modes and powers from 1 to 4 Wt. Intraoperative complications were not noted. The early postoperative period was accompanied by the presence of signs of mild inflammation, which was stopped by local therapy. The formation of a tender scar was observed on average after 7 ± 2 days. Two cases (0.8 %) of recurrence of keratopapilloma were noted 2 years after the first operation. Tumors were removed by radio excision. **Conclusion.** Benign eyelid tumors, especially of melanocytic origin, are subject to obligatory dynamic observation, and if minimal signs of their progression are detected, their surgical removal is indicated. Radiosurgical treatment using microsurgical techniques is the method of choice in the treatment of small benign eyelid tumors and depends on the size of the tumor, its localization and the nature of the tumor process. The use of the radiosurgical method with obligatory microsurgical technique for treating benign tumors of small sizes with the observance of the rules of radicalness and antiblasticity allows maintaining visual functions with simultaneous surgical treatment, providing normal anatomical and topographic correlations of the anterior segment of the eye and high quality of life of the patient.

Key words: benign tumors of the eyelids, radiosurgery.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Myakoshina E.B., e-mail: myakoshina@mail.ru

Citation: Saakyan S.V., Kharlampidi M.P., Myakoshina E.B., Tatskov R.A., Gusev G.A. Radiosurgical treatment of benign small eyelid tumors. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 127–136. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190416.

Доброкачественные образования век – группа заболеваний, включающая в себя опухоли, развивающиеся из различных тканевых структур. Частота их встречаемости достигает 80 % от общего количества новообразований глаза [2, 3, 5, 9, 14, 19]. По данным литературы, чаще всего встречаются доброкачественные опухоли век эпителиального (кератопапилломы, фолликулярный кератоз и др.), сосудистого (гемангиомы) и пигментного (невусы) происхождения [3, 9, 11, 18, 19, 20]. Несмотря на то, что в подавляющем большинстве случаев доброкачественные новообразования век имеют низкую митотическую активность и медленный характер роста, они склонны к прогрессированию и злокачественной трансформации, особенно в третьей декаде жизни [4, 15]. Признаками прогрессии доброкачественных опухолей являются изменение цвета, характера пигментации (становятся светлее или темнее), возникновение пигментных дорожек или ореола, застойно-полнокровного ободка вокруг основания, новообразованных сосудов на поверхности и в толще опухоли, приводящих сосудов, реактивного папилломатоза эпидермиса с образованием чешуек и часто геморрагических и/или некротических корочек; такие образования подлежат обязательному удалению [3].

Радикальная эксцизия доброкачественных опухолей век занимает ведущее место в системе органосохранных методов лечения [4, 6–8, 10, 12–14]. На смену хирургическим методами пришли абластичные технологии. Применяемая ранее электрохирургия из-за побочных эффектов и не вполне удовлетворительных косметических результатов постепенно изживает себя [20, 22, 23]. Лазерные технологии также оказались не лишены недостатков (невозможность контроля глубины воздействия, риск развития рубцовых деформаций, пигментация тканей) [7, 21]. С развитием высоких технологий появились новые модификации воздействия на ткани – радиоволновые с обязательным применением микрохирургической техники [6, 12, 13, 23]. Радиохирургия – бесконтактный атравматичный метод осуществления коагуляции и разреза с применением тепловой энергии, которая выделяется в процессе сопротивления тканей из-за воздействующих на них волн высокой частоты, позволяющий проводить наитончайший бескровный разрез, ведущий к быстрому заживлению [6, 12, 13, 23]. До настоящего времени не проводили оценку отдаленных результатов лечения доброкачественных опухолей век малых размеров с помощью радиоволновых методов с применением микрохирургической техники.

Цель исследования – оценить отдаленные результаты использования радиохирургического метода с применением микрохирургической техники для лечения доброкачественных опухолей век малых размеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В отделе офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (МНИИ ГБ) за период с 2012 по 2018 г. обследовано и пролечено 248 пациентов с доброкачественными образованиями век: пигментными (невусами), сосудистыми (капиллярными гемангиомами), эпителиальными (фолликулярным кератозом, кератопапилломой), в том числе 108 детей в возрасте от 1 до 17 (в среднем 12 ± 1,2) лет и 140 взрослых в возрасте от 18 до 84 (в среднем 46 ± 8,1) лет. Всем больным проводили общеофтальмологические методы исследования (визометрию, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, фоторегистрацию) до и после лечения. Продольный размер опухолей составил 3,4 ± 0,5 мм, поперечный – 6 ± 0,8 мм.

В качестве хирургического пособия использовали прибор для радиохирургии «Сургитрон EMC» с выходной частотой 3,8 МГц, дающий возможность задействовать 4 режима в зависимости от формы волны (ФВ): «чистого разреза» (полностью фильтрованной ФВ), «разреза и коагуляции» (полностью ректифицированной ФВ), «коагуляции» (частично ректифицированной ФВ), «фульгурации» (прерывисто-искровой ФВ). Мощность воздействия варьировала от 1 до 4 Вт. Применяли разные виды наконечников: тонкий проволочный, типа «гвоздик», шаровидный диаметром 2 мм. Все операции проводили с использованием микрохирургической техники с помощью бинокулярного микроскопа премиум-класса, обладающего функцией изображения операции на экране монитора.

Показанием к операции служили рост опухоли, клинические признаки прогрессии, косметическая неудовлетворенность пациентов, обусловленная наличием образования, канцерофобия. Операции проводили под наркозом у детей и под местной инфильтрационной анестезией с 2%-м раствором лидокаина у взрослых. Все опухоли гистологически верифицированы. Радиоволновое хирургическое лечение проводили в соответствии со «Стандартом специализированной медицинской помощи при доброкачественных новообразованиях придаточного аппарата глаза 42_D18.0-3.00.01.00_1263», размещенным на сайте общероссийской общественной организации врачей-офтальмологов avo-portal.ru; все больные подписывали добровольное информированное согласие на его выполнение. Период послеоперационного наблюдения составил от 5 до 8 лет (6 ± 1,4 года).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По обращаемости в отдел офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России у преобладающего числа пациентов (133, 53,6 %) выявляли меланоцитарные доброкачественные новообразования век. Клинически невусы представляли собой плоское пятно, узелок или папилломатозное образование, располагающееся на коже века и/или интермаргинальном пространстве. Цвет невусов варьировал от желтоватого, светло-коричневого до насыщенного коричневого или почти черного (рис. 1).

При биомикроскопии опухоли эпителиального генеза кератопапиллому и инвертированный фолликулярный кератоз определяли у 76 (30,7 %) пациентов. Кератопапилломы представляли собой образования шаровидной или цилиндрической формы с узким основанием, мягкой консистенцией, с сосочковыми разрастаниями на поверхности, локализованными на коже края

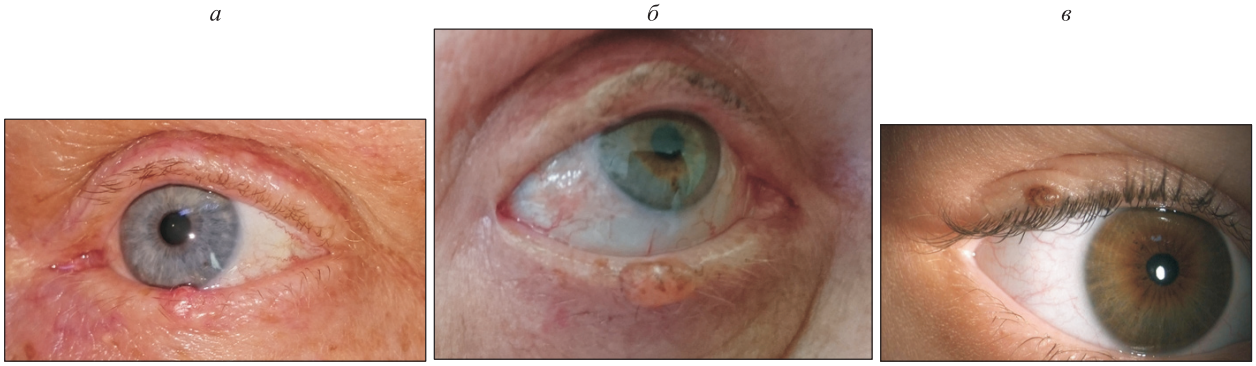

Рис. 1. *Невус века: беспигментный невус нижнего века (а), слабопигментированный невус нижнего века (б), пигментированный невус верхнего века (в)*

Fig. 1. *Eyelid nevus: amelanotic nevus of lower eyelid (a), low pigmented nevus of the lower eyelid (b), pigmented nevus of the lower eyelid (c)*

а *б*

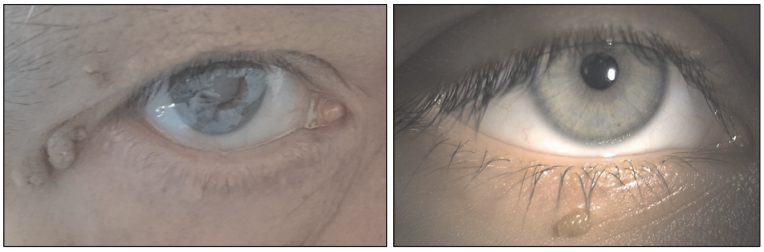

Рис. 2. *Кератопапиллома кожи наружного угла глаза размером более 3 мм (а) и нижнего века размером до 3 мм (б).*
Fig. 2. *Keratopapilloma of the skin of the outer corner of the eye with a size of more than 3 mm (a) and the lower eyelid with a size of up to 3 mm (b)*

а *б*

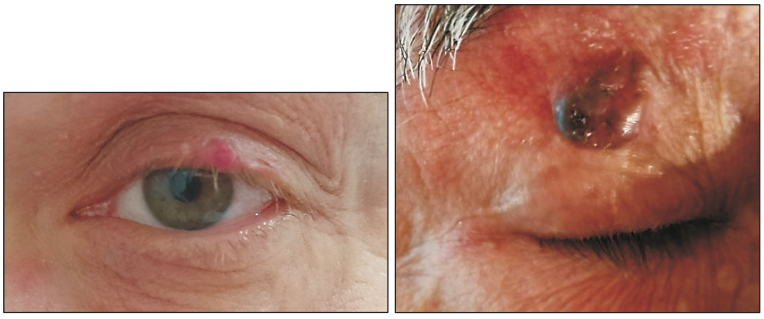

Рис. 3. *Гемангиома верхнего века до 3 мм (а) и более 3 мм (б)*
Fig. 3. *Hemangioma of the upper eyelid up to 3 mm (a), more than 3 mm (b)*

век. Инвертированный фолликулярный кератоз диагностировали в виде слегка проминирующего образования коричневатого или желтоватого цвета с нечеткими границами и ороговевающей поверхностью на широком основании (рис. 2). Сосудистые опухоли (капиллярные гемангиомы) выявляли у 39 (15,7 %) пациентов. При биомикроскопии гемангиома представляла собой припухлость или пятно на коже век голубоватого или розового оттенка с гладкой поверхностью на широком основании (рис. 3).

Радиохирургическое лечение планировали в зависимости от клинической картины (выраженность прогрессии), локализации опухоли и ее размеров. Радиоэксцизию осуществляли с использованием средних мощностей 2,5–3,0 Вт с целью достижения оптимального разреза тканей с минимальным повреждающим эффектом и коагуляции кровеносных сосудов. Выбор мощности воздействия зависел от клинической картины новообразования и его локализации. Так, при мягкотканных образованиях она была менее 2 Вт (рис. 4), в то время как при плотных опухолях (кератомах) составляла 3–4 Вт (рис. 5), так как при малых мощностях происходило налипание тканей на наконечник, что ограничивало его использование.

В зависимости от локализации опухоли, ее размеров и распространенности на соседние структуры использовали различные модификации радиохирургического иссечения с применением разных наконечников и режимов с помощью микрохирургической техники и обязательным последующим морфологическим исследованием (табл. 1). Небольшие сосудистые мальформации по типу капиллярной гемангиомы или телеангиоэктазии также подвергали радиокоагуляции с коагуляцией приводящих сосудов с использованием наконечника типа «гвоздик» в режиме «коагуляции» мощностью 2 Вт. При необходимости проводили погружную радиокоагуляцию приводящего сосуда.

При выполнении хирургического вмешательства случаев интраоперационных осложнений не отмечено. Ранний послеоперационный период сопровождался наличием признаков легкого воспаления, которое купировалось местной противовоспалительной и антибактериальной терапией (рис. 6). Заживление протекало асептично и ареактивно. Формирование нежного рубца наблюдали в среднем через 7 ± 2 дня. Отмечали полное

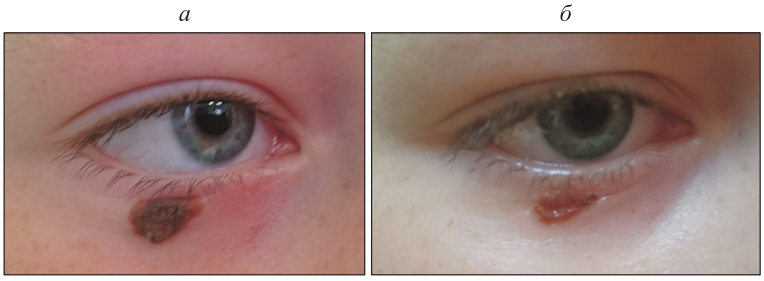

Рис. 4. *Невус нижнего века до радиоэксцизии (а) и через 9 дней после нее (б)*
Fig. 4. *Nevus of the lower eyelid before (a) and 9 days after radioexcision (b)*

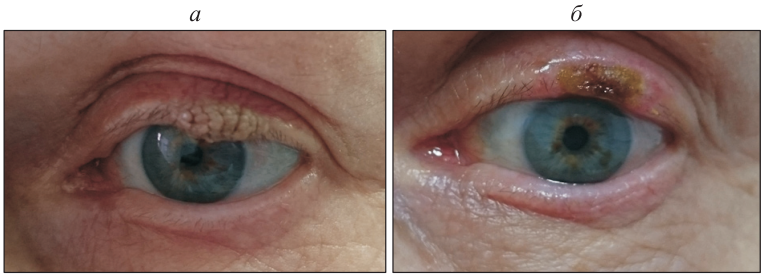

Рис. 5. *Кератопапиллома верхнего века до радиоэксцизии в режиме «фульгурации» (а) и через 10 дней после нее (б)*
Fig. 5. *Keratopapilloma of the upper eyelid before (a) and 10 days after radio excision in fulguration mode (b)*

смыкание глазной щели во всех случаях. Атравматичность радиоволнового метода для здоровых окружающих тканей давала возможность сохранить их общую структурность и восстановить рельеф кожи (рис. 7). Метод позволяет радикально удалить опухоль без нарушения функций пораженного глаза и достигнуть высокого лечебного, функционального и косметического эффекта, сохраняя анатомо-топографические соотношения тканей (рис. 8).

За весь период наблюдения у всех больных сохранялись высокие зрительные функции. В наблюдаемые сроки отмечено два случая (0,8 %) рецидива кератопапилломы через 2 года после первой операции. Опухоли были удалены методом радиоэксцизии.

Таблица 1

Параметры радиохирургии с использованием микрохирургической техники в лечении доброкачественных опухолей век малых размеров

Table 1

The parameters of radiosurgery using microsurgical techniques in the treatment of benign eyelid tumors of small size

Размер опухоли	Наконечник	Режим	Дополнительные хирургические манипуляции
До 3 мм	Типа «гвоздик»	Радиокоагуляция в режиме «фульгурации»	При локализации в области слезной точки – после удаления зондирование, промывание слезного канала, прошивание слезной точки 1 узловым швом
От 3,1 до 6 мм	Тонкий проволочный, шаровидный	Радиоэксцизия в режиме «разреза и коагуляции», режим «коагуляции»	При необходимости – после удаления пластика местными тканями

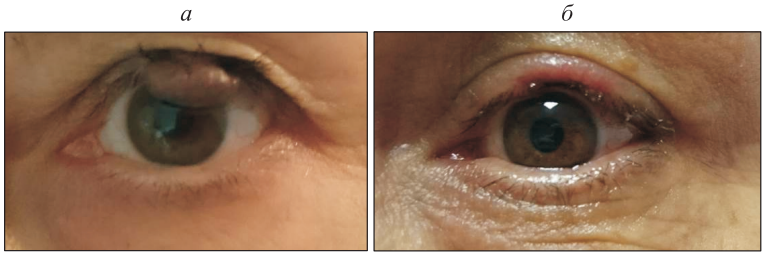

Рис. 6. *Невус верхнего века до радиоэксцизии (а) и через 14 дней после нее (б). Легкая гиперемия верхнего века, эпителизирующаяся рана верхнего века*

Fig. 6. *Nevus of the upper eyelid before (a) and 14 days after radio excision (b). Slight hyperemia of the upper eyelid, epithelial wound of the upper eyelid*

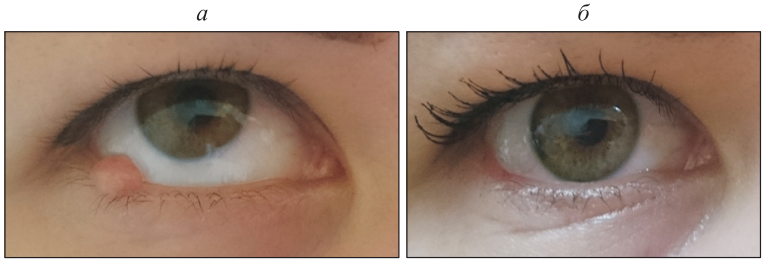

Рис. 7. *Невус нижнего века до радиоэксцизии (а) и через 21 день после нее (б). Восстановление рельефа нижнего века*

Fig. 7. *Nevus of the lower eyelid before (a) and 21 days after radio-excision (b). Restoration of the relief of the lower eyelid*

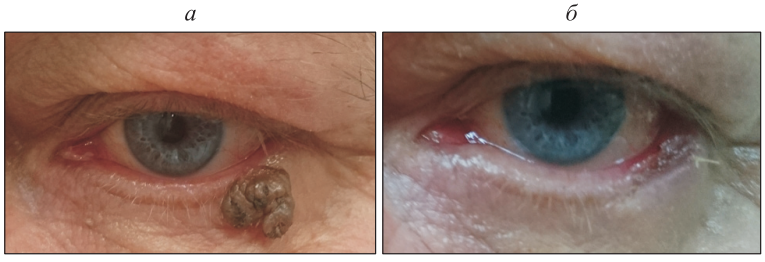

Рис. 8. *Невус нижнего века до радиоэксцизии с одномоментной пластикой местными тканями (а) и через 14 дней после нее (б). Сохранение анатомо-топографических соотношений тканей нижнего века*

Fig. 8. *Nevus of the lower eyelid before (a) and 14 days after radio excision with simultaneous plastic surgery with local tissues (b). Preservation of anatomical and topographical ratios of lower eyelid tissue*

Сравнение радиохирургического метода с использованием микрохирургической техники и хирургического лечения позволяет выделить преимущества и недостатки каждого из них (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Клинически провести четкую границу между «спокойной» и прогрессирующей опухолью порой не представляется возможным. При биомикроскопии отмечают изменение цвета, степени пигментации в сторону гипо- или гиперпигментации образования, увеличение его размеров, появление неровной поверхности, формирование сосудов в толще опухоли, что может свидетельствовать о ее росте [3]. В онкологической практике используют морфологические градации неопластического процесса: гиперплазия, метаплазия, атипическая метаплазия, дисплазия (I, II, III стадии), рак *in situ*, инвазивный рак, ана-

Таблица 2

Сравнительная характеристика радиохирургии с использованием микрохирургической техники и хирургии в лечении доброкачественных опухолей век малых размеров

Table 2

Comparative characteristics of radiosurgery using microsurgical techniques and surgery in the treatment of benign tumors of the eyelids of small size

Критерий оценки	Радиохирургия с использованием микрохирургической техники	Хирургия
Отек в раннем послеоперационном периоде	Минимальный	Умеренный или выраженный
Подкожные кровоизлияния в раннем послеоперационном периоде	Редко	Часто
Сроки заживления, дней	7±2	14 ± 2
Косметическая удовлетворенность	Хорошая	Хорошая или удовлетворительная
Необходимость дополнительной медикаментозной терапии (нестероидные противовоспалительные средства, антибиотики)	Не требуется	Иногда требуется
Временная утрата трудоспособности	Нет	Иногда
Качество жизни после лечения	Не снижается	Иногда снижается

пластический рак [11, 15, 18]. С каждой последующей градацией вероятность возврата клеток и ткани к нормальному фенотипу уменьшается. В связи с вышесказанным имеет значение своевременное удаление доброкачественных опухолей даже с начальными признаками прогрессии.

К хирургическим способам лечения доброкачественных опухолей век относят классическую хирургию с использованием обычного инструментария и методики, основанные на применении энергии излучения (электрохирургию, лазерное лечение и радиохирургию) [1, 3, 6, 7, 10, 12–14, 16, 21–23]. Метод классической хирургии предполагает использование металлического микрохирургического скальпеля, в настоящее время его применение в лечении опухолей сводится к минимуму. Локализация ряда образований вблизи слезных точек и канальцев, интермаргинального пространства век требует выполнения щадящих разрезов, зачастую сложной конфигурации. При повороте скальпеля на коже могут появляться участки неровного рассечения, что приводит к более выраженной послеоперационной реакции, неудовлетворительному косметическому эффекту, а в результате кровотечения, неизбежно сопровождающего манипуляции на веках, возникают выраженные гематомы, отек и, как следствие, временная утрата трудоспособности [16, 17].

В связи с вышесказанным на смену классической хирургии пришли энергетические методы. Еще в XVII в. появился метод электрохирургии, основным фактором воздействия которого является тепло, возникающее при прохождении постоянного тока. Достоинством электрохирургии служит уменьшение фильтрации в рану тканевой жидкости вследствие коагуляции, что ведет к лучшему заживлению, однако к серьезным недостаткам относится образование обширной зоны бокового некроза тканей с последующим формированием корочек и грубого рубцевания [20, 22, 23]. Лазерное лечение опухолей век достаточно широко применяются еще с 60-х годов прошлого века, при этом используются эффекты коагуляции и карбонизации с формами воздействия – эксцизии или деструкции. Лазерные технологии, несмотря на определенные преимущества перед электрохирургическими, имеют ряд недостатков, ограничивающих их повсеместное использование. К таковым можно отнести невозможность контроля по глубине воздействия в ходе удаления опухоли, риск развития рубцовых деформаций и пигментации тканей [7, 21].

Радиохирургия – метод разреза и коагуляции мягких тканей при помощи высокочастотных волн. W.L. Maness и F.W. Roeber экспериментально доказали, что частота 3,8 МГц является наиболее щадящей для разреза тканей. Основным достоинством метода является тот факт, что рассекающий эффект достигается за счет тепла, выделяющегося при сопротивлении тканей проникновению в них направленных высокочастотных волн. Технология получила широкое распространение в различных отраслях медицины, в том числе в офтальмологии, и в настоящее время занимает ведущие позиции в выборе метода лечения опухолей эпибульбарной локализации с обя-

зательным применением микрохирургической техники [6, 12, 13, 23]. Атравматичность радиоволновых приборов для здоровых окружающих тканей позволяет сохранить их общую структурность и восстанавливать рельеф кожи, заживление ран после операции происходит гладко, с хорошим косметическим результатом.

Как указано выше, в настоящей выборке пациентов с доброкачественными опухолями век наиболее часто встречали опухоли меланоцитарного происхождения (невусы). По данным литературы, невусы проходят закономерный динамический цикл в своем развитии с периодами активного роста, покоя и инволюции [11, 18]. Считается, что опасны и требуют лечения прогрессирующие невусы, поскольку могут являться предшественниками меланомы и трансформируются в нее в 66% случаев [3]. По мнению других авторов, от 4 до 6 % врожденных невусов претерпевают злокачественное перерождение в меланому [19]. В этой связи удалять невусы с признаками активного роста следует в обязательном порядке.

В отделе офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России радиоволновой метод удаления эпибульбарных опухолей применяется с 1998 г. [7, 12–14]. В качестве лечения доброкачественных опухолей век малых размеров радиохирургия с применением микрохирургической техники показала себя эффективной технологией. Комбинирование различных режимов радионожа в ходе операции по удалению доброкачественных опухолей век позволяло соблюсти принцип экономного иссечения окружающих нормальных тканей без нарушения правил абластики. Ни один из пациентов не предъявил жалоб на послеоперационную боль в области хирургического вмешательства. Все больные были удовлетворены косметическим результатом. Радиохирургия позволила не только радикально удалить опухоль, но и сохранить функции и анатомо-топографические соотношения тканей пораженного органа зрения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доброкачественные опухоли век, особенно меланоцитарного происхождения, подлежат обязательному динамическому наблюдению, и при выявлении минимальных признаков прогрессии показано их хирургическое удаление. Радиохирургическое лечение с использованием микрохирургической техники является методом выбора в лечении малых доброкачественных опухолей век и зависит от размеров опухоли, ее локализации и характера опухолевого процесса, его применение с соблюдением правил радикальности и антибластичности позволяет сохранить зрительные функции с одномоментным проведением хирургического лечения, обеспечивая нормальные анатомо-топографические соотношения переднего отрезка глаза и высокое качество жизни пациента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баграмов Р., Александров М., Сергеев Ю. Лазеры в стоматологии, челюстно-лицевой и реконструктивно-пластической хирургии. М.: Техносфера, 2016. 608 с.

Bagramov R., Aleksandrov M., Sergeev Yu. Lasers in dentistry, maxillofacial and reconstructive plastic surgery. Moscow: Tekhnosfera, 2016. 608 p. [In Russian].

2. Бородин Ю.И., Вальский В.В. Предварительные результаты лечения злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза редуцированной дозой протонного излучения. *Рос. офтальмол. журн*. 2009; 2 (3): 4–7.

Borodin Yu.I., Val'skiy V.V. Preliminary results of the treatment of malignant tumors of the accessory apparatus of the eye with a reduced dose of proton radiation. *Rossiyskiy oftal'mologicheskiy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*. 2009; 2 (3): 4–7. [In Russian].

3. Бровкина А.Ф. Офтальмоонкология. М.: Медицина, 2002. 424 с.

Brovkina A.F. Ophthalmooncology. Moscow: Meditsina, 2002. 424 p. [In Russian].

4. Воробьев А.А. Клиническая анатомия и оперативная хирургия головы и шеи. М.: ЭЛБИ-СПб, 2017. 288 с.

Vorob'ev A.A. Clinical anatomy and operative surgery of the head and neck. Moscow: ELBI-SPb, 2017. 288 p. [In Russian].

5. Габдрахманова А.Ф., Галлямов М.К., Жуманиязов А.Ж., Бабушкин А.Э. Случаи эпителиомы Малерба и лимфоцитомы кожи века. *Вестн. офтальмологии*. 2003; 119 (1): 42–43.

Gabdrakhmanova A.F., Gallyamov M.K., Zhumaniyazov A.Zh., Babushkin A.E. Cases of the epithelioma of Malherbe and the lymphocytoma of the skin of the century. *Vestnik oftal'mologii = The Russian Annals of Ophthalmology*. 2003; 119 (1): 42–43. [In Russian].

6. Гришина Е.Е., Федотова О.Ф., Лернер М.Ю., Агеенкова О.А. Радиохирургия опухолей и опухолеподобных образований придаточного аппарата глаза. IV Рос. Симпозиум по рефракционной и пластической хирургии глаза: сб. статей. М., 2002. 291–299.

Grishina E.E., Fedotova O.F., Lerner M.Yu., Ageenkova O.A. Radiosurgery of tumors and tumor-like formations of the accessory apparatus of the eye. IV Russian. Symposium on eye refractive and plastic surgery: coll. articles. Moscow, 2002. 291–299. [In Russian].

7. Гусев Г.А. Использование углекислотного лазера в лечении гигантских невусов век. Достижения и перспективы офтальмоонкологии: сб. тр. МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца. М., 2001. 106–111.

Gusev G.A. The use of carbon dioxide laser in the treatment of giant nevi eyelids. Achievements and prospects of ophthalmic oncology: coll. proc. Helmholtz Moscow Research Institute for Eye Diseases. Moscow, 2001. 106–111. [In Russian].

8. Клиническая хирургия. Национальное руководство. В 3 т. Т. 2. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 346 с.

Clinical surgery. National leaderhip. In 3 volumes. Vol. 2. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. 346 p. [In Russian].

9. Лихванцева В.Г., Анурова О.А. Опухоли век: клиника, диагностика, лечение. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2007. 447 с.

Likhvantseva V.G., Anurova O.A. Eyelid tumors: clinic, diagnosis, treatment. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 447 p. [In Russian].

10. Новиков С.А., Онищенко Е.С. Результаты лечения заболеваний вспомогательных органов глаза с применением радиоволновой и лазерной хирургии. *Соврем. оптометрия*. 2011; (9): 35–42.

Novikov S.A., Onishchenko E.S. Результаты лечения заболеваний вспомогательных органов глаза с применением радиоволновой и лазерной хирургии. *Sovremennaya optometriya = Modern optometry*. 2011; (9): 35–42. [In Russian].

11. Потекаев Н.Н., Акимов В.Г. Дифференциальная диагностика и лечение кожных болезней. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 456 с.

Potekaev N.N., Akimov V.G. Differential diagnosis and treatment of skin diseases. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 456 p. [In Russian].

12. Саакян С.В. Радиоволновая хирургия в лечении эпибульбарных новообразований у детей. Радиоволновая хирургия на современном этапе: мат. конгр. Москва, 27–28 мая 2004 г. М., 2004. 234–235.

Saakyan S.V. Radio wave surgery in the treatment of epibulbar neoplasms in children. Current radio wave surgery: congress materials. Moscow, May 27–28, 2004. Moscow, 2004. 234–235. [In Russian].

13. Саакян С.В., Гусев Г.А., Иванова О.А., Тацков Р.А. Преимущество радиохирургического метода лечения эпибульбарных новообразований. VII съезд офтальмологов России: тез. докл. Москва, 16–19 мая 2000 г. М., 2005. 511–512.

Saakyan S.V., Gusev G.A., Ivanova O.A., Tatskov R.A. The advantage of the radiosurgical method of treatment of epibulbar tumors. VII Congress of Ophthalmologists in Russia: abstr. Moscow, 2005. 511–512. [In Russian].

14. Саакян С.В., Иванова О.А., Гусев Г.А., Мякошина Е.Б. Радиохирургическое реконструктивно-восстановительное лечение невусов конъюнктивы. Современные технологии и возможности реконструктивно-восстановительной и эстетической хирургии: сб. статей II Междунар. конф. Москва, 19–20 октября 2010 г. М., 2010. 19–21.

Saakyan S.V., Ivanova O.A., Gusev G.A., Myakoshina E.B. Radiosurgical reconstructive treatment of conjunctival nevi. Modern technologies and possibilities of reconstructive and aesthetic surgery: coll. articles of II International Conference. Moscow, 2010. 19–21. [In Russian].

15. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 880 с.

Strukov A.I., Serov V.V. Pathological anatomy. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 880 p. [In Russian].

16. Ступин В.А., Смирнова Г.О., Мантурова Н.Е., Хомякова Е.Н., Коган Е.А., Поливода М.Д., Силина Е.В., Синельникова Т.Г. Сравнительный анализ процессов заживления хирургических ран при использовании различных видов радиочастотных режущих устройств и металлического скальпеля. *Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье»*. 2010; (4): 9–14.

Stupin V.A., Smirnova G.O., Manturova N.E., Homyakova E.N., Kogan E.A., Polivoda M.D., Silina E.V., Sinel'nikova T.G. Comparative analysis of the healing process of surgical wounds using different types of radiofrequency cutting devices and a metal scalpel. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i yego zdorov'ye» = Kursk Scientific and Practical Bulletin «Man and His Health»*. 2010; (4): 9–14. [In Russian].

17. Таганов А.В., Бизунова М.А., Криницина Ю.М., Сергеева И.Г. Анализ методов лечения келоидных рубцов. *Клин. дерматология и венерология*. 2017; (3): 97–102.

Taganov A.V., Bizunova M.A., Krinitsina Yu.M., Sergeeva I.G. Analysis of the treatment of keloid scars. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = The Russian Journal of Dermatology and Venereology*. 2017; (3): 97–102. [In Russian].

18. Червонная Л.В. Пигментные опухоли кожи. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 224 с.

Chervonnaya L.V. Pigment tumors of the skin. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 224 p. [In Russian].

19. Шилдс Дж.А., Шилдс К.Л. Опухоли век, конъюнктивы и глазницы. Атлас и справочник: в 2 т. Т. 1. М.: Изд-во Панфилова, 2017. 448 с.

Shields J.A., Shields C.L. Eyelid, conjunctival, and orbital tumors: An atlas and textbook. Wolters Kluwer, 2015. 823 p.

20. Bezerra S.M.C., Jardim M.M.L. Electrosurgery // Update in cosmetic dermatology. Eds. A. Tosti, D. Hexsel. N.Y.: Springer, 2013. 214 p.

21. Sarnoff D., Gotkin R., Doerfler L., Gustafson C. The safety of laser skin resurfacing with the microablative carbon dioxide laser and review of the literature. *J. Drugs Dermatol*. 2018; 17 (11): 1157–1162

22. Taheri A., Mansoori P., Sandoval L.F., Feldman S.R., Pearce D., Williford P. Electrosurgery: part I. Basics and principles. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2014; 70 (4): 591.e1–591.e14.

23. Woo K.I., Choi C.Y. High-frequency radiowave electrosurgery for persistent conjunctival chemosis following cosmetic blepharoplasty. *Plast. Reconstr. Surg*. 2014; 133 (6): 1336–1342.

Сведения об авторах:

Саакян С.В., д.м.н., проф.
Харлампиди М.П., к.м.н.
Мякошина Е.Б. , к.м.н., e-mail: myakoshina@mail.ru
Тацков Р.А.
Гусев Г.А., к.м.н.

Information about authors:

Saakyan S.V., doctor of medical sciences, professor
Kharlampidi M.P., candidate of medical sciences
Myakoshina E.B., candidate of medical sciences, e-mail: myakoshina@mail.ru
Tatskov R.A.
Gusev G.A., candidate of medical sciences

УДК 616-002.3 DOI: 10.15372/SSMJ20190417

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ГЛУБОКИМИ ФЛЕГМОНАМИ ШЕИ И ВТОРИЧНЫМ ОСТРЫМ МЕДИАСТИНИТОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ

Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА[1], Юрий Владимирович ЧИКИНЕВ[2,3], Евгений Александрович ДРОБЯЗГИН[2,3], Татьяна Сергеевна КУТЕПОВА[3]

[1] *Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии им. С.Г. Суханова 614013, г. Пермь, ул. Маршала Жукова, 35*

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

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

Цель исследования – улучшение результатов лечения пациентов с глубокими флегмонами шеи и острым вторичным медиастинитом. **Материал и методы.** Проведен анализ 81 истории болезни пациентов с глубокими флегмонами шеи и 40 историй болезни пациентов с вторичным острым медиастинитом, проходивших обследование и лечение в областной клинической больнице, г. Новосибирск, за период с 2007 по 2017 г. Результаты лечения оценивали по динамике концентрации про- и противовоспалительных цитокинов ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1β/ИЛ-4 в сыворотке крови. **Результаты и их обсуждение.** У пациентов с глубокими флегмонами шеи и острым вторичным медиастинитом при применении в дополнение к основному лечению методики лаважа глубоких клетчаточных пространств шеи и средостения озонированным 0,9%-м раствором натрия хлорида отмечается более выраженное снижение интенсивности острого воспалительного процесса в послеоперационном периоде и, как следствие, более быстрая (в 1,2–3 раза) нормализация цитокинового статуса, чем при использовании стандартной методики лаважа.

Ключевые слова: глубокая флегмона шеи, медиастинит, лаваж озонированным раствором, про- и противовоспалительные цитокины.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Автор для переписки: Кутепова Т.С., e-mail: tgemini1388@mail.ru

Для цитирования: Пустоветова М.Г., Чикинев Ю.В., Дробязгин Е.А., Кутепова Т.С. Особенности цитокинового статуса у пациентов с глубокими флегмонами шеи и вторичным острым медиастинитом при различных способах лечения. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 137–142. doi: 10.15372/SSMJ20190417.

THE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH DEEP PHLEGMON OF THE NECK AND SECONDARY ACUTE MEDIASTINITIS UNDER DIFFERENT METHODS OF TREATMENT

Mariya Gennadievna PUSTOVETOVA[1], Yuriy Vladimirovich CHIKINEV[2,3], Evgeniy Aleksandrovich DROBYAZGIN[2,3], Tatiana Sergeevna KUTEPOVA[3]

[1] *Federal Centre for Cardiovascular Surgery n.a. S.G. Sukhanov 614013, Perm, Marshala Zhukova srt., 35*

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

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

The aim of the study was to improve the results of treatment of patients with deep neck phlegmon and acute secondary mediastinitis. **Material and methods.** 81 case histories of patients with deep neck phlegmon and 40 case histories of patients with secondary acute mediastinitis who underwent examination and treatment in the regional clinical hospital, Novosibirsk, for the period from 2007 to 2017 were analyzed. The results of treatment were evaluated by the dynamics

of changes in the serum concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1ß, IL-6, IL-8, IL-4, IL-1β/IL-4. **Results and discussion.** When applying the method of lavage of deep neck and mediastinum cellular spaces with ozonated 0,9 % sodium chloride solution, there is a 1,2-3-fold faster normalization of cytokine status compared to standard lavage, which indicates a more pronounced decrease in the intensity of the acute inflammatory process in the postoperative period.

Key words: deep neck phlegmon, mediastinitis, lavage with ozonated solution, pro- and anti-inflammatory cytokines.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Kutepova T.S., e-mail: tgemini1388@mail.ru

Citation: Pustovetova M.G., Chikinev Yu.V., Drobyazgin E.A., Kutepova T.S. The characteristics of cytokine status in patients with deep phlegmon of the neck and secondary acute mediastinitis under different methods of treatment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 137–142. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190417.

В настоящее время проблема диагностики и лечения острого медиастинита сохраняет свою актуальность из-за тяжести самого заболевания, отсутствия единой хирургической тактики, продолжительной нетрудоспособности больных и высокой вероятности неблагоприятных исходов [3, 6, 7, 10, 13]. Несмотря на значительные успехи в лечении, летальность при остром медиастините остается очень высокой и достигает 50 % и более [1, 2, 4, 9, 10, 12, 14, 15]. В настоящее время не существует универсального стандарта лечения заболевания, и каждый случай требует индивидуального подхода. Некоторое улучшение результатов лечения связано с рекомендациями применять при остром медиастините более агрессивную хирургическую тактику, которая способствует снижению числа осложнений и улучшению показателей выживаемости [1, 4, 5, 10, 14, 15]. Это служит поводом для поиска новых, более эффективных способов лаважа средостения [13, 16]. Одним из перспективных методов может явиться применение озонированных растворов.

Изложенное выше определяет цель исследования – улучшить результаты лечения пациентов с глубокими флегмонами шеи и острым вторичным медиастинитом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В данном исследовании отражены результаты анализа историй болезни 81 пациента с глубокими флегмонами шеи и 40 пациентов с вторичным острым медиастинитом, которые находились на лечении в отделении торакальной и челюстно-лицевой хирургии Государственной Новосибирской областной клинической больницы за период с 2007 до 2017 г. В исследование были включены пациенты с глубокими флегмонами шеи и с вторичным острым медиастинитом в возрасте от 15 до 70 лет без сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации. Критериями исключения из исследования являлись возраст пациента менее 15 лет и более 70 лет, туберкулез в активной стадии, хронические вирусные гепатиты В и С высокой степени активности, тяжелая сопутствующая патология (сахарный диабет I и II типа в стадии декомпенсации, хронические болезни почек V стадии, хроническая почечная недостаточность III–IV, хроническая легочно-сердечная недостаточность в стадии декомпенсации, недостаточность кровообращения III стадии), явления септического шока при поступлении и в первые часы после оперативного лечения, летальный исход в первые сутки от момента госпитализации.

В зависимости от способа лечения пациенты были разделены на четыре группы. В 1-ю и 3-ю группы вошли пациенты, при лечении которых использовались стандартные методики оперативного вмешательства и схемы ведения интенсивной терапии – соответственно 44 больных с глубокими флегмонами шеи и 22 человека с вторичным острым медиастинитом; у больных 2-й и 4-й групп в составе комплексного лечения дополнительно использовалась методика лаважа гнойной полости озонированным 0,9%-м раствором натрия хлорида – соответственно 37 пациентов с глубокими флегмонами шеи и 18 лиц с вторичным острым медиастинитом. В каждой группе случайным образом выделены подгруппы, куда вошли по 10 пациентов, в сыворотке крови которых методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем НПО «Вектор-Бест» (Кольцово) определялась концентрация про- и противовоспалительных цитокинов. Измерения выполняли на планшетном спектрофотометре Multiskan Spectrum («Thermo Fisher Scientific», США) при длине волны 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Содержание цитокинов выражали пг/мл, за нормальные значения принимали следующие: ФНО-α – 0–6 пг/мл,

Таблица 1

Распределение пациентов по этиопатогенезу, n (%)

Table 1

The distribution of patients by etiopathogenesis, n (%)

Этиология	Глубокие флегмоны шеи		Вторичный острый медиастинит	
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Одонтогенная	22 (50,0)	26 (70,3)	15 (68,2)	10 (55,6)
Тонзиллогенная	9 (20,5)	6 (16,2)	2 (9,1)	2 (11,1)
Аденофлегмона	10 (22,7)	4 (10,8)	4 (18,2)	4 (22,2)
Паратонзиллярный абсцесс	2 (4,5)	1 (2,7)	1 (4,5)	0 (0)
Абсцесс надгортанника	1 (2,3)	0 (0)	0 (0)	2 (11,1)

Таблица 2

Возраст пациентов и срок госпитализации в стационар от момента начала заболевания, Me (25 %; 75 %)

Table 2

Patient age and the period of hospitalization in the hospital from the time of onset of the disease, Me (25 %; 75 %)

Этиология	Глубокие флегмоны шеи		Вторичный острый медиастинит	
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Возраст, лет	34 (27; 45)	42 (30; 51)	47 (31; 58)	31 (24; 49)
Срок госпитализации, сут	4 (3; 5)	4 (3; 7)	5 (3;8)	4 (3; 6)

ИЛ-1β – 0–11 пг/мл, ИЛ-6 – 0–10 пг/мл, ИЛ-8 – 0–10 пг/мл, ИЛ-4 – 0–20 пг/мл.

Распределение пациентов по этиопатогенезу представлено в табл. 1, возраст и срок госпитализации в стационар от момента начала заболевания – в табл. 2; в группе 3 передним медиастинитом страдал один человек, задним – 14, тотальным – 7, в группе 4 – соответственно 0, 16 и 2.

Всем пациентам проведено хирургическое лечение, объем которого определялся в зависимости от локализации и распространенности воспалительного процесса: выполнялись вскрытие, ревизия и дренирование глубоких клетчаточных пространств шеи и средостения под общим обезболиванием в зависимости от локализации гнойного процесса. Далее в послеоперационном периоде осуществлялся лаваж 0,9%-м раствором натрия хлорида (пациентов основной группы – озонированным 0,9%-м раствором натрия хлорида) при подключении дренажной системы больного к системе активной аспирации в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии. Лаваж верхнего средостения и глубоких клетчаточных пространств шеи проводился с первых часов послеоперационного периода, лаваж нижнего средостения – с трех суток после операции в течение 5–7 дней.

Забор крови для определения уровня про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1β/ИЛ-4) проводился в день поступления в стационар, на 5-е и 10-е сутки послеоперационного периода, у пациентов с вторичным острым медиастинитом – также на 14-е сутки послеоперационного периода.

Распределение показателей в группах проверено на нормальность с использованием критерия Шапиро – Уилка. При нормальном распределении применяли параметрические методы: значения приведены в виде среднего арифметического (M) и среднеквадратичного отклонения (σ), $M \pm \sigma$. При распределении, отличном от нормального, данные представлены в виде медианы (Me), 25%-го (25 %) и 75%-го (75 %) процентилей. Для количественных сравнений в группах и оценки взаимного влияния признаков использовали критерий Манна – Уитни, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как следует из табл. 3, на 5-е сутки послеоперационного периода концентрация ФНО-α в группе 2 была ниже, чем в группе 1, на 50,5 %, а на 10-е сутки – на 48,3 % ($p < 0,05$). Отмечено

Таблица 3

Концентрация цитокинов у пациентов с глубокими флегмонами шеи (группы 1 и 2) и острым вторичным медиастинитом (группы 3 и 4)

Table 3

Cytokine concentration in patients with deep neck phlegmon (groups 1 and 2) and acute secondary mediastinitis (groups 3 and 4)

Содержание цитокина	Группа	Срок исследования			
		При поступлении	5-е сутки после операции	10-е сутки после операции	14-е сутки после операции
ФНО-α	1	7,2 ± 1,7	9,5 ± 1,6^{v}	8,7 ± 1,4^{v}	
	2	7,1 ± 0,5	4,7 ± 0,7*^{,v}	4,5 ± 0,8*^{,v}	
	3	9,7 ± 1,3	9,5 ± 1,8	8,2 ± 1,5	7,9 ± 1,3^{v}
	4	9,7 ± 1,1	5,8 ± 0,9*^{,v}	4,6 ± 0,9*^{,v}	3,2 ± 1,1*^{,v}
ИЛ-1β	1	50,2 ± 8,6	55,7 ± 18,4	42,8 ± 10,4^{v}	
	2	45,3 ± 7,9	18,5 ± 4,9*^{,v}	20,1 ± 5,3*^{,v}	
	3	58,3 ± 4,2	61,9 ± 6,6	52,9 ± 6,8	40,2 ± 3,4^{,v}
	4	50,4 ± 8,5	40,5 ± 8,1*	28,9 ± 11,5*^{,v}	21,2 ± 2,4*^{,v}
ИЛ-6	1	80,2 ± 3,7	82,5 ± 1,9	61,8 ± 2,1^{v}	
	2	73,4 ± 5,7	44,5 ± 8,1*^{,v}	43,3 ± 7,2*^{,v}	
	3	30,2 ± 10,2	41,1 ± 12,2	44,9 ± 9,3	32,2 ± 4,1
	4	31,2 ± 4,7	31,7 ± 4,8	27,1 ± 5,0*	15,4 ± 5,3*^{,v}
ИЛ-8	1	20,5 ± 3,4	24,0 ± 11,2	18,6 ± 31,1	
	2	23,5 ± 2,1	18,4 ± 5,1*^{,v}	16,0 ± 3,7^{v}	
	3	15,5 ± 18,6	35,4 ± 11,2^{v}	22,2 ± 7,4	22,4 ± 3,2
	4	16,2 ± 4,4	21,0 ± 6,8	17,1 ± 5,6	10,3 ± 3,5*^{,v}
ИЛ-4	1	25,7 ± 5,6	31,6 ± 4,3^{v}	29,2 ± 11,1	
	2	27,8 ± 6,3	30,2 ± 5,8	19,4 ± 4,8*^{,v}	
	3	24,9 ± 2,7	48,8 ± 5,4^{v}	30,9 ± 4,9	28,4 ± 5,4
	4	31,5 ± 1,7	42,2 ± 1,2	28,1 ± 1,0	16,7 ± 2,4*^{,v}
ИЛ-1β/ИЛ-4	1	1,9 ± 0,9	1,8 ± 0,7	1,5 ± 1,2	
	2	1,6 ± 1,1	0,6 ± 0,2*	1,0 ± 0,8*^{,v}	
	3	2,3 ± 1,2	1,3 ± 0,9	1,7 ± 1,3	1,7 ± 1,1
	4	1,6 ± 1,3*	0,9 ± 0,5^{v}	1,0 ± 0,4*^{,v}	1,3 ± 1,0^{v}

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – пациентов со стандартным лечением, ^{v} – при поступлении.

статистически значимое уменьшение содержания ИЛ-1β на 5-е и 10-е сутки после операции у пациентов группы 2 по сравнению с величиной показателя больных группы 1 на 66,8 и 53 % соответственно ($p < 0,05$), концентрации ИЛ-6 – на 46,1 и 29,9 % ($p < 0,05$); уровень ИЛ-8 на 5-е сутки был ниже на 23,3 %, чем в группе 1 ($p < 0,05$), на 10-е сутки – на 13,9 % ($p > 0,05$). Содержание ИЛ-4 на 10-е сутки послеоперационного периода в группе 2 было на 33,6 % ниже, чем в группе 1 ($p < 0,05$).

Концентрация ФНО-α у пациентов с вторичным острым медиастинитом, в составе комплексного лечения которых дополнительно использовалась методика лаважа озонированным 0,9%-м раствором натрия хлорида (группа 4), была меньше, чем у пациентов группы 3 (сравнения) на 5-е, 10-е и 14-е сутки послеоперационного периода на 38,9, 43,9 и 59,5 % соответственно ($p < 0,05$), концентрация ИЛ-1β – на 34,6, 45,4 и 47,3 % ($p < 0,05$). Содержание ИЛ-6 в группе 4 было статистически значимо ниже, чем в группе 3, на 10-е и 14-е сутки послеоперационного периода (соответственно на 39,6 и 52,2 %, $p < 0,05$). Статистически значимое различие между группами 3 и 4 по уровню ИЛ-8 и ИЛ-4 наблюдалось только на 14-е сутки послеоперационного периода (на 54 и 41,2 % соответственно, $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные указывают на эффективность использования метода лечения пациентов с глубокими флегмонами шеи и вторичным острым медиастинитом озонированным раствором. Так, у больных с глубокими флегмонами шеи применение такой терапии (основная группа) сопровождается тенденцией к снижению выраженности воспалительного процесса через 5 дней после операции, что проявляется увеличением концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и снижением содержания противовоспалительных цитокинов; к 10-м суткам уровень большинства исследованных цитокинов нормализуется. У пациентов с вторичным острым медиастинитом при применении методики лаважа озонированным раствором тенденция к снижению содержания провоспалительных цитокинов отмечается на 10-е сутки послеоперационного периода на фоне повышенной концентрации ИЛ-4, тогда как у пациентов группы сравнения воспалительный процесс на этом сроке остается выраженным. К 14-м суткам после операции у пациентов основной группы концентрации исследованных цитокинов нормализуются. В целом, у пациентов основной группы отмечается более быстрая (в 1,2–3 раза) нормализация цитокинового статуса, чем у пациентов группы сравнения, что обусловлено более быстрым стиханием системной воспалительной реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с глубокими флегмонами шеи при использовании методики озонирования отмечается более низкая, чем при применении стандартной методики лаважа, концентрация про- и противовоспалительных (ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6) цитокинов, а также соотношения ИЛ-1β/ИЛ-4 в сыворотке крови на 5-е и 10-е сутки послеоперационного периода в 1,5–2,5 раза, а у пациентов с вторичным острым медиастинитом – в 2–3,5 раза, что указывает на более выраженное уменьшение интенсивности острого воспалительного процесса в послеоперационном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашиналиев А.А., Степанчук И.В., Бейшеналиев А.С. Хирургическое лечение острого медиастинита. *Вестн. КГМА им. И.К. Ахунбаева*. 2016; (2): 95–97.

Ashinaliev A.A., Stepanchuk I.V., Beyshenaliev A.S. Surgical treatment of acute mediastinitis. *Vestnik Kyrgyzskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii imeni Isy Konoyevicha Akhunbayeva = Bulletin of the Kyrgyz State Medical Academy named after Isa Konoevich Akhunbaye*. 2016; (2): 95–97. [In Russian].

2. Даниелян Ш.Н., Абакумов М.М., Погодина А.Н., Шарифуллин Ф.А., Бармина Т.Г., Квардакова О.В., Черненькая Т.В. Диагностика и хирургическое лечение посттравматического гнойного медиастинита. *Хирургия*. 2011; (12): 47–54.

Danielyan Sh.N., Abakumov M.M., Pogodina A.N., Sharifullin F.A., Barmina T.G., Kvardakova O.V., Chernen'kaja T.V. Diagnosis and surgical treatment of posttraumatic purulent mediastinitis. *Khirurgia = Surgery*. 2011; (12): 47–54. [In Russian].

3. Доброквашин С.В., Сысоев П.Н., Демьянов С.Л. Хирургическое лечение больных с острым медиастинитом. *Вестн. соврем. клин. медицины*. 2014; (7): 64–67.

Dobrokvashin S.V., Sysoev P.N., Dem'yanov S.L. Surgical treatment of patients with acute mediastinitis. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*. 2014; (7): 64–67. [In Russian].

4. Катанов Е.С., Матвеев В.Ю., Столяров С.И., Краснов Г.Н., Мизуров Н.А. Опыт лечения больных острым одонтогенным гнойным медиастинитом. *Практ. медицина*. 2016; 4 (1): 102–106.

Katanov E.S., Matveev V.Yu., Stolyarov S.I., Krasnov G.N., Mizurov N.A. Experience of treatment of patients with acute odontogenic purulent mediastinitis. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*. 2016; 4 (1): 102–106. [In Russian].

5. Лишов Е.В., Харитонов А.А., Путинцев А.М. Особенности хирургического лечения анаэробных инфекций глубоких пространств шеи, осложненных медиастинитом. *Acta Biomed. Sci*. 2017; 2 (6): 130–133.

Lishov E.V., Kharitonov A.A., Putintsev A.M. Features of surgical treatment of anaerobic infections of deep neck spaces complicated by mediastinitis. *Acta Biomed. Sci*. 2017; 2 (6): 130–133. [In Russian].

6. Пузанов Д.П., Славинский В.Г. Хирургическое лечение верхних медиастинитов. *Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед*. 2015; (8-4): 686–688.

Puzanov D.P., Slavinskiy V.G. Surgical treatment of upper mediastinitis. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Basic Research*. 2015; (8-4): 686-688. [In Russian].

7. Свистушкин В.М., Мустафаев Д.М. Гнойно-воспалительные заболевания шеи: современный взгляд на ведение пациентов. *Мед. совет*. 2016; (18): 58–63.

Svistushkin V.M., Mustafaev D.M. Purulent-inflammatory diseases of the neck: a modern view on the management of patients. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2016; (18): 58–63. [In Russian].

8. Столяров С.И., Данилов В.В. Превентивная медиастинотомия при нисходящем одонтогенном

медиастините. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 69 (2): 74–76.

Stolyarov S.I., Danilov V.V. Preventive mediastinotomy in descending odontogenic mediastinitis. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka = Health. Medical Ecology. Science*. 2017; 69 (2): 74–76. [In Russian].

9. Шевчук И.М., Снежко С.С. Причины и пути распространения флегмон шеи, осложненных нисходящим гнойным медиастинитом. *Хирургия. Вост. Европа*. 2014; (4): 9–15.

Shevchuk I.M., Snezhko S.S. Causes and ways of distribution of phlegmons of the neck, complicated by descending suppurative mediastinitis. *Khirurgiya. Vostochnaya Yevropa = Surgery. Eastern Europe*. 2014; (4): 9–15. [In Russian].

10. Шонбин А.Н., Быстров Д.О., Заволжин А.С., Елизаров М.В., Ярковой М.А. Медиастинит после кардиохирургических операций. *Анналы хирургии*. 2012; (4): 56–60.

Shonbin A.N., Bystrov D.O., Zavolzhin A.S., Elizarov M.V., Yarkovoy M.A. Mediastinitis after cardiac surgery. *Annaly khirurgii = Annals of Surgery*. 2012; (4): 56–60. [In Russian].

11. Юлдашев И.М., Ургуналиев Б.К., Ашиналиев А.А., Молдалиев Э.К., Юлдашева Д.Т., Касенова Н.С. Тотальный одонтогенный медиастинит как осложнение гнилостно-некротической флегмоны дна полости рта. *Тихоокеан. мед. журн*. 2011; (3): 97–98.

Yuldashev I.M., Urgunaliev B.K., Ashinaliev A.A., Moldaliev E.K., Yuldasheva D.T., Kasenova N.S. Total odontogenic mediastinitis as a complication of the putrefactive-necrotic phlegmon of the bottom of the oral cavity. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*. 2011; (3): 97–98. [In Russian].

12. Gib M.C., Alvarez J.S., Wender O.C. Mediastinitis: mortality rate comparing single-stage surgical approach and preconditioning of wound. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc*. 2013; 28 (2): 200–207.

13. Freeman R.K., Vallieres E., Verrier E.D. Descending necrotizing mediastinitis: an analysis of the effects of serial surgical debridement on patient mortality. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2000; 119: 260–266.

14. Kocher G.J., Hoksch B., Caversaccio M., Wiegand J., Schmid R.A. Diffuse descending necrotizing mediastinitis: surgical therapy and outcome in a single-centre series. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2012; 42 (4): 66–72.

15. Liao Y.S., Lai C.C., Tan C.K., Lin S.H. Deep neck infection with descending necrotizing mediastinitis presenting with out-of-hospital cardiac arrest. *QJM*. 2013; 106 (7): 663–665.

16. Mihos P., Potaris K., Gakidis I., Papadakis D., Rallis G. Management of descending necrotizing mediastinitis. *J. Oral Maxillofac. Surg*. 2004; (8): 966–972.

Сведения об авторах:

Пустоветова М.Г., д.м.н., проф., e-mail: patophisiolog@mail.ru
Чикинев Ю.В., д.м.н., проф., e-mail: chikinev@inbox.ru
Дробязгин Е.А., д.м.н., e-mail: evgenyidrob@inbox.ru
Кутепова Т.С., e-mail: tgemini1388@mail.ru

Information about authors:

Pustovetova M.G., doctor of medical sciences, professor, e-mail: patophisiolog@mail.ru
Chikinev Yu.V., doctor of medical sciences, professor, e-mail: chikinev@inbox.ru
Drobyazgin E.A., doctor of medical sciences, e-mail: evgenyidrob@inbox.ru
Kutepova T.S., e-mail: tgemini1388@mail.ru

УДК 612.1/8+616.12-008.331.1 DOI: 10.15372/SSMJ20190418

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ РИТМА СЕРДЦА У ПОДРОСТКОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Алина Михайловна ВАЛЕЕВА[1], Олег Викторович СОРОКИН[2], Жанна Валерьевна НЕФЕДОВА[3], Виктория Геннадьевна КАЙНАРА[4], Людмила Михайловна ПАНАСЕНКО[3], Людмила Петровна ДЕРЯГИНА[3], Нина Петровна КАРЕВА[3]

[1] *Новосибирский государственный университет*
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

[2] *НКО Национальная аюрведическая медицинская ассоциация*
630108, г. Новосибирск, 1-й переулок Пархоменко, 14

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

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

Кардиоинтервалография является важным методом анализа регуляции вариабельности ритма сердца, позволяющим оценить баланс всего спектра гуморально-метаболических и вегетативных воздействий как в условиях физиологического покоя, так и при различных функциональных пробах. Отмечено, что у гипертоников в большинстве случаев наблюдается хроническое преобладание эрготрофных метаболических реакций, отражающих системное напряжение в механизмах регуляции. Целью нашего исследования был сравнительный анализ особенностей механизмов регуляции ритма сердца у подростков с верифицированным диагнозом эссенциальной гипертензии и их здоровых сверстников. **Материал и методы.** В исследовании приняли участие 50 подростков (12–16 лет), среди которых было 26 мальчиков и 24 девочки, с лабильной эссенциальной АГ и АГ 1-й степени на фоне проводимой стандартной медикаментозной коррекции артериального давления (эналаприл 0,58 мг/кг в сут). Всем участникам проводилась запись не менее 512 кардиоциклов в условиях физиологического покоя в положении сидя, а также регистрация артериального давления. **Результаты и их обсуждение.** Нами обнаружено, что у подростков с эссенциальной гипертензией регистрируется достоверно меньшая (на 15 %), чем у здоровых подростков, средняя длительность сердечного цикла в сочетании с уменьшением вариационного размаха, что указывает на некоторую ригидность механизмов регуляции сердечного ритма. Относительное снижение доли высокочастотного компонента спектра в сравнении с низкочастотным и очень низкочастотным диапазонами у подростков с гипертонией также указывает на склонность к преобладанию симпатикотонических влияний с преимущественным вовлечением структур диэнцефальной области и ствола мозга. Выявлена обратная связь между степенью вариабельности длительности сердечного цикла (индексы SDNN, MxDMn, MxRMn, RMSSD, VR) и величиной диастолического артериального давления как у здоровых подростков, так и страдающих АГ. **Заключение.** Нами обнаружены закономерные изменения в регуляции ритма сердца у подростков с гипертонией, которые могут выступать маркерами ее прогредиентного развития и использоваться клиницистами для выработки более персонализированных подходов к медикаментозной терапии.

Ключевые слова: подростки, эссенциальная гипертензия, кардиоинтервалография, вариабельность сердечного ритма.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие финансовой поддержки и конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

Автор для переписки: Валеева А.М., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

Для цитирования: Валеева А.М., Сорокин О.В., Нефедова Ж.В., Кайнара В.Г., Панасенко Л.М., Дерягина Л.П., Карева Н.П. Особенности регуляции ритма сердца у подростков с эссенциальной гипертензией. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 143–149. doi: 10.15372/SSMJ20190418.

FEATURES OF HEART RATE REGULATION IN ADOLESCENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION

Alina Mikhaylovna VALEEVA[1], Oleg Viktorovich SOROKIN[2], Zhanna Valerievna NEFEDOVA[3], Victoria Gennad'evna KAYNARA[4], Lyudmila Mikhaylovna PANASENKO[3], Lyudmila Petrovna DERYAGINA[3], Nina Petrovna KAREVA[3]

[1] *Novosibirsk State University*
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 1

[2] *National Ayurvedic Medical Association*
630108, Novosibirsk, Parkhomenko 1st ln., 14

[3] *Novosibirsk State Medical University*
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

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

Cardiointervalography is an important method of analyzing the regulation of heart rate variability, which allows evaluating the balance of the entire spectrum of humoral-metabolic and vegetative effects, both in condition of physiological rest and in various functional tests. It is noted that in hypertensive patients, in most cases, there is a chronic predominance of ergotrophic metabolic reactions that reflect the system tension in the regulatory mechanisms. The aim of our study was to conduct a comparative analysis of the features of the mechanisms of heart rate regulation in adolescents with confirmed essential hypertension and their healthy age mates. **Material and methods.** The study involved 50 adolescents (12–16 years of age) – 26 boys and 24 girls with labile essential hypertension (EHT) and stage 1 HT on the background of the standard medical correction of blood pressure (enalapril 0,58 mg/kg per day). Each participant of the study and control group underwent recording of at least 512 cardio cycles in the state of physiological rest in a sitting position, as well as registration of blood pressure. **Results and discussion.** We have found that for adolescents with EHT a significantly lower (by 15 %) average duration of the heart cycle is typical in combination with a decrease in the variation range, which indicates some rigidity of the heart rate regulatory mechanisms. The relative decrease in the proportion of high-frequency spectrum components in comparison with the low-frequency and very low-frequency ranges in adolescents with hypertension also indicated a tendency to predominance of sympathicotonic effects with the predominant involvement of the structures of the diencephalic region and the brain stem. At the same time blood pressure inversely correlated with the index of the variation range of cardiointervals, reflecting the lower adaptive potential of the heart rate regulation mechanisms. **Conclusion.** We have found regular changes in the regulation of heart rate in adolescents with hypertension, that can be taken as markers of its progressive development and used by clinicians to develop more personalized approaches to medication treatment.

Key words: adolescents, essential hypertension, cardiointervalography, heart rate variability.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.
Correspondence author: Valeeva A.M., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com
Citation: Valeeva A.M., Sorokin O.V., Nefedova Zh.V., Kaynara V.G., Panasenko L.M., Deryagina L.P., Kareva N.P. Features of heart rate regulation in adolescents with essential hypertension. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 143–149. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190418.

Распространенность артериальной гипертензии (АГ) в различных возрастных категориях и ее роль в развитии сердечно-сосудистых катастроф остаются важнейшей проблемой современной медицины. Для разработки мер профилактики, оптимального лечения АГ необходимо детальное изучение влияния всех факторов, способствующих ее развитию и прогрессированию. Одним из перспективных направлений оценки прогноза и тактики лечения АГ является изучение особенностей механизмов регуляции вариабельности ритма сердца (ВРС) [1, 4, 6, 7, 12, 14, 15, 20, 26]. Изменение баланса симпатических и вагусных влияний на ритм сердца считается одним из предикторов развития эссенциальной гипертензии (ЭГ) и носит прогностический характер [16–19, 21, 23–25]. В большинстве случаев для его определения используют методы временного и спектрального анализа периодограмм вариабельности длительности сердечного ритма [14].

Анализ литературы показывает, что этот вопрос изучался на разных возрастных категориях, однако данные по подростковому возрасту носят противоречивый характер, что, по нашему мнению, связано с особенностями популяционной выборки в зависимости от географического региона [8, 9, 11, 23].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явился анализ особенностей вегетативной регуляции ритма сердца у здоровых подростков и подростков, имеющих диагноз эссенциальной гипертензии, проживающих в Сибирском федеральном округе, большая часть в г. Новосибирске.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в период с 2013 по 2017 г. на базе ГБУЗ НСО «Детская городская клиническая больница № 1» и средней общеобразовательной школы № 72 г. Новосибирска. В исследовании приняли участие 50 подростков 12–16 лет, среди которых было 26 мальчиков и 24 девочки, с лабильной эссенциальной АГ и АГ 1-й степени на фоне проводимой стандартной медикаментозной коррекции артериального давления (АД) (эналаприл 0,58 мг/кг в сутки). Диагностика и лечение АГ проводились на основе соответствующих методических рекомендаций экспертов Всероссийского научного общества кардиологов и ассоциации детских кардиологов России [2]. При верификации диагноза «эссенциальная гипертензия» учитывались случаи возникновения АГ, которые не были связаны с патологией какого-либо внутреннего органа. Давность течения АГ – от 6 мес. до 3 лет. При поступлении и на 14-й день исследования выполнялось суточное мониторирование АД.

Контрольную группу составили 80 условно здоровых подростков (I группа здоровья) с частотой сердечных сокращений более 70 уд./мин, нормальным АД, отсутствием АГ у родственников первой степени. Кардиоинтервалография (КИГ) и регистрация АД среди девочек проводились во 2-ю фазу менструального цикла, что исключает влияние эстрогенов на данные показатели и устраняет различия в соответствии с полом. КИГ выполнялась в положении сидя в течение 5 мин в условиях физиологического покоя с помощью прибора «ВедаПульс» (ООО «Биоквант России»; регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФСР 2011/12389 от 29 июля 2014 г.).

Переменные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (Me (25 %–75 %)), для оценки различий применяли критерий Манна – Уитни. Сравнение коэффициентов корреляции выполняли с использованием z-преобразования Фишера. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Все исследования были выполнены с заполненного информированного согласия и соответствовали этическим нормам Хельсинкской декларации (выписка из протокола № 60 от 20 декабря 2013 г. заседания Комитета по этике Новосибирского государственного медицинского университета).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что у подростков с эссенциальной гипертензией независимо от пола регистрируется достоверно более низкая (на 14,8 %) средняя длительность сердечного цикла, чем у здоровых подростков (табл. 1). В сочетании с уменьшением среднеквадратичного размаха (SDNN) на

Таблица 1

Сравнение фоновых значений КИГ здоровых подростков и подростков с эссенциальной гипертензией

Table 1

Comparison of the cardiointervalography background values in healthy adolescents and adolescents with essential hypertension

Параметр	Здоровые подростки	Подростки с ЭГ	Уровень значимости различий
RRNN, мс	698,3 (657–741,05)	594,9 (558–642,3)	0,0001
SDNN, мс	52,4 (38,85–65,1)	36,8 (28,8–45,1)	0,0002
MxDMn, мс	232 (186–296,05)	181,55 (138,7–208,3)	0,0004
Amo, %	36,25 (28,25–47,8)	49,65 (44,5–58,1)	0,0001
IN, усл. ед.	114,75 (71,9–203,5)	233,95 (168,7–333,4)	0,0001
IC, усл. ед.	3,2 (1,6–4,45)	1,45 (0,98–2,2)	0,0010

Примечание. Здесь и в табл. 2 RRNN – среднее значение длительности сердечного цикла; SDNN – стандартное отклонение RR; MxDMn – разность между максимальным и минимальным значениями кардиоинтервалов; Amo (амплитуда моды) – число кардиоинтервалов в процентах, соответствующих диапазону моды; IC – индекс централизации; IN – индекс напряжения регуляторных систем.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции показателей КИГ с величиной диастолического АД здоровых подростков и подростков с эссенциальной гипертензией

Table 2

Correlation coefficients of cardiointervalography indices and the diastolic pressure in healthy adolescents and adolescents with essential hypertension

Параметр	Здоровые подростки	Подростки с ЭГ
SDNN, мс	–0,4138 (p = 0,003)	–0,3948 (p = 0,034)
MxDMn, мс	–0,3740 (p = 0,009)	–0,4330 (p = 0,019)
MxRMn, мс	–0,3388 (p = 0,018)	–0,4993 (p = 0,006)
RMSSD, мс	–0,3301 (p = 0,022)	–0,3950 (p = 0,034)
VR, с	–0,3742 (p = 0,009)	–0,4330 (p = 0,019)
IN, усл. ед.	+0,4081 (p = 0,004)	–0,3484 (p = 0,064)

Примечание. MxRMn – отношение максимальной длительности кардиоинтервала к минимальной; RMSSD – квадратный корень из суммы квадратов разности пар последовательного ряда кардиоинтервалов; VR (вариационный размах) – разница между максимальным и минимальным интервалом значений RR (аналогичен MxRMn).

29,8 % и вариационного размаха (MxDMn) на 21,7 % это указывает на ригидность механизмов регуляции сердечного ритма у гипертоников, которая, по нашему мнению, связана с более высоким симпатическим тонусом, что подтверждает почти двукратная разница со здоровыми детьми по величине индекса напряжения регуляторных систем (IN), а также большая (на 13,4 %) амплитуда моды (Amo). Данные изменения нашли подтверждение в работе А.Ю. Черемисиной и соавт., в которой симпатикотонический тип регуляции оценивается в виде увеличения Amo на фоне повышенного АД [13].

Выявлена обратная связь между степенью вариабельности длительности сердечного цикла (индексы SDNN, MxDMn, MxRMn, RMSSD, VR) и величиной диастолического АД как у здоровых подростков, так страдающих АГ (табл. 2).

По нашим данным, наиболее чувствительным из всех параметров КИГ является индекс SDNN, который может выступать в качестве маркера прогрессирования гипертонии при проведении кардиоинтервалографического анализа. Наше предположение подтверждается некоторыми зарубежными работами на взрослой категории пациентов с гипертонией [21, 22].

Указанные выше особенности вегетативных нарушений у подростков с эссенциальной гипертензией еще более выраженно проявлялись в измененных индексах спектрального анализа ритма сердца. Так, общая мощность спектра (TP) у них более чем в два раза меньше, чем у здоровых подростков, что говорит о сниженной способности к адаптационным изменениям ритма сердца и указывает на патологически измененную реактивность нейрогуморальной регуляции на системном уровне (рисунок, *а*). При этом мощность спектра в диапазоне очень низких частот (VLF) у подростков-гипертоников почти в два раза выше, чем у здоровых (рисунок, *б*), что говорит о вовлечении в механизмы регуляции ритма сердца менее эффективных и более энергетически затратных надсегментарных структур мозга, связанных с эрготрофной функцией. Указанные особенности находятся в разумном согласии с ранее полученными данными [1], но противоречат результатам некоторых исследований, в частности Н.А. Ильямаковой и соавт. [10].

Показательны также реципрокные изменения в диапазонах сегментарной вегетативной регуляции. В частности, у детей-гипертоников мощность спектра в диапазоне высоких частот (HF) достоверно ниже (на 16 %, рисунок, *в*), а мощность спектра в диапазоне низких частот (LF) – выше (на 17 %, рисунок, *г*), чем у здоровых детей, что свидетельствует, соответственно, о сниженном сегментарном парасимпатическом и более высоком сегментарном симпатическом тонусе.

Результаты настоящего исследования не противоречат данным других авторов об особенностях вегетативной регуляции ритма сердца у подростков с эссенциальной гипертензией, будут полезны практикующим клиницистам для сравнительных исследований и предлагают ориентировочные коридоры параметров КИГ, характерных для детей Сибирского региона [1, 3, 5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показаны закономерные изменения в механизмах нейрогуморальной регуляции сердечного ритма по данным КИГ, которые отражают осо-

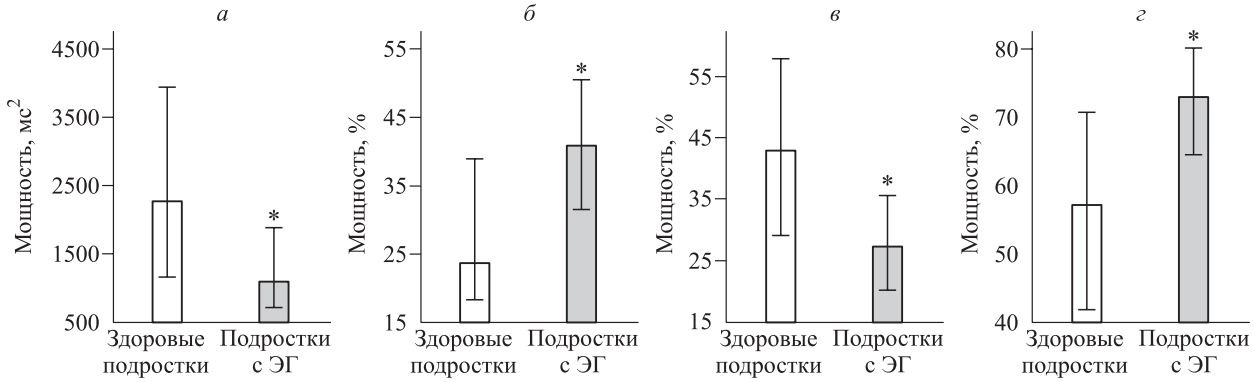

Рис. *Сравнение фоновых спектральных показателей КИГ здоровых детей и детей с АГ: а – TP (мощность в диапазоне от 0,003 до 0,4 Гц), б – VLF% (VLF в % от суммарной мощности колебаний), в – HFnu (HF в % от суммарной мощности колебаний), г – LFnu (LF в % от суммарной мощности колебаний); * – отличие от величины соответствующего показателя здоровых подростков статистически значимо при p < 0,0001*

Fig. *Comparison of the background spectral cardiointervalography indices in healthy adolescents and adolescents with essential hypertension: a – total power of the spectrum in the range from 0.003 to 0.4 Hz, б – VLF% (power of the spectrum of a very low-frequency variability range, % of the total power of fluctuations), в – HFnu (power of the spectrum of the high-frequency variability component, % of the total power of fluctuations), г – LFnu (power of the spectrum of the low-frequency variability component, % of the total power of fluctuations)*

бенности патогенеза артериальной гипертонии у подростков 12–16 лет. Обнаружена корреляция величины диастолического АД с некоторыми показателями вариабельности ритма сердца у подростков с эссенциальной гипертензией 12–16 лет, которые требуют дальнейшего изучения в зависимости от течения заболевания и проводимого лечения с целью совершенствования персонализированных подходов к медикаментозной и немедикаментозной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов В.В., Козлов В.А., Куликов В.Ю., Маркова Е.В., Сорокин О.В., Труфакин С.В. Факторный анализ параметров вегетативной регуляции сердечного ритма у детей. *Бюл. СО РАМН*. 2004; 24 (1): 32–39.

Abramov V.V., Kozlov V.A., Kulikov V.Yu., Markova E.V., Sorokin O.V., Trufakin S.V. Factor analysis of the parameters of the autonomic regulation of heart rhythm in children. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2004; 24 (1): 32–39.

2. Александров А.А., Балыкова Л.А., Бубнова М.Г., Васюкова О.В., Гнусаев С.Ф., Долгих В.В., Денисова Д.В., Дегтярева Е.А., Звездина И.В., Кисляк О.А., Ковалев И.А., Козлова Л.В., Конь И.Я., Ледяев М.Я., Ларионова З.Г., Лебедькова С.Е., Леонтьева И.В., Мясоедова С.Е., Павловская Е.В., Петеркова В.А., Ровда Ю.И., Розанов В.Б., Соболева М.К., Стародубова А.В., Ушакова С.А., Щербакова М.Ю., Яковлева Л.В. Национальные рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в детском и подростковом возрасте. *Рос. кардиол. журн*. 2012; (6, Прил. 1): 12–53.

Aleksandrov A.A., Balykova L.A., Bubnova M.G., Vasyukova O.V., Gnusaev S.F., Dolgikh V.V., Denisova D.V., Degtyareva E.A., Zvezdina I.V., Kislyak O.A., Kovalev I.A., Kozlova L.V., Kon' I.Ya., Ledyaev M. Ya., Larionova Z.G., Lebedkova S.E. Leontyeva I.V., Myasoedova S.E., Pavlovskaya E.V., Peterkova V.A., Rovda Yu.I., Rozanov V.B., Soboleva M.K., Starodubova A.V., Ushakova S.A., Shcherbakova M.Yu., Yakovleva L.V. National recommendations for the prevention of cardiovascular diseases in children and adolescents. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian journal of cardiology*. 2012; (6, Прил. 1): 12–53.

3. Антонова Л.К., Кушнир С.М., Кулакова Н.И., Павлова А.В., Антонов В.В., Богомолова Е.А. Вариабельность ритма сердца у подростков. *Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН*. 2007; (3): 63–64.

Antonova L.K., Kushnir S.M., Kulakova N.I., Pavlova A.V., Antonov V.V., Bogomolova E.A. Heart rate variability in adolescents. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian scientific center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2007; (3): 63–64. [In Russian].

4. Баевский Р.М., Иванов Г.Г. Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения. *Ультразвук. и функц. диагностика*. 2001; (3): 108–127.

Baevskiy R.M., Ivanov G.G. Heart rate variability: theoretical aspects and features in clinical use. *Ul'trazvukovaya i funktsional'naya diagnostika = Ultrasound and functional diagnostics*. 2001; (3): 108–127. [In Russian].

5. Байбурсян Е.Д., Крюков Н.Н., Киселева Г.И., Малофеева Н.С., Германова И.К. Вариабельность сердечного ритма в оценке степени тяжести артериальной гипертонии. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2005; (4): 30.

Baybursian E.D., Kryukov N.N., Kiseleva G.I., Malofeeva N.S., Germanova I.K. Heart rate variability in assessment of severity level of hypertension. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2005; (4): 30. [In Russian].

6. Валеева А.М., Кайнара В.Г., Сорокин О.В., Нефедова Ж.В. Использование метода кардиобиоуправления при эссенциальной гипертензии у детей. *Рос. вест. перинатол. и педиатрии*. 2016; 61 (3): 212.

Valeeva A.M., Kaynara V.G., Sorokin O.V., Nefedova Zh.V. Application of cardiobioregulation method in children with essential hypertension. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2016; 61 (3): 212. [In Russian].

7. Валеева А.М., Сорокин О.В. Особенности изменения длительности сердечного цикла у ваготоников в ходе кардиобиоуправления. *Мед. и образ. в Сибири*. 2013; (4). URL: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1056

Valeeva A.M., Sorokin O.V. The features of cardiac cycle duration in vagotonic patients within cardio bioregulation. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*. 2013; (4). Available at: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1056. [In Russian].

8. Громнацька Н.М. Стан автономної нервової системи в дітей з есенціальною артеріальною гіпертензією. *Артеріал. гіпертензія*. 2014; (4): 46–50.

Gromnatska N.M. The state of vegetative nervous system in children with essential hypertension. *Arterial'na gipertenziya = Hypertension*. 2014; (4): 46–50. [In Ukrainian].

9. Гуничева Е.А., Логачева И.В., Ожегов А.М. Вариабельность ритма сердца в зависимости от типа исходного вегетативного тонуса у подростков с артериальной гипертензией. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2009; 8 (6, S1): 107.

Gunicheva E.A., Logacheva I.V., Ozhegov A.M. Heart rate variability dependence on the type of primary vegetative tone in adolescents with arterial hypertension. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2009; 8 (6, S1): 107. [In Russian].

10. Ильямакова Н.А., Горбунов В.В., Аксенова Т.А. Вариабельность ритма сердца у больных гипертонической болезнью. Артериальная гипертония: от теории к практике: сб. тез. докл. XI Всерос. конгр., Кемерово, 18–20 марта 2015 г. М.: Интер-Медсервис, 2015. 9–10.

Iliamakova N.A., Gorbunov V.V., Aksenova T.A. Heart rate variability in patients with hypertensive disorder. Arterial hypertension: from theory to practice: Collection of abstracts, XI All-Russian congress, Kemerovo, March 18–20, 2015. Moscow: InterMedService, 2017. 9–10. [In Russian].

11. Лебеденко А.А., Тараканова Т.Д., Яновская Т.А. Геометрические и спектральные методы анализа вариабельности сердечного ритма у подростков с артериальной гипертензией. *Мед. вестн. Юга России*. 2013; (2): 86–89.

Lebedenko A.A, Tarakanova T.D., Yanovskaya T.A. Geometric and spectral methods of analysis of heart rate variability in adolescents with arterial hypertension. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Herald of the South of Russia*. 2013; (2): 86–89. [In Russian].

12. Нефедова Ж.В. Метаболические и нейрофизиологические аспекты артериальной гипертонии у детей и подростков: автореф. дис. … д-ра мед. наук. Новосибирск, 2008.

Nefedova Zh.V. Metabolic and neuro-physiological aspects of arterial hypertension in children and adolescents: abstract of thesis. … doct. med. sciences. Novosibirsk, 2008. [In Russian].

13. Черемисина А.Ю., Сайфутдинов Р.Г., Исмагилов М.Ф. Вариабельность сердечного ритма и суточное мониторирование артериального давления у больных гипертонической болезнью. *Дневник Казанск. мед. шк*. 2013; (1): 138.

Cheremisina A.Yu., Saifutdinov R.G., Ismagilov M.F. Heart rate variability and intraday monitoring of blood pressure in patients with hypertension. *Dnevnik Kazanskoy meditsinskoy shkoly = Diary of Kazan medical school*. 2013; (1): 138. [In Russian].

14. Флейшман А.Н. Вариабельность ритма сердца и медленные колебания гемодинамики: нелинейные феномены в клинической практике. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. 194 с.

Fleyshman A.N. Heart rate variability and slow fluctuations of hemodynamics: non-linear phenomena in clinical practice. Novosibirsk, 2009. 194 p. [In Russian].

15. Шлык Н.И. Сердечный ритм и тип регуляции у детей, подростков и спортсменов. Ижевск: Удмуртский университет, 2009. 102–116.

Shlyk N.I. Heart rate and type of regulation in children, adolescents and sportsmen. Izhevsk: Udmurt University, 2009. 102–116. [In Russian].

16. Ansari A.H., Goit R.K. Reduced parasympathetic tone in newly diagnosed essential hypertension. *Indian Heart J*. 2016; 68 (2): 153–157.

17. Amudharaj D., Karthik S., Nanda N., Pal G.K., Pal P. Spectral analysis of heart rate variability (HRV) may predict the future development of essential hypertension. *Med. Hypotheses*. 2009; 72 (2): 183–185.

18. Brosschot J.F., Thayer J.F., Yamamoto S.S. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int. J. Cardiol*. 2010; 141 (2): 122–131.

19. Bugiardini R., Manfrini O., Mazzolini M., Pizzi C., Xhyheri B. Heart rate variability today. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 2012; 55 (3): 321–331.

20. Carthy E.R. Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review. *Ann. Med. Surg*. (Lond). 2013; 3 (1): 2–7.

21. De Andrade P.E., do Amaral J.A., Paiva L.D., Adami F., Raimudo J.Z., Valenti V.E., Abreu L.C., Raimundo R.D. Reduction of heart rate variability in hypertensive elderly. *Blood Pressure*. 2017; 26 (6); 350–358.

22. Gui-Ling X., Jing-Hua W., Yan Z., Hui X., Jing-Hui S., Si-Rui Y. Association of high blood pressure with heart rate variability in children. *Iran. J. Pediatrics*. 2013; 23 (1): 37–44.

23. Jagodziński L., Sielańczyk A., Ciesiółka A., Gmyrek J., Niepsuj K. The analysis of heart rate variability as non-invasive method of cardiovascular system assessment. *Wiad. Lek*. 2001; 54 (9): 551–555.

24. Sacha J. Interaction between heart rate and heart rate variability. *Ann. Noninvasive Electrocardiol*. 2014; 19 (3): 207–216.

25. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology: Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*. 1996; 17 (3): 354–381.

26. Terathongkum S., Pickler R.H. Relationships among heart rate variability, hypertension, and relaxation techniques. *J. Vasc. Nurs*. 2004; 22 (3): 78–82.

Сведения об авторах:

Валеева А.М., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com
Сорокин О.В., к.м.н., e-mail: oleg.sorokin@vedapulse.com
Нефедова Ж.В., д.м.н., e-mail: nefedova_doc@mail.ru
Кайнара В.Г., e-mail: viktoriya.kajnara@mail.ru
Панасенко Л.М., д.м.н., e-mail: plm-ngmu@mail.ru
Дерягина Л.П., к.м.н.
Карева Н.П., д.м.н., e-mail: knpnsk@mail.ru

Information about authors:

Valeeva A.M., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com
Sorokin O.V., candidate of medical sciences, e-mail: oleg.sorokin@vedapulse.com
Nefedova Zh.V., doctor of medical sciences, e-mail: nefedova_doc@mail.ru
Kaynara V.G., e-mail: viktoriya.kajnara@mail.ru
Panasenko L.M., doctor of medical sciences, e-mail: plm-ngmu@mail.ru
Deryagina L.P., candidate of medical sciences
Kareva N.P., doctor of medical sciences, e-mail: knpnsk@mail.ru

УДК 616.36-002-074:076.5:078.7]-616-003.826 DOI: 10.15372/SSMJ20190419

ЛИПИДНАЯ ИНФИЛЬТРАЦИЯ ГЕПАТОЦИТОВ В МОРФОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

Давид Львович НЕПОМНЯЩИХ[1], Ольга Алексеевна ПОСТНИКОВА[1], Екатерина Эдуардовна АБРАМОВА[1], Ольга Игоревна ДОРОВСКАЯ[2]

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

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

Цель исследования – изучить структурно-функциональные особенности липидной инфильтрации гепатоцитов в морфогенезе хронического гепатита С. **Материал и методы.** Проведено клинико-морфологическое исследование 199 пациентов с маркерами HCV-инфекции (139 мужчин и 60 женщин в возрасте от 20 до 65 лет). Во всех случаях выполнено комплексное исследование, включающее анализ биохимических показателей крови, серологических маркеров вирусного гепатита, изучение данных о наличии маркеров репликации HCV в крови и печени, уровне виремии, количестве инфицированных гепатоцитов и генотипах HCV. Диагностический комплекс включал клинические, биохимические, иммуносерологические методы. **Результаты и их обсуждение.** Представлены результаты анализа структурно-функциональных особенностей липидосодержащих гепатоцитов и показателей репликации вирусных частиц хронического гепатита С. Для своей репродукции HCV вступает в сложные взаимоотношения с метаболическим аппаратом клетки, важную роль в которых играют липидный обмен и связанные с ним структуры – липидные капли. Единственным структурным маркером, коррелирующим с показателями вирусной репликации, является субцитолеммальная мелковезикулярная липидная инфильтрация, которая может отражать вирусиндуцированное усиление обмена липидов в клетке-хозяине для эффективного производства инфекционно активных вирусных частиц.

Ключевые слова: HCV-инфекция, липидосодержащие гепатоциты, генотипирование.

Автор для переписки: Абрамова Е.Э., e-mail: eamed1974@mail.ru

Для цитирования: Непомнящих Д.Л., Постникова О.А., Абрамова Е.Э., Доровская О.И. Липидная инфильтрация гепатоцитов в морфогенезе хронического гепатита С. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 150–154. doi: 10.15372/SSMJ20190419.

LIPID INFILTRATION OF HEPATOCYTES IN THE MORPHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS C

David L'vovich NEPOMNYASHCHIKH[1], Olga Alexeevna POSTNIKOVA[1], Ekaterina Eduardovna ABRAMOVA[1], Olga Igorevna DOROVSKAYA[2]

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

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

The aim of the study was to investigate structurally functional features of lipidic infiltration of hepatocytes in a morphogenesis of chronic hepatitis C. **Material and methods.** A clinical and morphological study of 199 patients with HCV infection markers (139 men and 60 women aged from 20 till 65 years) was conducted. In all cases, a comprehensive study including analysis of blood biochemical parameters, serological markers of HCV replication in blood and liver, viremia level, number of the infected hepatocytes and HCV genotypes was performed. Diagnostic complex included clinical, biochemical, immunoserological methods. **Results and discussion.** The results of the analysis of structural and functional features of lipid-containing hepatocytes and indicators of replication of virus particles of chronic hepatitis C

are provided. For its reproduction HCV enters into complex relationships with the metabolic apparatus of the cell, in which lipid metabolism and related structures – lipid droplets play an important role. The only structural marker that correlates with indicators of virus replication is subcytolemmal small-vesicular lipid infiltration, which can reflect a virus-induced increase in lipid metabolism in the host cell for the effective production of infectious active viral particles.

Key words: HCV infection, lipid-containing hepatocytes, genotyping.

Correspondence author: Abramova Ye.E., e-mail: eamed1974@mail.ru
Citation: Nepomnyashchikh D.L., Postnikova O.A., Abramova E.E., Dorovskaya O.I. Lipid infiltration of hepatocytes in the morphogenesis of chronic hepatitis C. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 150–154. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190419.

Липидная инфильтрация является важнейшей реакцией паренхиматозных клеток печени и одним из главных маркеров гепатита С. Стеатоз может быть связан с метаболическими факторами, однако некоторые исследования продемонстрировали достоверную зависимость между зараженностью вирусом гепатита С (HCV) и липидной инфильтрацией – в случаях инфекции вирусом с генотипом 3 наличие стеатоза коррелирует с внутрипеченочными титрами РНК HCV [14]. Более того, оба типа нарушения внутриклеточного обмена липидов (вирусный и метаболический) могут сосуществовать, при этом у пациентов, инфицированных HCV генотипа 3, стеатоз, скорее всего, является преимущественно вирусиндуцированным, у пациентов с другими генотипами вируса – преимущественно метаболическим [11].

Для своей репродукции HCV вступает в сложные взаимоотношения с метаболическим аппаратом клетки, важную роль в которых играют липидный обмен и связанные с ним структуры – липидные капли. Эти взаимоотношения, по-видимому, носят «равновесный» персистирующий характер, обеспечивающий сохранение клеточных механизмов, необходимых для воспроизводства вируса, поэтому уровень его репродукции и число инфицированных гепатоцитов не вносят значительного вклада в повреждение печени при хроническом гепатите С [2, 4].

Показано, что сердцевинный белок (core protein), являющийся одним из основных факторов HCV-индуцированного повреждения печени, накапливается вокруг липидных капель, которые представляют собой внутриклеточные депо триглицеридов и эфиров холестерина, окруженные монослоем фосфолипидов [9, 14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено клинико-морфологическое исследование 199 пациентов с маркерами HCV-инфекции (139 мужчин и 60 женщин в возрасте от 20 до 65 лет). Во всех случаях выполнено комплексное исследование, включающее анализ биохимических показателей крови, серологических маркеров вирусного гепатита, изучение данных о наличии маркеров репликации HCV в крови и печени, уровне виремии, количестве инфицированных гепатоцитов и генотипах HCV. Диагностический комплекс включал клинические, биохимические, иммуносерологические методы. Клинические исследования проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (1964 г. с поправками 2000 г.) и Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». У пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

С помощью ПЦР выявляли РНК HCV в сыворотке и мононуклеарных клетках крови, в нативной ткани печени, а также ДНК вируса гепатита В (HBV) в образцах крови и ткани печени. Длительность инфицирования устанавливали по первичному выявлению серологических маркеров HCV-инфекции, оценку уровня виремии в сыворотке проводили с помощью тест-системы научно-производственной лаборатории ЦНИИ эпидемиологии (Москва), линейный диапазон которой составляет от 1 тыс. до 3 млн геномных копий РНК HCV в 1 мл сыворотки крови. Вирусную нагрузку свыше 800000 МЕ/мл считали высокой, меньше 800 000 МЕ/мл – низкой. При анализе морфологических изменений в биоптатах печени использована Лос-Анджелесская классификация хронических гепатитов, выделяющая в качестве ведущей характеристики этиологический фактор, а также определение степени активности инфекционного процесса.

Для светооптического анализа парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса, по Ван Гизону с

докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Образцы печени и желудка для электронной микроскопии фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Полутонкие срезы окрашивали реактивом Шиффа и азуром II. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе «JEM 1010» («JEOL Ltd.», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Связь между признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Липидная инфильтрация гепатоцитов выявлена в 87 % биоптатов и имела, как правило, диффузный и полиморфный характер. Однако при совместном анализе полутонких и ультратонких срезов и результатов ПЦР нами сделан вывод, что фазе репликации вируса гепатита С соответствует особый вид стеатоза – мелковезикулярная субцитолеммальная липидная инфильтрация. При моноинфекции РНК HCV в наших исследованиях обнаружена в сыворотке крови в 77 % случаев, в мононуклеарных клетках крови – в 73 %; одновременно в сыворотке и мононуклеарах – в 55 % наблюдений. Важно отметить наличие РНК HCV в некоторых образцах слюны и мочи. ПЦР на РНК HCV в нативной ткани печени была позитивной в 79 % случаев. При комплексном анализе (сыворотка, мононуклеарные клетки крови, ткань печени) три положительных результата получены в 52 % наблюдений.

При генотипировании HCV установлено, что большинство пациентов (53 % случаев) инфицированы вирусом с генотипом 1b, 30 % – с генотипом 2 и 14 % – с генотипом 3a. При генотипах 1b и 3a в 80 % случаев преобладала слабо выраженная (70 %) или минимальная (10 %) степень активности инфекционного процесса при достаточно высоком уровне виремии (от 106 до 108 копий РНК HCV в 1 мл плазмы). При генотипе 2 в 10 % наблюдений имела место низкая виремия, однако именно этот генотип ассоциировался с более высокими показателями активности патологического процесса.

При корреляционном анализе в целом по группе статистически значимых корреляционных связей между наличием РНК HCV в образцах крови, а также числом инфицированных гепатоцитов (по экспрессии NS3AgHCV) и выраженностью клинико-биохимических показателей и структурных изменений в биоптатах печени выявлено не было. У пациентов с высоким уровнем виремии, в отличие от больных с низкой вирусной нагрузкой, обнаружена отрицательная корреляционная связь со степенью активности HCV-инфекции ($r = –0,631$; $p < 0,001$).

Вирусный гепатит С занимает особое место среди персистирующих инфекций. Наиболее важной особенностью HCV-инфекции является способность вируса к длительной персистенции в организме хозяина [1]. Поражение печени при хронической HCV-инфекции не имеет отчетливой корреляции с показателями репродукции вируса. Ведущими моментами в интерпретации этого парадокса могут быть особенности морфогенеза хронического гепатита С, связанные с реакциями паренхиматозных клеток печени.

В патоморфологическом анализе биоптатов печени при HCV-инфекции уделено особое внимание липидной инфильтрации гепатоцитов – одному из главных маркеров гепатита С [2, 5], имеющей, как правило, диффузный и полиморфный характер и выявляемой в 87 % биоптатов. Установлено, что первым этапом HCV-инфицирования гепатоцита является взаимодействие вириона со специфическими белками на клеточной поверхности, что запускает процесс управляемого эндоцитоза, в результате которого геном освобождается от оболочки, выходит в цитозоль и начинает производство протеинов-прекурсоров [6]. Считается, что неструктурные белки HCV участвуют в сборке комплексов репликации, которые тесно связаны с мембранными структурами эндоплазматического ретикулума. По мере прогрессивного накопления во внутриклеточном компартменте новых геномных РНК и структурных протеинов образующиеся вирусные частицы покидают клетку через секреторный путь [13, 15].

Сопоставление данных иммуногистохимического выявления NS3-антигена вируса с морфологическими маркерами HCV-индуцированного изменения печени продемонстрировало, что при малой интенсивности NS3Ag-специфического окрашивания в 72 % случаев выявлялись единичные мелковезикулярные липидные включения в небольшом количестве гепатоцитов, средняя интенсивность иммуногистохимической реакции в 67 % случаев сочеталась с наличием мелких липидных включений (60–70 % гепатоцитов). Высокая интенсивность выявления NS3-антигена сопровождалась выраженным накоплением мелковезикулярных липидных вакуолей в 90 % гепатоцитов биоптата.

Крупновезикулярная липидная инфильтрация гепатоцитов, нередко встречаемая в биоптатах

печени при хронических вирусных гепатитах, преимущественно характерна для токсических воздействий и имеет, вероятно, компенсаторный характер, минимизируя функцию клетки, но сохраняя численность популяции гепатоцитов и возможность последующего восстановления. В большинстве биоптатов печени формируется полиморфная липидная инфильтрация – от минимальной, видимой лишь на полутонких срезах, до гигантских капель, заполняющих целиком всю цитоплазму. Кроме того, обращает на себя внимание дистрофия, связанная с накоплением в цитоплазме гепатоцитов компонентов желчи, иногда довольно значительная [2].

Результаты, полученные на клиническом материале, свидетельствуют о возможном участии липидных капель в репродукции вируса в инфицированных гепатоцитах. Это согласуется с новыми экспериментальными данными, которые указывают на тесные взаимоотношения жизненного цикла HCV и липидного метаболизма клеток печени хозяина. Данная ассоциация становится все более очевидной на уровне как клинических симптомов гепатита С, так и молекулярных механизмов, лежащих в основе морфогенеза и механизма инфицирования [7].

Показано, что сердцевинный белок (core protein), являющийся одним из основных факторов HCVиндуцированного повреждения печени, накапливается вокруг липидных капель, которые представляют собой внутриклеточные депо триглицеридов и эфиров холестерина, окруженные монослоем фосфолипидов [9, 14]. В клетках карциномы печени человека (HuH7), продуцирующих HCV, мембрана липидных капель местами приобретает многослойный характер, а вокруг них наблюдаются скопления мембраноподобных структур, которые отсутствуют в неинфицированных клетках [12].

Локализуясь на поверхности липидных капель, сердцевинный белок и неструктурные белки вируса «рекрутируют» репликационные комплексы, осуществляющие синтез РНК [10]. При этом ассоциация с липидными каплями имеет ключевое значение для производства инфекционных вирусных частиц – показано, что клетки, несущие вирусный геном, содержащий мутантный ген неструктурного белка (NS5A), который не способен связываться с липидными каплями, продуцируют только неинфекционное вирусное потомство. В то же время вирусные частицы, формирующиеся вокруг липидных капель, имеют другую композицию вирусных белков и нуклеиновых кислот (или связаны с компонентами меньшей плотности), что определяет их способность к инфицированию [8]. Кроме того, показано, что HCV-инфекция сопровождается возрастанием количества липидных капель, и для такого увеличения необходим сердцевинный белок, который активирует фактор транскрипции SREBP, участвующий в синтезе липидов [10, 12].

На основании этих данных сделано несколько предположений о возможных механизмах реализации роли липидных капель в репродукции вируса: 1) липидная капля создает агрегат с неструктурными белками и репликационным комплексом, 2) предоставляет вирусным частицам фактор, необходимый для их инфекционности; 3) включает вирусную частицу в систему везикулярного транспорта липидов и связанных с липидами веществ, способствуя экспорту вируса [2, 3, 12].

Участие липидных капель в транспорте вирусных частиц из клетки, возможно, имеет определенное отношение к их характерной субцитолеммальной локализации, которая соответствует фазе репликации вируса и может указывать на вирусиндуцированный характер нарушений липидного обмена. Диффузная мелковезикулярная липидная инфильтрация может соответствовать метаболическому стеатозу в неинфицированных или производящих неинфекционное потомство клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Единственным структурным маркером, коррелирующим с показателями вирусной репликации, является субцитолеммальная мелковезикулярная липидная инфильтрация, которая может отражать вирусиндуцированное усиление обмена липидов в клетке-хозяине для эффективного производства инфекционно-активных вирусных частиц. Лучшее понимание взаимодействия HCV и липидного обмена может помочь понять некоторые патофизиологические механизмы, которые имеют место при хронической HCV-инфекции и указать на возможные новые стратегии терапии.

Для своей репродукции HCV вступает в сложные взаимоотношения с метаболическим аппаратом клетки, важную роль в которых играет липидный обмен и связанные с ним структуры – липидные капли. Эти взаимоотношения, по-видимому, носят «равновесный» персистирующий характер, обеспечивающий сохранение клеточных механизмов, необходимых для воспроизводства вируса, поэтому уровень его репродукции и число инфицированных гепатоцитов не вносят значительного вклада в повреждение печени при хроническом гепатите С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ивашкин В.Т., Павлов Ч.С. Фиброз печени. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 168 с.

Ivashkin V.T., Pavlov C.S. Hepatic fibrosis. Moscow: GEOTAP-Media, 2011. 168 p. [In Russian].

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

Nepomnyashchikh G.I. Biopsy in hepatology: General pathology and pathomorphology. Moscow, 2014. 192 p. [In Russian].

3. Непомнящих Г.И., Айдагулова С.В., Постникова О.А., Непомнящих Д.Л., Нохрина Ж.В., Виноградова Е.В. Морфогенез хронического гепатита С и инфекционно-вирусного цирроза печени. *Клин. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2012; (2): 13–21.

Nepomnyashchikh G.I., Aydagulova S.B., Postnikova O.A., Nepomnyashchikh D.L., Nokhrina Zh.V., Vinogradova E.V. Morphogenesis of chronic hepatitis C and infectious-viral cirrhosis. *Klinicheskie persperktivy gastroenterologii, gepatologii = Clinical prospects of gastroenterology, hepatology*. 2012; (2): 13–21. [In Russian].

4. Непомнящих Г.И., Бакарев М.А., Непомнящих Д.Л., Юданов А.В., Капустина В.И., Мигуськина Е.И., Постникова О.А., Виноградова Е.В., Нохрина Ж.В., Савченко С.А. Роль липидной инфильтрации гепатоцитов в морфогенезе хронического гепатита С. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2013; 151 (8): 250–254.

Nepomnyashchikh G.I., Bakarev M.A., Nepomnyashchikh D.L., Yudanov A.V., Kapustina V.I., Migus'kina E.I., Postnikova O.A., Vinogradova E.V., Nokhrina Zh.V., Savchenko S.A. Role of lipid infiltration of hepatocytes in the morphogenesis of chronic hepatitis C. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2013; 151 (8): 250–254.

5. Непомнящих Г.И., Постникова О.А., Бакарев М.А., Непомнящих Д.Л., Капустина В.И. Структурно-функциональные особенности липидосодержащих гепатоцитов при гепатите С. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2012; 153 (5): 751–754.

Nepomnyashchikh G.I., Postnikova O.A., Bakarev M.A., Nepomnyashchikh D.L., Kapustina V.I. Structural and functional features of lipid-containing hepatocytes in hepatitis C. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2012; 153 (5): 751–754.

6. Burlone M.E., Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol*. 2009; 90: 1055–1070.

7. Dubuisson J., Helle F., Cocquerel L. Early steps in the hepatitis C virus life cycle. *Cell. Microbiol*. 2008; 10: 821–827.

8. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol*. 2008; 82: 7964–7976.

9. McLauchlan J. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009; 1791: 552–559.

10. Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biol*. 2007; 9: 1089–1097.

11. Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol*. 2006; 12: 6756–6765.

12. Ogawa K., Hishiki T., Shimizu Y., Funami K., Sugiyama K., Miyanari Y., Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*. 2009; 85: 217–227.

13. Popescu C.I., Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol. Cell*. 2010; 102: 63–74.

14. Roingeard P., Hourioux C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J. Viral Hepat*. 2008. 157–164.

15. Von Hahn T., Rice C.M. Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem*. 2008; 283: 3689–3693.

Сведения об авторах:

Непомнящих Д.Л., д.м.н., e-mail: dln_nco@mail.ru
Постникова О.А., д.б.н., e-mail: oap@mail.ru
Абрамова Е.Э., к.м.н., e-mail: eamed1974@mail.ru
Доровская О.И., e-mail: ponamarchouk@mail.ru

Information about authors:

Nepomnyashchikh D.L., doctor of medical sciences, e-mail: dln_nco@mail.ru
Postnikova O.A., doctor of biological sciences, e-mail: oap@mail.ru
Abramova E.E., candidate of medical sciences, assistant, e-mail: eamed1974@mail.ru
Dorovskaya O.I., e-mail: ponamarchouk@mail.ru

УДК 616.12-008.318 DOI: 10.15372/SSMJ20190420

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛУДОЧКОВЫХ НАРУШЕНИЙ РИТМА У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТИНФАРКТНЫМ КАРДИОСКЛЕРОЗОМ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОРАЖЕННОГО КОРОНАРНОГО БАССЕЙНА

Алина Михайловна ВАЛЕЕВА[1], Наталья Викторовна ШЛЯХТИНА[1,2], Ольга Сергеевна ВОЛОДИЧЕВА[3]

[1] *Новосибирский государственный университет*
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

[2] *Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России*
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

[3] *Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 2*
630008, г. Новосибирск, ул. Тургенева, 155

Острые и хронические перфузионные нарушения, наличие гипертонической болезни относят к основным факторам риска развития электрической нестабильности миокарда, в частности, желудочковых нарушений ритма, прогрессирующее течение которых увеличивает риск внезапной сердечной смерти. Изменения ряда электро- и эхокардиографических показателей рекомендуется рассматривать в качестве предикторов развития жизнеугрожающих аритмий. Цель исследования – изучить особенности желудочковых нарушений ритма, ремоделирования миокарда и липидного обмена у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) и перенесенным инфарктом миокарда в зависимости от пораженного коронарного бассейна. **Материал и методы.** В исследовании приняли участие 50 пациентов 40–80 лет с постинфарктным кардиосклерозом, АГ, эпизодами желудочковых аритмий, из которых 25 человек – больные с атеросклеротическим поражением ветвей левой коронарной артерии (ЛКА), 25 человек – с поражением бассейна правой коронарной артерии (ПКА). Критерии исключения: дилатационная кардиомиопатия, декомпенсированные клапанные пороки, аритмогенная дисплазия, идиопатическая желудочковая тахикардия, миокардиты. Методы исследования: эхокардиография, коронароангиография, холтеровское мониторирование ЭКГ, биохимические данные. **Результаты и их обсуждение.** У пациентов с поражением ЛКА отмечалась тенденция к наличию более выраженного патологического сдвига турбулентности сердечного ритма за счет увеличения наклона турбулентности, к доминированию симпатических влияний вегетативной нервной системы на фоне достоверно большего количества парных желудочковых экстрасистол (ЖЭ), что отражает органические и функциональные изменения миокарда. Отсутствие значимых изменений длительности и дисперсии интервала QT сравниваемых групп подтвердило малую информативность данных критериев в прогнозе желудочковых нарушений ритма. У пациентов данной группы также регистрировались достоверно меньшая толщина межжелудочковой перегородки, масса миокарда левого желудочка, а также большие размеры правого желудочка (на 0,15 см), что, по нашему мнению, связано с несколько иным течением АГ, процессов ремоделирования миокарда. Однако более значимые изменения липидного профиля, в частности, повышение уровня общего холестерина и триглицеридов крови, наблюдались в группе пациентов с поражением ПКА. **Заключение:** При поражении ЛКА регистрируется более выраженный патологический сдвиг турбулентности сердечного ритма за счет увеличения наклона турбулентности до 4,4 мс/RR на фоне большего количества парных ЖЭ. У пациентов с поражением бассейна ЛКА меньше, чем при поражении ПКА, толщина межжелудочковой перегородки и масса миокарда левого желудочка на фоне большего размера правого желудочка.

Ключевые слова: желудочковые нарушения ритма, артериальная гипертензия, постинфарктный кардиосклероз, электрокардиография, эхокардиография, коронароангиография, внезапная сердечная смерть.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие финансовой или какой-либо другой поддержки и/или конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

Автор для переписки: Валеева А.М., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

Для цитирования: Валеева А.М., Шляхтина Н.В., Володичева О.С. Морфофункциональные особенности желудочковых нарушений ритма у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и артериальной гипертензией в зависимости от пораженного коронарного бассейна. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 155–161. doi: 10.15372/SSMJ20190420.

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF VENTRICULAR ARRHYTHMIAS IN PATIENTS WITH POSTINFARCTION CARDIOSCLEROSIS AND ARTERIAL HYPERTENSION, DEPENDING ON THE AFFECTED CORONARY REGION

Alina Mikhaylovna VALEEVA[1], Natalya Viktorovna SHLYAKHTINA[1,2], Olga Sergeevna VOLODICHEVA[3]

[1] *Novosibirsk State Universuty*
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 1

[2] *Meshalkin National Medical Research Center of Minzdrav of Russia*
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15

[3] *City Clinical Hospital of Emergency Medical Care N 2*
630055, Novosibirsk, Turgenev str., 155

Acute and chronic perfusion disorders, the presence of hypertension are among the main risk factors for the development of electrical instability of the myocardium, in particular ventricular arrhythmias (VA), the progressive course of which increases the risk of sudden cardiac death. Changes in a number of electro- and echocardiographic indicators are recommended to be considered as predictors of the development of life-threatening arrhythmias. **Purpose of the study** was to study VA features, myocardial remodeling processed and lipid metabolism in patients with arterial hypertension (AH) and myocardial infarction, depending on the affected coronary region. **Material and methods.** The study involved 50 patients 40–80 years old with post-infarction cardiosclerosis, AH, ventricular arrhythmias episodes, of which 25 people are patients with atherosclerotic lesions of left coronary artery (LCA), 25 people are with the lesions of right coronary artery (RCA). Exclusion criteria: dilated cardiomyopathy, decompensated valvular defects, arrhythmogenic dysplasia, idiopathic ventricular tachycardia, myocarditis. Research methods: echocardiography, coronary angiography, Holter monitor (24-Hour ECG monitoring), biochemical data. **Results and discussion.** The tendency to the presence of more pronounced pathological changes of heart rate turbulence due to an increase of turbulence slope, dominance of the sympathetic division of the autonomic nervous system against the background of a significantly larger number of paired ventricular extrasystoles have been revealed in the group of patients with atherosclerotic lesions of LCA. That reflects organic and functional changes in the myocardium. The absence of significant changes in the duration and dispersion of the QT interval of the compared groups confirmed the low informativeness of these criteria in the prediction of the VA. The significantly lower value of interventricular septum thickness, left ventricular myocardial mass, and larger size of the right ventricle (0.15 ms) have been revealed along with the above mentioned changes in the group due to the slightly different course of the AH, myocardial remodeling processes. However, more significant changes in the lipid profile, in particular an increase in the level of total cholesterol and blood triglycerides have been registered in the group of patients with PCA. **Conclusion.** The more pronounced pathological shift of heart rate turbulence due to the increase of turbulence slope up to 4.4 ms/RR on the background of more paired ventricular extrasystoles has been determined in the defeat of the LCA. The significantly lower value of interventricular septum thickness, left ventricular myocardial mass, and larger size of the right ventricular have been observed in the group of patients with atherosclerotic lesions of the LCA in comparison with group of patients with lesions of the PCA.

Key words: ventricular rhythm disorders, arterial hypertension, post-infarction cardiosclerosis, electrocardiography, echocardiography, coronary angiography, sudden cardiac death.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Valeeva A.M., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

Citation: Valeeva A.M., Shlyakhtina N.V., Volodicheva O.S. Morphofunctional features of ventricular arrhythmias in patients with postinfarction cardiosclerosis and arterial hypertension, depending on the affected coronary region. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 155–161. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190420.

На сегодняшний день высокая частота встречаемости ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии (АГ) остается важной проблемой здравоохранения. Известно, что длительное течение данных заболеваний ведет к таким адаптационным изменениям в организме, как ремоделирование стенки сосудов, миокарда, приводит к нестабильности проводящей системы сердца, являясь патологическим субстратом для развития предсердных и желудочковых аритмий [1, 3, 5–7, 9, 14, 17]. Среди желудочковых аритмий одним из потенциально жизнеугрожающих осложнений является устойчивая желудочковая тахикардия, дебют которой удается фиксировать электрокардиографически в виде частых единичных и парных ЖЭ, пароксизмов желудочковой тахикардии [3, 6–8]. Прогрессирующее течение желудочковой аритмии в устойчивую пароксизмальную желудочковую тахикардию или в постоянно-возвратную (хроническую) форму увеличивает риск внезапной сердечной смерти [2, 3, 5–9, 14].

Проведение селективной коронароангиографии с последующей оценкой объема поражения, реваскуляризации миокарда у больных, перенесших инфаркт миокарда, по сей день следует рассматривать в качестве оптимального хирургического метода лечения желудочковых нарушений ритма (ЖНР), позволяющего улучшить прогноз и снизить риск внезапной сердечной смерти [5, 6, 8, 10]

Цель исследования – изучить особенности ЖНР, ремоделирования миокарда и липидного обмена у пациентов с АГ и перенесенным инфарктом миокарда в зависимости от пораженного коронарного бассейна.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в период с 2017 по 2019 г. на базе ГБУЗ НСО «Больница скорой медицинской помощи № 2». В исследовании приняли участие 50 пациентов 40–80 лет с эпизодами желудочковой аритмии по данным суточного холтеровского мониторирования ЭКГ (>1000 ЖЭ в сутки), постинфарктным кардиосклерозом, АГ, из которых 25 человек в возрасте 65,5 ± 8,94 года имели, по данным коронароангиографии, атеросклеротическое гемодинамически значимое поражение левой коронарной артерии (ЛКА) и ее ветвей (15 человек – поражение передней межжелудочковой, 8 человек – огибающей, 2 человека – диагональной ветви), 25 человек в возрасте 65,7 ± 9,54 года – поражение бассейна правой коронарной артерии (ПКА).

Критерии исключения: дилатационная кардиомиопатия, декомпенсированные клапанные пороки, аритмогенная дисплазия, идиопатическая желудочковая тахикардия, миокардиты.

Методы исследования: коронароангиография, эхокардиография (размеры левого желудочка (ЛЖ), левого предсердия, фракция выброса ЛЖ, диастолическая функция (пики Е, А)), холтеровское мониторирование ЭКГ (длительность и дисперсия интервала QT, вариабельность ритма сердца, турбулентность сердечного ритма (ТСР), оценка ЖНР, количества ЖЭ), биохимические данные.

Холтеровская запись ЭКГ проводилась с помощью АПК «Кардиотехника» (ЗАО Институт кардиологической техники «Инкарт») с дальнейшей обработкой в компьютерной программе «KTResult 4»; эхокардиография – на аппарате «Vivid» 6 («GE», США), запись ЭКГ – на электрокардиографе «Schiller CARDIOVIT» AT-2plus («Schiller AG», Швейцария).

На предварительном этапе статистического анализа данные оценивали с помощью программы «STATISTICA 8.0». При проверке на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка обнаружено, что для всех переменных оно отличалось от нормального. Данные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (Me (25 %;75 %)), для оценки различий использовали критерий Манна – Уитни, критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05. Все исследования выполнены с заполненного информированного согласия и соответствовали этическим нормам Хельсинкской декларации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, основным методом диагностики и оценки риска развития жизнеугрожающих ЖНР является холтеровское мониторирование ЭКГ, применение которого в рутинной практике позволило выделить ряд характерных изменений параметров турбулентности и вариабельности сердечного ритма на фоне гемодинамически значимых желудочковых аритмий [3–10, 12, 13, 15–17]. По мнению ряда авторов, к таким изменениям можно отнести: а) снижение вариабельности сердечного ритма (стандартное отклонение RR (SDNN) менее 50 мс), согласованной с симпатико-вагальной дизрегуляцией в сторону низкочастотного компонента; б) увеличение дисперсии интервалов QT > 100 мс, в то время как средние значения продолжительности QT составляют 450 мс и более; в) сдвиг показателей ТСР в патологическую сторону (ТО > 0 %, TS < 2,5 мс/RR) [3–7, 9, 12, 13, 15, 17].

Таблица 1

Сравнение показателей суточного холтеровского мониторирования ЭКГ у пациентов с поражением бассейнов ЛКА и ПКА

Table 1

Comparison of indices of 24-hour Holter ECG monitoring in patients with LCA and PCA region defeat

Показатель	Поражение ЛКА	Поражение ПКА	*p*
QTср., мс	405 (389; 419)	405 (393; 414)	0,72
Дисперсия QT, мс	18 (8; 27)	15 (12; 18)	0,85
TO после единичной ЖЭ, %	0,8 (–1,8; 0,3)	–0,8 (–1,0; –0,2)	0,72
TS после единичной ЖЭ, мс/RR	4,4 (2,4; 4,9)	3,7 (2,0; 3,8)	0,04
Количество единичных ЖЭ	7928 (2676; 21000)	4408,5 (3143,5; 6675)	0,15
Количество парных ЖЭ	246 (141; 513)	5 (2; 17)	0,02
RRNN, мс	847 (803; 896)	893 (858; 981)	0,17
SDNN, мс	96 (87; 108)	109 (84; 118)	0,73
VLF, мс^2	1196 (718; 1596)	1305 (938; 1707)	0,68
LF, мс^2	483 (171; 678)	278 (213; 551)	0,86
HF, мс^2	95 (62; 129)	123 (107; 158)	0,14

Примечание. QTср. – среднее значение длительности интервала QT; VLF, LF и HF – соответственно мощность спектра очень низкочастотного (0,00–0,04 Гц), низкочастотного (0,04–0,15 Гц) и высокочастотного диапазона (0,15–0,4 Гц).

В соответствии с международными стандартами оценка ТСР осуществляется путем вычисления двух параметров: ТО (%) – начало турбулентности (начальное ускорение частоты сердечных сокращений вслед за желудочковой экстрасистолией, в основе которой лежит механизм Франка – Старлинга и активация барорефлекторной дуги) и TS (мс/RR) – наклон турбулентности (последующее за ускорением снижение частоты сердечных сокращений) [3, 5–7, 9, 13, 17].

В ходе исследования в группе пациентов с поражением ЛКА отмечалась тенденция к наличию более выраженного патологического сдвига ТСР за счет увеличения наклона турбулентности до 4,4 мс/RR ($p < 0,05$), который позволяет идентифицировать пациентов с вегетативной дисфункцией и ослабленным барорефлекторным ответом аортальных и синокаротидных рецепторов, отражая органические и функциональные изменения миокарда. Вышеуказанные изменения фиксировались на фоне значимо большего количества парных ЖЭ (табл. 1).

Следует заметить отсутствие значимых изменений длительности и дисперсии интервала QT сравниваемых групп, удлинение которого обычно связывают с повышенной аритмогенной готовностью и высоким риском внезапной сердечной смерти [1, 3, 4, 7, 9, 12, 17]. Последние клинические исследования подтвердили малую информативность данных критериев в прогнозе ЖНР, предлагая в ряде случаев использование «новых маркеров» в виде изучения Tpeak-Tend, соотношения (Tpeak-Tend)/QT, альтернации зубца Т (TWA), микровольтной TWA, дисперсию области Т-волны [18–20].

Во время анализа показателей вариабельности ритма сердца при поражении ЛКА отмечалась статистически недостоверная склонность к уменьшению длительности сердечного цикла (RRNN) на 46 мс (5,15 %) и среднеквадратичного размаха (SDNN) на 13,5 мс (12,3 %), что указывает на наличие ригидности механизмов регуляции сердечного ритма и соответствует доминированию низкочастотного компонента (LF) и/или симпатических влияний вегетативной нервной системы на 205 Гц (73,74 %) с согласованным снижением парасимпатических (HF) и нейрогуморальных звеньев регуляции (VLF).

В ходе оценки эхокардиографических показателей в группе пациентов с поражением бассейна ЛКА отмечалась несколько ($p > 0,1$) меньшая толщина межжелудочковой перегородки (на 0,03 см, 2,38 %) и масса миокарда ЛЖ (на 3,75 г, 1,58 %) (рис. 1), а также большие размеры правого желудочка (на 0,15 см, 6 %) в условиях нарушения диастолической функции и сохраненной фракцией выброса ЛЖ, что, возможно, связано с несколько иным течением АГ, процессов ремоделирования миокарда и более выраженным аритмогенным характером поражения ЛКА (табл. 2) [11].

При исследовании биохимического профиля у пациентов с ишемической болезнью сердца, АГ и поражением бассейна ПКА отмечалась тенденция ($p < 0,1$) к наличию более высокого уровня общего холестерина и триглицеридов крови, что,

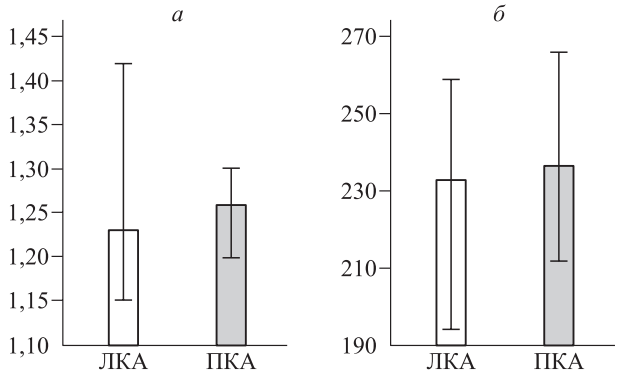

Рис. 1. *Сравнение ультразвуковых показателей пациентов с поражением ЛКА и ПКА: а – толщина межжелудочковой перегородки, см; б – масса миокарда ЛЖ, г*

Fig. 1. *Comparison of ultrasound indices of patients with LCA and PCA region defeat: a – thickness of the interventricular septum, cm; b – LV myocardium mass, g*

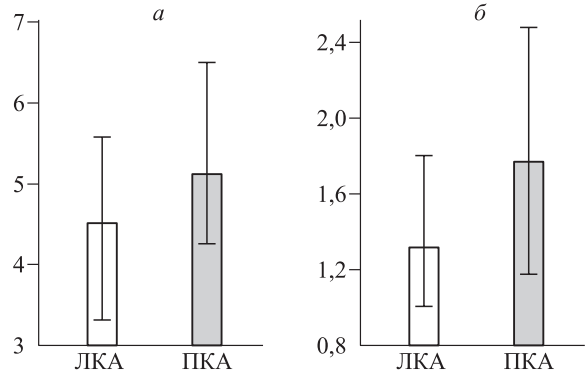

Рис. 2. *Сравнение показателей липидного спектра пациентов с поражением ЛКА и ПКА: содержание в крови общего холестерина (а) и триглицеридов (б), ммоль/л*

Fig. 2. *Comparison of lipid spectrum of patients with LCA and PCA region defeat: total blood cholesterol (a) and triglyceride (b) content, mmol/l*

Таблица 2

Сравнение показателей эхокардиографии у пациентов с поражением бассейнов ЛКА и ПКА

Table 2

Comparison of echocardiography in patients with LCA and PCA region defeat

Показатель	Поражение ЛКА	Поражение ПКА	p
Поперечный размер левого предсердия, см	4,22 (4,40; 4,56)	4,12 (3,90; 4,45)	0,39
КДР ЛЖ, см	5,08 (4,75; 5,28)	5,00 (4,80; 5,46)	0,61
КСР ЛЖ, см	3,45 (3,18; 3,74)	3,36 (3,25; 4,11)	0,95
Индекс массы миокарда ЛЖ, г/м²	116,1 (103,3; 146)	122,6 (100,5; 139,7)	0,45
Фракция выброса ЛЖ, %	58 (54; 64)	58(56; 62)	0,42
Конечный систолический объем, мл	50 (38; 55)	57 (43; 91)	0,27
Конечный диастолический объем, мл	114 (102; 150)	108 (104; 129)	0,60
Размер правого желудочка, см	2,65 (2,37; 3,20)	2,50 (2,20; 2,82)	0,03
Пик Е, м/с	0,75 (0,50; 0,88)	0,62 (0,50; 0,81)	0,48
Пик А, м/с	0,79 (0,70; 0,89)	0,74 (0,65; 0,84)	0,28
Е/А	0,95 (0,70; 0,99)	0,84 (0,77; 0,96)	0,99

Примечание. КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер; пик Е – пик раннего диастолического наполнения; пик А – пик позднего диастолического наполнение; Е/А – соотношение пиков раннего и позднего диастолического наполнения.

вероятно, отражает большую приверженность к лечению, в частности, к приему холестеринснижающих препаратов, в группе пациентов с поражением ЛКА (рис. 2).

Данное суждение носит исключительно предположительный характер и требует дальнейшего изучения анамнестических данных пациентов с наличием постинфарктного кардиосклероза, АГ и ЖНР.

ВЫВОДЫ

1. При поражении ЛКА регистрируется более выраженный патологический сдвиг ТСР за счет увеличения наклона турбулентности до 4,4 мс/RR на фоне большего количества парных ЖЭ.

2. В группе пациентов с поражением бассейна ЛКА отмечалась несколько меньшая толщина межжелудочковой перегородки и масса миокарда

ЛЖ на фоне большего размера правого желудочка в сравнении с группой с поражением ПКА.

3. Более выраженные изменения липидного спектра, а именно тенденция к более высокому уровню общего холестерина и триглицеридов крови, регистрировались при поражении ПКА, что требует дальнейшего изучения на большем объеме выборки с подробным анализом анамнестических данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокерия О.Л., Ахобеков А.А. Внезапная сердечная смерть: механизмы возникновения и стратификации риска. *Анналы аритмологии*. 2012; 9 (3): 5–13.

Bokeriya O.L., Akhobekov A.A. Sudden cardiac death: mechanisms of occurrence and risk stratification. *Annaly aritmologii = Annals of Arrhythmology*. 2012; 9 (3): 5–13. [In Russian].

2. Бокерия О.Л., Биниашвили М.Б. Внезапная сердечная смерть и ишемическая болезнь сердца. *Анналы аритмологии*. 2013; 10 (2): 69–79.

Bokeria O.L., Biniashvili M.B. Sudden hearty death and ischemic disease hearts. *Annaly aritmologii = Annals of Arrhythmology*. 2013; 10 (2): 69–79. [In Russian].

3. Вайханская Т.Г., Фролов А.В., Мельникова О.П., Воробьев А.П., Гуль Л.М., Севрук Т.В., Коптюх Т.М., Сидоренко И.В. Риск – стратификация пациентов с кардиомиопатией с учетом предикторов электрической нестабильности миокарда. *Кардиология в Беларуси*. 2013; (5): 59–73.

Vaykhanskaya T.G., Frolov A.V., Melnikova O.P., Vorobiev A.P., Gul L.M., Sevruk T.V., Koptyukh T.M., Sidorenko I.V. Risk – stratification of patients with cardiomyopathy, taking into account the predictors of electrical instability of the myocardium. *Kardiologiya v Belarusi = Cardiology in Belarus*. 2013; (5): 59–73. [In Russian].

4. Галин П.Ю., Сермягин Д.В. Электрическая нестабильность миокарда у больных инфарктом и ее прогностическая информативность. *Рос. кардиол. журн*. 2016; (8): 26–30.

Galin P.Yu., Sermyagin D.V. Myocardial electrical instability in patients with infarction and its prostate informativity. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian journal of cardiology*. 2016; (8): 26–30. [In Russian].

5. Голдовский Б.М., Юрчак Ю.В., Сидь Е.В. Предикторная ценность анализа вариабельности сердечного ритма в диагностике фатальных аритмий у больных острым инфарктом миокарда. *Мед. неотлож. состояний*. 2014; (3): 109–113.

Goldovskiy B.M., Yurchak Yu.V., Sid E.V. Predictor value of the analysis of heart rate variability in the diagnosis of fatal arrhythmias in patients with acute myocardial infarction. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy = Emergency medicine*. 2014; (3): 109–113. [In Russian].

6. Голухова Е.З., Громова О.И., Мерзляков В.Ю., Шумков К.В., Булаева Н.И., Бокерия Л.А. Неинвазивные электрофизиологические предикторы и биомаркеры угрожающих жизни аритмий у больных ишемической болезнью сердца: данные 2-летнего проспективного наблюдения. *Кардиология*. 2015; 55 (6): 5–14.

Golukhova E.Z, Gromova O.I., Merzlyakov V.Yu., Shumkov K.V., Bulaeva N.I., Bokeriya L.A. Non-invasive electrophysiological predictors and biomarkers of life-threatening arrhythmias in patients with coronary heart disease: data from 2 years of prospective observation. *Kardiologiya = Cardiology*. 2015; 55 (6): 5–14. [In Russian].

7. Громова О.И., Кузнецова Е.В., Хоцанян Ч.В., Голухова Е.З. Прогностические возможности маркеров электрической нестабильности миокарда у больных ишемической болезнью. *Креатив. кардиология*. 2015; 3 (1): 26–41.

Gromova O.I, Kuznetsova E.V., Khotsanyan Ch.V., Golukhova E.Z. Prognostic possibilities of markers of electrical instability of the myocardium in patients with ischemic disease. *Kreativnaya kardiologiya = Creative cardiology*. 2015; 3 (1): 26–41. [In Russian].

8. Рыньгач Е.А., Трешкур Т.В., Татаринова А.А., Шляхто Е.В. Алгоритм ведения пациентов со стабильной ИБС и желудочковыми аритмиями высоких градаций. *Терапевт. архив*. 2017; 89 (1): 94–102.

Ryngach E.A., Trashkur T.V., Tatarinova A.A., Shlyakhto E.V. Algorithm of management of patients with stable ischemic heart disease and ventricular arrhythmias with high gradations. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive*. 2017; 89 (1): 94–102. [In Russian].

9. Сермягин Д.В., Галин П.Ю. Оценка у больных инфарктом миокарда отдаленного прогноза по электрической нестабильности миокарда на госпитальном этапе. *Асп. вестн. Поволжья*. 2015; (5-6): 237–241.

Sermyagin D.V., Galin P.Yu. Assessment in patients with myocardial infarction of the long-term prognosis for electrical instability of the myocardium at the hospital stage. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya = Postgraduate Bulletin of the Volga region*. 2015; (5-6): 237–241. [In Russian].

10. Трешкур Т.В., Тулинцева Т.Э., Цуринова Е.А., Ильина Д.Ю., Тихоненко В.М. Пациент с желудочковой аритмией – тактика ведения. *Трансляц. медицина*. 2015; (5): 83–90.

Treshkur T.V., Tulintseva T.E., Tsurinova E.A., Ilyina D.Yu., Tikhonenko V.M. The patient with ventricular arrhythmia – tactics of the management. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2015; (5): 83–90. [In Russian].

11. Aleong R.G., Mulvahill M.J., Halder I., Carlson N.E., Singh M., Bloom H.L., Dudley S.C.,

Ellinor P.T., Shalaby A., Weiss R., Gutmann R., Sauer W.H., Narayanan K., Chugh S.S., Saba S., London B. Left ventricular dilatation increases the risk of ventricular arrhythmias in patients with reduced systolic function. *J. Am. Heart. Assoc*. 2015; 4 (8): ID e001566.

12. Castro-Torres Y., Carmona-Puerta R., Katholi R.E. Ventricular repolarization markers for predicting malignant arrhythmias in clinical practice. *World J. Clin. Cases*. 2015; 3 (8): 705–720.

13. Cygankiewicz I. Heart rate turbulence. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 2013; 56 (2): 160–171.

14. Jong-Ming Pang B., Green M.S. Epidemiology of ventricular tachyarrhythmia: Any changes in the past decades? *Herzschrittmacherther. Elektrophysiol*. 2017; 28 (2): 143–148.

15. Huikuri H.V., Stein P.K. Clinical application of heart rate variability after acute myocardial infarction. *Front. Physiol*. 2012; 3 (1): ID 41.

16. Katritsis D.G., Siontis G.C., Camm A.J. Prognostic significance of ambulatory ECG monitoring for ventricular arrhythmias. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 2013; 56 (2): 133–142.

17. Mandala S., Di T.C. ECG Parameters for malignant ventricular arrhythmias: A comprehensive review. *J. Med. Biol. Eng*. 2017; 37 (4): 441–453.

18. Mugnai G., Benfari G., Fede A., Rossi A., Chierchia G.B., Vassanelli F., Menegatti G., Ribichini F.L. Tpeak-to-Tend/QT is an independent predictor of early ventricular arrhythmias and arrhythmic death in anterior ST elevation myocardial infarction patients. *Eur. Heart. J. Acute Cardiovasc. Care*. 2016; 5 (6): 473–480.

19. Reynard J.T., Oshodi O.M., Lai J., Lai R., Bazoukis G., Fragakis N., Letsas K.P., Korantzopoulos P., Liu F.Z., Liu T., Xia Y., Tse G., Li K.H. Electrocardiographic conduction and repolarization markers associated with sudden cardiac death: moving along the ECG waveform. *Minerva Cardioangiol*. 2019; 67 (2): 131–144.

20. Tse G., Yan B.P. Traditional and novel electrocardiographic conduction and repolarization markers of sudden cardiac death. *Europace*. 2017; 19 (5): 712–721.

Сведения об авторах:

Валеева А.М., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com
Шляхтина Н.В., к.м.н., e-mail: natashanvkz@mail.ru
Володичева О.С., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

Information about the authors:

Valeeva A.M., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com
Shlyakhtina N.V., candidate of medical sciences, e-mail: natashanvkz@mail.ru
Volodicheva O.S., e-mail: alinvaleeva1994@gmail.com

УДК 613.1:355.211.8 DOI: 10.15372/SSMJ20190421

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЮНОШЕЙ-ПОДРОСТКОВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МЕДИЦИНСКОГО ОСВИДЕТЕЛЬСТВОВАНИЯ ПРИ ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ПОСТАНОВКЕ НА ВОИНСКИЙ УЧЕТ

Анатолий Иванович БАБЕНКО[1], Евгений Геннадьевич ШВЕДОВ[2], Сергей Мухтарович БЕКМУРЗОВ[3], Евгений Анатольевич БАБЕНКО[1]

[1] *НИИ комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний 654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23*

[2] *Военный комиссариат Новосибирской области 630007, г. Новосибирск, ул. Советская, 4А*

[3] *425 военный госпиталь Минобороны России 630017, г. Новосибирск, ул. Воинская, 1, корп. 2*

Состояние здоровья лиц подросткового возраста, уровень и структура заболеваемости отражают всю совокупность влияния факторов и условий их проживания, воспитания и обучения, образа жизни, медицинского обслуживания. Результаты медицинского освидетельствования юношей при первоначальной постановке на воинский учет в достаточно полной мере дают представление о распространенности патологии среди данного контингента и во многом характеризуют качество трудового и обороноспособного потенциала. **Материал и методы.** Использовались результаты медицинского освидетельствования подростков военно-врачебной комиссией Новосибирского областного военного комиссариата за период с 2000 по 2014 г. с общей численностью освидетельствованных 252,2 тысячи. Проведены динамический и сравнительный анализы показателей с выделением трех временных периодов, оценкой распространенности заболеваний по классам болезней, отдельным нозологическим группам, а также распределение юношей по категориям годности к военной службе. **Результаты.** Установлено, что в среднем 62,7 % освидетельствованных имели ту или иную патологию. При этом 22,5 % всех заболеваний было выявлено впервые. Показано, что 87,7–88,7 % всей патологии приходится на 8 основных классов болезней. Среди заболеваний, ограничивающих годность, основными являются психические расстройства и расстройства поведения, а также болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Временную негодность определяют болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, а полную негодность – психические расстройства, болезни нервной системы, эндокринная патология, болезни позвоночника и их последствия, нарушения рефракции и аккомодации глаз, понижение зрения, бронхиальная астма, умственная отсталость, плоскостопие и другие деформации стопы, дегенеративные болезни нервной системы, на которые приходится 63,0 % всей выявленной патологии. **Заключение.** Проведенное исследование показало целесообразность использования результатов медицинского освидетельствования для оценки здоровья юношей-подростков и включения этих показателей в социально-гигиенический мониторинг.

Ключевые слова: юноши-подростки, медицинское освидетельствование, распространенность патологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Автор для переписки: Бабенко А.И., e-mail: bai@centercem.ru

Для цитирования: Бабенко А.И., Шведов Е.Г., Бекмурзов С.М., Бабенко Е.А. Заболеваемость юношей-подростков по результатам медицинского освидетельствования при первоначальной постановке на воинский учет. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 162–171. doi: 10.15372/SSMJ20190421.

INCIDENCE OF TEENAGE YOUNG MEN BY THE RESULTS OF MEDICAL EXAMINATION AT INITIAL MILITARY REGISTRATION

Anatoliy Ivanovich BABENKO[1], Evgeniy Gennadyevich SHVEDOV[2], Sergey Mukhtarovich BEKMURZOV[3], Evgeniy Anatolyevich BABENKO[1]

[1] Research Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases
654041, Novokuznetsk, Kutuzov str., 23

[2] Military Registration and Enlistment Office of the Novosibirsk Region
630007, Novosibirsk, Sovetskaya str., 4A

[3] 425 Military Hospital of Minoborony Russia
630017, Novosibirsk, Russia, Voinskaya str., 1, bldg. 2

Teenagers' health, the level and structure of incidence reflect totality of the influence of the factors and their living conditions, upbringing and training, a way of life, medical care. The results of medical examination of young men at initial military registration to a sufficient extent give an idea of the prevalence of pathology among this contingent and in many respects characterize the quality of labour and defendable potential. **Material and methods.** The results of medical examination of teenagers by the military physician board of the Novosibirsk Regional Military Registration and Enlistment Office from 2000 to 2014 with the total number of the examined subjects 252.2 thousand were used. The dynamic and comparative analyses of the indices for three time periods along with the assessment of the prevalence of the diseases by the disease classes, separate nosological groups and also the distribution of young men by the medical classification were carried out. **Results.** It was established that on average 62.7 % of the examined subjects had this or that pathology. At the same time, 22.5 % of all the diseases were revealed for the first time. It was shown that 87.7–88.7 % of all the pathology accounted for 8 basic classes of diseases. Among the diseases limiting the medical classification the main ones were mental and behavioral disorders and also the diseases of the musculoskeletal system and connective tissue. The temporary unfitness was determined by endocrine, nutritional and metabolic diseases, and the complete one was defined by mental disorders, diseases of the nervous system, endocrine pathology, diseases of the spine and their aftereffects, disorders of refraction and accommodation of the eyes, visual impairment, bronchial asthma, mental retardation, flat foot and other foot deformations, degenerative diseases of the nervous system, which accounted for 63.0 % of all. **Conclusion.** The study showed the feasibility of using the results of the medical examination to assess the health of teenage young men and the inclusion of these indices in social and hygienic monitoring.

Key words: teenage young men, medical examination, prevalence of pathology.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.
Acknowledgements. The study had no sponsorship.
Correspondence author: Babenko A.I., e-mail: bai@centercem.ru
Citation: Babenko A.I., Shvedov E.G., Bekmurzov S.M., Babenko E.A. Incidence of teenage young men by the results of medical examination at initial military registration. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 162–171. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190421.

Состояние здоровья каждого нового поколения людей определяет перспективы реализации основных функций населения в обществе, государстве. Уровень и структура заболеваемости юношей-подростков во многом характеризуют качество трудового и обороноспособного потенциала. Важно отметить, что формирование здоровья данного контингента происходит в течение 15–17 лет и в конечном итоге отражает всю совокупность влияния факторов и условий проживания, воспитания и обучения, образа жизни, медицинского обслуживания. В последние годы результаты целого ряда исследований в различных регионах РФ указывают на увеличение распространенности патологии среди подростков [3, 15, 16]. При этом существенно изменилась структура причин заболеваемости [10, 14], у 35,0 % подростков наблюдаются различные отклонения в здоровье [11], у 38–45 % юношей отмечаются морфологические расстройства и у 45–61 % – наличие хронической патологии [9, 12], где преобладают заболевания нервной системы и психические расстройства [4, 6].

Наиболее полно характеризуют состояние здоровья юношей-подростков, их готовность к трудовой деятельности и к военной службе ре-

зультаты медицинского освидетельствования при первоначальной постановке на воинский учет [7]. Многими авторами, изучавшими состояние здоровья лиц допризывного возраста, показана распространенность патологии среди данного контингента. Проведен сравнительный анализ по годам [2, 3, 11], изучено влияние ряда факторов [8, 13]; в ряде публикаций предлагается вести мониторинг с использованием современных информационных технологий [1, 7].

Вместе с тем наличие информационной базы, накапливаемой военно-врачебными комиссиями военных комиссариатов, позволяет без дополнительных крупномасштабных исследований определять стратегические позиции здравоохранения по формированию здоровья подрастающего поколения. Результаты медицинского освидетельствования фиксируют не только наличие заболеваний по классам болезней, нозологическим формам, но и морфологические и функциональные отклонения, что значительно расширяет информационную базу о состоянии здоровья юношей-подростков. Важна разработка аналитических технологий по использованию этой информации для совершенствования социально-гигиенического мониторинга, определения востребованности медицинских технологий, в том числе профилактической направленности, перспектив развития трудового и обороноспособного потенциала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили сводные отчетные данные военно-врачебной комиссии Новосибирского областного военного комиссариата. Использовались результаты медицинского освидетельствования юношей-подростков при первоначальной постановке на воинский учет по статьям расписания болезней и экспертным заключениям (форма № 4) за 15-летний период с 2000 по 2014 г. Динамический анализ изменения показателей медицинского освидетельствования проводился по трем временным периодам: 2000–2004 гг.; 2005–2009 гг.; 2010–2014 гг. В исследование были включены данные о 252,2 тыс. освидетельствованных.

Статистическая оценка включала расчет и анализ уровней распространенности заболеваний по классам болезней (в соответствии с МКБ-10) и отдельным нозологическим формам и группам заболеваний (по статьям расписания болезней), а также распределение юношей по категориям годности к военной службе. Выделено 5 категорий: «А» – годные к военной службе; «Б» – годные с незначительными ограничениями; «В» – ограниченно годные; «Г» – временно негодные и «Д» – полностью негодные. Проведен сравнительный анализ результатов медицинского освидетельствования и заболеваемости юношей-подростков в Новосибирской области по данным обращаемости за медицинской помощью (использовались отчетные данные лечебно-профилактических учреждений по форме № 12 «Сведения…» за 2012–2014 гг.) с интегрированной оценкой показателей общей, первичной заболеваемости и диспансерного наблюдения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что за рассматриваемый 15-летний период в среднем 62,7 % освидетельствованных имели ту или иную патологию, снижающую их годность к военной службе, амплитуда разброса показателя составляла от 59,8 % (2013 г.) до 69,5 % (2002 г.). Уровень впервые установленной патологии колебался в пределах от 10,1 (2007 г.) до 28,8 на 100 освидетельствованных (2001 г.). В среднем показатель первичной выявляемости составил 14,1 на 100 освидетельствованных, а 22,5 % всех зафиксированных заболеваний у юношей-подростков были впервые выявлены при медицинском освидетельствовании.

При рассмотрении динамики результатов медицинского освидетельствования по трем временным периодам установлена тенденция уменьшения численности освидетельствованных юношей-подростков. В начальный период (2000–2004 гг.) в среднем освидетельствовалось 21,4 тыс. подростков в год. В 2005–2009 гг. их количество составляло 17,4 тыс., а в 2010–2014 гг. – 11,7 тыс. Это связано с рождаемостью в Новосибирской области в предыдущие годы, которая в 1983–1987 гг. была значительно выше, чем в 1988–1992 гг. и особенно в 1993–1997 гг. (соответственно 16,6, 12,8 и 8,4 ‰). При этом в 2000–2004 гг. патология выявлялась у 65,5 % подростков, в 2005–2009 гг. – у 61,6 % и в 2010–2014 гг. – у 62,0 %.

Важно отметить, что за рассматриваемые периоды резко (в 2,2 раза) уменьшилось количество юношей с впервые установленным диагнозом заболевания – с 24,1 % в начале 2000-х годов до 10,9–11,2 % в последующие годы. Соответственно отмечалось сокращение в 2,0 раза удельного веса впервые выявленной патологии среди общего количества зарегистрированных заболеваний – с 36,7 % (2000–2004 гг.) до 17,8–18,1 % (2005–2014 гг.). Это может свидетельствовать, с одной стороны, о доступности и характере обращаемости за медицинской помощью, с другой – о повышении качества диагностики заболеваний

Таблица

Уровень и структура заболеваемости юношей-подростков по результатам медицинского освидетельствования при первоначальной постановке на воинский учет

Table

The level and structure of incidence of teenage young men according to the results of a medical examination at initial military registration

Класс болезней по МКБ-10	Годы									Весь период		
	2000–2004			2004–2009			2010–2014					
	%	‰	Ранг	%	‰	Ранг	%	‰	Ранг	%	‰	Ранг
I	0,5	2,8	16	0,3	1,7	17	0,2	1,4	17	0,3	2,1	17
II	0,3	2,0	17	0,3	2,1	16	0,4	2,4	16	0,3	2,1	16
III	0,6	3,5	15	0,5	3,3	15	0,9	5,5	14	0,6	3,9	15
IV	25,8	161,1	1	28,0	171,2	1	25,6	154,6	1	26,6	163,3	1
V	12,7	79,0	3	12,0	73,5	3	10,0	60,4	3	11,8	72,2	3
VI	10,0	62,6	4	9,6	58,7	4	7,9	48,0	6	9,4	57,5	4
VII	7,1	44,0	5	7,3	44,8	5	8,1	47,5	5	7,4	45,2	5
VIII	1,8	11,2	12	1,1	6,5	14	0,7	4,3	15	1,3	7,7	14
IX	6,0	37,8	6	5,5	33,4	7	6,7	41,7	7	6,0	37,1	7
X	5,6	35,0	7	5,8	35,1	6	8,2	49,6	4	6,3	38,7	6
XI	5,3	33,1	8	4,3	26,2	8	4,3	26,2	8	4,7	28,8	8
XII	2,4	14,7	9	2,5	15,1	9	2,9	17,8	9	2,6	15,6	9
XIII	15,2	94,7	2	16,2	99,1	2	17,4	105,1	2	16,1	99,0	2
XIV	2,0	12,7	10	1,6	9,5	11	1,6	9,7	12	1,7	10,7	11
XVII	1,2	7,3	14	1,5	9,3	12	1,8	11,1	11	1,5	9,0	13
XIX	1,7	10,7	13	2,0	11,9	10	2,2	13,3	10	1,9	11,8	10
Прочие	1,8	11,3	11	1,5	9,2	13	1,1	6,7	13	1,5	9,4	12
Всего	100,0	623,5	–	100,0	610,6	–	100,0	605,2	–	100,0	614,1	–

Примечание. I – Инфекционные и паразитарные болезни; II – Новообразования; III – Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм; IV – Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ; V – Психические расстройства и расстройства поведения; VI – Болезни нервной системы; VII – Болезни глаза и его придаточного аппарата; VIII – Болезни уха и сосцевидного отростка; IX – Болезни системы кровообращения; X – Болезни органов дыхания; XI – Болезни органов пищеварения; XII – Болезни кожи и подкожной клетчатки; XIII – Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани; XIV – Болезни мочеполовой системы; XVII – Врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения; XIX – Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин; ‰ – число случаев на 1000 освидетельствованных.

у юношей-подростков в период до их медицинского освидетельствования, что в определенной степени подтверждается изменением уровня и структуры выявленных заболеваний в разные временные периоды (таблица).

Анализ распространенности заболеваний по отдельным классам болезней показал, что во все годы рассматриваемого периода 87,7–88,7 % патологии приходится на 8 основных классов болезней. Ведущее место занимают эндокринные болезни, расстройства питания и обмена веществ, удельный вес которых составляет 25,6–28,0 % от всех заболеваний. При этом если в первые 10 лет рассматриваемого периода отмечался рост распространенности этой патологии среди подростков (с 161,1 до 171,2 на 1000 освидетельствованных), то в последующие годы она уменьшилась (до 154,6 ‰). Второй по значимости группой заболеваний являются болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. На их долю приходится от 15,2 до 17,4 %, причем в динамике наблюдалось увеличение распространенности этого класса заболеваний с 94,7 до 105,1 ‰. Значительный удельный вес имели психические расстройства и расстройства поведения, составляющие 10,0–12,7 % от всех болезней. В то же время отмечается снижение уровня выявляемости этой патологии с 79,0 (2000–2004 гг.) до 60,4 ‰ (2010–2014 гг.). Аналогичная ситуация характерна и для болезней нервной системы, которые имели

тенденцию к уменьшению распространенности с 62,6 до 48,0 ‰ и удельного веса значимости с 10,0 до 7,9 %.

Немаловажное значение для оценки распространенности патологии среди подростков имеют болезни глаза и его придаточного аппарата; выявляемость заболеваний данного органа и доля в общей структуре болезней увеличились с 44,0 до 47,5 ‰ и с 7,0 до 8,1 % соответственно. В определенной степени к группе ведущих заболеваний можно отнести болезни системы кровообращения, органов дыхания и пищеварения. Их удельный вес за весь рассматриваемый период в общем объеме патологии составлял соответственно 6,0, 6,3 и 4,7 %. При этом распространенность сердечно-сосудистой патологии в последние годы выросла с 37,8 до 41,7 ‰, болезней органов дыхания – с 35,0 до 49,6 ‰, а органов пищеварения снизилась с 33,1 до 26,2 ‰.

Остальные классы болезней в общем объеме патологии составили 11,7 %. Вместе с тем следует обратить внимание на увеличение распространенности среди подростков болезней кожи и подкожной клетчатки (на 21,1 %), травматизма (на 24,3 %), врожденной патологии (на 52,1 %), болезней крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм (на 66,7 %), а также новообразований (на 20,0 %). Уменьшение распространенности патологии отмечалось по заболеваниям мочеполовой системы – на 23,6 %, уха и сосцевидного отростка – в 2,6 раза, инфекционных и паразитарных болезней – в 2,0 раза, а также группы прочих болезней – в 1,7 раза.

В целом можно заключить, что результаты медицинского освидетельствования юношей-подростков при первоначальной постановке на воинский учет в достаточной степени характеризуют уровень и структуру распространенности патологии среди данного контингента, отражая воздействие на них в течение 17 лет всего комплекса факторов среды, образа жизни, медицинского обслуживания и в целом охраны здоровья. Это является основой для определения востребованности диагностических, лечебных и профилактических технологий, а также оценки качества трудового и обороноспособного потенциала.

Готовность подрастающего поколения к военной службе определяется на основе экспертных заключений и установления категории годности. В целом за рассматриваемый 15-летний период 38,5 % освидетельствованных подростков были признаны годными к военной службе (категория «А»), 23,8 – годными с незначительными ограничениями (категория «Б»), 22,6 % – ограниченно годными (категория «В»), 13,2 % – временно не годными (категория «Г») и 1,9 % – полностью не годными (категория «Д»).

Сравнительный анализ годности к военной службе подростков в соответствии с выделенными тремя годовыми периодами показал наличие незначительного увеличения количества подростков категорий «А» и «Б» (на 5,6 % – с 60,9 до 64,3 на 100 освидетельствованных). В свою очередь уменьшилось на 8,7 % число лиц, ограниченно годных, временно не годных и абсолютно не годных (категории «В», «Г» и «Д») – с 39,1 до 35,7 на 100 освидетельствованных. Это указывает, с одной стороны, на снижение тяжести выявленных заболеваний, с другой – на качество диагностики заболеваний при диспансеризации подростков в предыдущие годы, с третьей – на эффективность реализации лечебно-оздоровительных мер.

Для подростков, определяемых в категорию «Б», ведущими классами патологии являются болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, костно-мышечной системы и соединительной ткани, болезни глаза и его придаточного аппарата, а также нервной системы, на которые приходится соответственно 29,4, 20,6, 12,3 и 11,1 % от всей патологии, что в сумме составляет 73,4 %. В определенной степени незначительные ограничения годности связаны с болезнями системы кровообращения (8,5 %), органов пищеварения (7,8 %) и органов дыхания (6,0 %). На остальные 12 классов заболеваний в сумме приходится 4,3 % и менее 1,0 % по каждому.

Для подростков, отнесенных к категории «В», можно выделить два основных класса болезней – это психические расстройства и расстройства поведения, составляющие 24,2 % от всех болезней, а также болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани, на которые приходится 21,5 %. В определенной мере можно признать значимыми для этой категории подростков болезни органов дыхания, нервной системы, глаза и его придаточного аппарата, кожи и подкожной клетчатки с долей их вклада в ограничение годности 9,7, 9,2, 6,1 и 6,0 % соответственно. Таким образом, на шесть ведущих классов патологии приходится 76,7 % всех случаев ограничения годности. Остальные 11 классов болезней менее существенно влияют на ограничение годности в этой категории подростков при первичной постановке на воинский учет, составляя от 0,4 до 3,5 %.

Для юношей, признанных временно не годными к военной службе, основными классами патологии являются болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, определяющие 66,4 % всех случаев отнесения к категории «Г»; определенную значимость

имели болезни системы кровообращения, психические расстройства и расстройства поведения, болезни нервной системы, последствия травм и заболевания мочеполовых органов, составляющие соответственно от 7,9 до 2,2 %. На остальные 11 классов болезней приходится менее 2,0 % по каждому с общим объемом патологии 8,1 %.

Среди заболеваний, формирующих полную негодность к военной службе, главными являются психические расстройства и расстройства поведения, определившие 43,2 % случаев установления негодности к военной службе в этой категории юношей, а также болезни нервной системы, которые имели 15,9 % лиц, отнесенных к категории «Д».

Таким образом, по результатам медицинского освидетельствования юношей-подростков при первоначальной постановке на воинский учет в среднем у 62,8 % лиц выявляется наличие заболеваний, из которых 22,5 % установлены впервые в жизни. В динамике по годам уровень распространенности заболеваний существенно не изменился, но имеет место сокращение в 2,0 раза удельного веса впервые регистрируемой патологии. Это способствовало некоторому увеличению показателя годности подростков к военной службе (категории «А» и «Б») и параллельно уменьшению удельного веса лиц, ограниченно годных и временно не годных. Среди заболеваний, ограничивающих годность к военной службе, основными являются психические расстройства и расстройства поведения, а также болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Временную негодность к военной службе определяют болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, а полную негодность – психические расстройства и болезни нервной системы.

В целом ведущими классами заболеваний, ограничивающих годность к военной службе у юношей-подростков при первоначальном медицинском освидетельствовании по всем категориям, являются болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, составляющие 25,4 % всех случаев выявленной патологии. При этом для 80,1 % юношей-подростков с наличием данных заболеваний установлена временная негодность (категория «Г») к военной службе. Другим ведущим классом болезней являются психические расстройства и расстройства поведения, на долю которых приходится 16,6 % всех ограничений годности, где в 76,5 % случаев заболеваний подростков зафиксирована категория «В» (ограниченно годны). Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани в 14,1 % случаев определяют характер годности к военной службе, при этом 80,4 % юношей с данной патологией отнесены к категории «В». Также в группу основных заболеваний можно отнести болезни нервной системы, органов дыхания, глаза и его придаточного аппарата, на которые приходится соответственно 8,6, 6,5 и 5,2 % всех причин ограничения годности, когда соответственно у 56,9, 79,1 и 62,1 % освидетельствованных с указанными болезнями регистрируется категория «В» (ограниченно годны). В определенной степени к ведущим заболеваниям следует добавить и болезни системы кровообращения с удельным весом их в общем объеме ограничения годности 5,0 %, где почти половина (48,4 %) случаев заболевания определяет временную негодность к военной службе (категория «Г»).

Таким образом, главными классами болезней, ограничивающих годность к военной службе, у юношей-подростков при первоначальной постановке на воинский учет в 81,4 % случаев являются болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, психические расстройства и расстройства поведения, заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани, нервной системы, органов дыхания, глаза и его придаточного аппарата, системы кровообращения. Остальные 10 классов болезней составляют менее 3,5 % по каждому. При этом в случае заболеваний эндокринной системы, расстройств питания и нарушений обмена веществ в основном подростки признаются временно не годными, а при психических расстройствах, болезнях костно-мышечной системы, органов дыхания, глаза и его придаточного аппарата – ограниченно годными. Это свидетельствует о тяжести выявляемой патологии, характере реализации соответствующих лечебно-оздоровительных мер, перспективах призыва и медицинского освидетельствования призывников для прохождения службы в рядах Вооруженных Сил РФ.

На следующем этапе анализа были рассмотрены основные нозологические формы и группы заболеваний (по статьям расписания болезней), ограничивающие годность подростков в перспективе к военной службе. Всего выделено 13 групп патологий, представляющих 9 классов болезней, на которые приходится 76,5 % от всех заболеваний. Основной группой, выявляемой при медицинском освидетельствовании у подростков, являются болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, на долю которых приходится 25,4 %; данная патология выявляется практически у каждого шестого обследованного (153,7 на 1000 освидетельствованных). При этом юношей с заболеваниями этой группы болезней в 50,1 % случаев относят к

категории временно не годных к военной службе, а в 44,0 % случаев они признаются годными с незначительными ограничениями.

Второй по значимости группой патологии являются заболевания позвоночника и их последствия. Удельный вес в общем объеме болезней составляет 11,7 %, а выявляемость – 70,6 на 1000 освидетельствованных. При этом 61,4 % подростков признаны годными с незначительными ограничениями, а 38,1 % – ограниченно годными к военной службе. Третьей группой патологии, составляющей 7,0 % от всех заболеваний, признаны такие заболевания глаза, как нарушение рефракции и аккомодации, слепота, пониженное зрение, аномалии цветового зрения с уровнем распространенности 42,1 ‰. На них приходится 88,6 % всех болезней в этом классе; 64,4 % освидетельствованных относят к категории годных с незначительными ограничениями, а 32,4 % – ограниченно годными.

Следующей по распространенности среди подростков патологией является бронхиальная астма, которая была установлена у 32,8 освидетельствованных из 1000, и удельный вес ее значимости среди всех заболеваний составил 5,4 %. Характерно, что все юноши с этой патологией относятся к категории ограниченно годных к военной службе. Немаловажно, что при медицинском освидетельствовании у 28,4 подростков из 1000 установлено наличие умственной отсталости. Эта патология составляет 47,1 % от всего класса психических расстройств и расстройств поведения, а в целом от всех заболеваний – 4,7 %. При этом 22,9 % больных были признаны не годными к военной службе, а 77,1 % – ограниченно годными. Примерно такой же уровень распространенности имеют заболевания нервной системы, в частности дегенеративные болезни, детский церебральный паралич и др., а также последствия травм головного и спинного мозга. Из этой группы больных подростков 31,9 % являются ограниченно годными, а 17,7 % – полностью не годными к военной службе. Распространенность плоскостопия и других деформаций стопы составила 27,9 %, а удельный вес среди всех заболеваний подростков – 4,6 %. В 51,9 % случаев эти юноши были отнесены к группе годных к военной службе, но с незначительными ограничениями, а 47,5 % – ограниченно годных.

Остальные нозологические формы и группы заболеваний подростков имели долю менее 3,0 %. При этом в случаях выявления заболеваний кожи, органических психических расстройств (87,2 и 65,7 % соответственно) подростки были отнесены к категории ограниченно годных. Юноши с ревматическими и другими поражениями сердца в 58,2 % случаев отнесены к категории годных с незначительными ограничениями и в 38,5 % – ограниченно годных, а при временных функциональных расстройствах системы кровообращения 100,0 % были признаны временно не годными. При заболеваниях полости носа, околоносовых пазух, глотки 98,7 % освидетельствованных признаны годными с незначительными ограничениями, что свидетельствует о легкой степени данной патологии. Заболевания желудка, двенадцатиперстной кишки, печени, желчных путей, поджелудочной железы фиксировались на уровне 12,0 ‰, и в 69,6 % случаев больные подростки получали категорию годности «Б», а 30,0 % – категорию «В».

Таким образом, изучение результатов медицинского освидетельствования подростков при первоначальной постановке на воинский учет показало, что наиболее распространены среди юношей-подростков заболевания эндокринной системы, а также патология, связанная с расстройством питания и нарушением обмена веществ, болезни позвоночника и их последствия, нарушения рефракции и аккомодации глаз, пониженное зрение, бронхиальная астма, умственная отсталость, плоскостопие и другие деформации стопы, дегенеративные болезни нервной системы, на которые приходится 63,0 % всей выявленной патологии. Эти семь групп заболеваний в значительной степени определяют перспективы качества трудового и обороноспособного потенциала, востребованность диагностических, лечебных и профилактических технологий.

При включении информационной базы военно-врачебных комиссий в социально-гигиенический мониторинг и установлении причинно-следственных связей с факторами и условиями проживания подростков, их образом жизни, медицинским обслуживанием необходимо сопоставлять данные показатели с уровнем и структурой обращаемости подростков за медицинской помощью.

Ранее нами проведен анализ заболеваемости подростков Новосибирской области по данным обращаемости за медицинской помощью и интегрированная оценка ее показателей [5]. В структуре общей заболеваемости, охватывающей все случаи обращения за медицинской помощью, ведущими являлись болезни органов дыхания, костно-мышечной системы и соединительной ткани, глаза и его придаточного аппарата, психические расстройства и расстройства поведения. При интегрированной оценке также эти 4 класса в той же степени значимости были основными. Последующие места занимали: болезни нервной системы, болезни органов пищеварения, болез-

ни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ, болезни системы кровообращения, болезни кожи и подкожной клетчатки. Остальные классы не имели существенной значимости.

При суммарной ранговой оценке заболеваемости и результатов медицинского освидетельствования подростков установлено, что главной проблемой, снижающей их здоровье, являются болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани, которые имеют значительные уровни общей заболеваемости, заболеваемости состоящих на диспансерном учете, а также высокую выявляемость при медицинском освидетельствовании. Второе и третье места по значимости занимают психические расстройства и расстройства поведения, имеющие высокий уровень хронизации патологии, и болезни органов дыхания (за счет очень высокого уровня обращаемости за медицинской помощью). Далее следует выделить болезни глаза и его придаточного аппарата (высокий уровень заболеваемости и хронизации патологии), а также болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (за счет очень высокого уровня выявляемости патологии при медицинском освидетельствовании). Последующие места занимают болезни нервной системы, органов пищеварения, системы кровообращения, кожи и подкожной клетчатки.

Таким образом, результаты медицинского освидетельствования подростков, фиксируемые военно-врачебными комиссиями военных комиссариатов, в значительной степени дополняют анализ заболеваемости по данным обращаемости за медицинской помощью и в определенной степени изменяют значимость приоритетов патологии, прежде всего болезней эндокринной системы и органов дыхания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты медицинского освидетельствования юношей-подростков военно-врачебными комиссиями военных комиссариатов при первоначальной постановке на воинский учет свидетельствуют о важности использования данных показателей для оценки здоровья этого контингента и определения качества трудового и обороноспособного потенциала. В этой связи для широкого применения указанной информационной базы и включения ее в общую систему мониторинга необходимо разрабатывать аналитические модели и технологические этапы сопоставления информации из различных источников: с одной стороны – с показателями общей, первичной заболеваемости юношей-подростков по данным обращаемости за медицинской помощью, численностью лиц, состоящих на диспансерном учете, показателями хронизации патологии; с другой – с результатами медицинских осмотров молодежи при поступлении в учебные заведения, при приеме на работу, особенно с неблагоприятными условиями труда, при призыве в ряды Вооруженных Сил РФ.

Таким образом, проведенное исследование распространенности патологии среди юношей-подростков по результатам медицинского освидетельствования при первоначальной постановке на воинский учет является основой для дальнейшей разработки аналитических технологий по оценке здоровья данного контингента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврусин С.П., Оношко В.А., Часных В.Г., Шеповальников В.Н. Оптимизация медицинской помощи юношам допризывного возраста: метод. пособие. СПб., 2007.

Avrusin S.P., Onoshko V.A., Chasnykh V.G., Shepovalnikov V.N. Optimization of medical care to young men of pre-induction age: methodical manual. St. Petersburg, 2007. [In Russian].

2. Антоненков Ю.Е. О характеристиках военнообязанных в Воронежской области. *Вестн. нов. мед. технологий*. 2013; 7 (1): URL: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/00.html

Antonenkov Ju.E. The characteristics of the persons liable to military service in the Voronezh Region. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*. 2013; 7 (1): Available at: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/00.html; doi: 10.12737/issn.2075-4094 [In Russian].

3. Артюхов И.П., Галактионова М.Ю., Рахимова А.Л. Основные тенденции состояния здоровья подростков города Красноярска. *Сиб. мед. обозрение*. 2012; (6): 47–52.

Artyukhov I.P., Galaktionova M.Yu., Rakhimova A.L. Basic tendencies of health condition in teenagers of city Krasnoyarsk. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*. 2012; (6): 47–52. [In Russian].

4. Баранов А.А., Кучма В.Р. Программа улучшения здоровья лиц призывного возраста (по материалам доклада на заседании Президиума РАМН 29 ноября 2006 г.). *Вопр. соврем. педиатрии*. 2007; 6 (2): 8–12.

Baranov A.A., Kuchma V.R. Program for gain in health of the draft age personnel (based on the report presented in the panel session of the Presidium of the Russian Academy of Medical Sciences, November 29, 2006). *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*. 2007; 6 (2): 8–12. [In Russian].

5. Бравве Ю.И., Бабенко А.И., Шведов Е.Г., Бабенко Е.А. Комплексная оценка заболеваемости юношей подростков в Новосибирской области. *Пробл. соц. гигиены, здравоохранения и ист. медицины*. 2016; 24 (6): 355–359.

Bravve Yu.I., Babenko A.I., Shvedov E.G., Babenko E.A. The comprehensive estimate of morbidity of male adolescents in the Novosibirskaya oblast. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine*. 2016; 24 (6): 355–359. [In Russian].

6. Говорин Н.В., Сахаров А.В., Кичигина И.В., Балданов А.М. Структура психических расстройств у лиц призывного контингента в Забайкальском крае. *Забайк. мед. вестн*. 2010; (2): 23–27.

Govorin N.V., Sakharov A.V., Kichigina I.V., Baldanov A.M. Structure of mental disorders in the subjects of the draft contingent in the Zabaykalsky Krai. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik = The Transbaikalian medical bulletin*. 2010; (2): 23–27. [In Russian].

7. Долгих В.В., Кулеш Д.В., Лебедева Л.Н., Шойко С.В., Абашин Н.Н. Заболеваемость подростков и юношей допризывного возраста: медико-организационные и социальные аспекты. *Вестн. Рос. воен.-мед. акад*. 2013; (3): 177–181.

Dolgikh V.V., Kulesh D.V., Lebedeva L.N., Shoyko S.V., Abashin N.N. The incidence of teenagers and young men under-age: medical-organizational and social aspects (review of literature). *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2013; (3): 177–181.[In Russian].

8. Кузьмин С.А., Перепелкина Н.Ю. Медико-социальная характеристика юношей призывного возраста (на примере Оренбургской области). *Обществ. здоровье и здравоохранение*. 2010; (1): 29а–31.

Kuzmin S.A., Perepyolkina N.Yu. Medico-social characteristics of call-up age youth (on the example of the Orenburg Region). *Obshchestvennoye zdorov'ye i zdravookhraneniye = Public Health and Health Care*. 2010; (1): 29a–31. [In Russian].

9. Куликов В.В., Кувшинов К.Э., Лебедев М.А., Палатов С.Ю., Работкин О.С. Предболезненные пограничные состояния у подростков. *Воен.-мед. журн*. 2009; 330 (10): 10–13.

Kulikov V.V., Kuvshinov K.E., Lebedev M.A., Palatov S.Yu., Rabotkin O.S. Pre-existing disease borderline state in teenagers. *Voenno-meditsinskiy zhurnal = Military Medical Journal*. 2009; 330 (10): 10–13. [In Russian].

10. Меньшикова Л.И., Игнатова О.А., Пастбина И.М., Белоусова И.Г., Дьячкова М.Г. Основные тенденции в состоянии здоровья детей и подростков, проживающих на территории Архангельской области, в критические возрастные периоды. *Вестн. Урал. мед. акад. науки*. 2014; (2): 81–83.

Menshikova L.I., Ignatova O.A., Pastbina I.M., Belousova I.G., Dyachkova M.G. Main tendencies of general health at crucial age periods among children and adolescence in Arkhangelsk Region. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2014; (2): 81–83. [In Russian].

11. Полунина Н.В., Юмукян А.В. Медико-социальный портрет подростка, имеющего нарушения здоровья. *Вестн. Росздравнадзора*. 2012; (6): 35–38.

Polunina N.V., Yumukyan A.V. Medical and social portrait of a teenager with health problems. *Vestnik Roszdravnadzora = Bulletin of Roszdravnadzor*. 2012; (6): 35–38. [In Russian].

12. Раппопорт И.К., Соколова С.Б., Макарова А.Ю. Состояние здоровья школьников и проблемы оказания первичной медико-санитарной помощи в образовательных организациях. *Науч. ведомости БелГУ. Сер. Мед. Фармация.* 2014; (24-1): 89–94.

Rappoport I.K., Sokolova S.B., Makarova A.Ju. Health status of schoolchildren and problems of primary health care in educational organizations. *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya = Scientific statements of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2014; (24-1): 89–94. [In Russian].

13. Румянцев Г.И., Прохоров П.И., Палкин В.В. Влияние некоторых факторов риска на состояние здоровья подростков (допризывников и призывников). *Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН*. 2005; (2): 140–143.

Rumyantsev G.I., Prokhorov N.I., Palkin V.V. Influence of some risk factors on teenager health states (of pre-call up ages and call up ages). *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian scientific center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2005; (2): 140–143. [In Russian].

14. Сабгайда Т.П., Окунев О.Б. Изменение заболеваемости российских детей, подростков и взрослого населения болезнями основных классов в постсоветский период. *Соц. аспекты здоровья населения*. 2012; 23 (1): URL: http://vestnik.mednet.ru/content/view/383/30/

Sabgayda T.P., Okunev O.B. Trends of incidence and prevalence for the main classes of diseases among Russian child, adolescent and adult population during the Post-Soviet period. *Sotsial'nyye aspekty zdorov'ya naseleniya = Social aspects of population health*. 2012; 23 (1): 1–20. Available at: http://vestnik.mednet.ru/content/view/383/30/ [In Russian].

15. Татанова Д.В., Рзянкина М.Ф. Динамика показателей, характеризующих состояние здоровья

юношей 15–17 лет г. Хабаровска. *Дальневост. мед. журн*. 2011; (4): 41–44.

Tatanova D.V., Rzyankina M.F. Health indicators dynamics of 15–17-year-old adolescents in Khabarovsk. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal = Far Eastern Medical Journal*. 2011; (4): 41–44. [In Russian].

Чичерин Л.П., Щепин В.О., Согияйнен А.А. Состояние здоровья подростков как призывного ресурса. *Пробл. соц. гигиены, здравоохр. и ист. медицины*. 2013; (3): 20–24.

Chicherin L.P., Shchepin V.O., Sogiyainen A.A. The health conditions of adolescents as a conscription resource. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine*. 2013; (3): 20–24. [In Russian].

Сведения об авторах:

Бабенко А.И., д.м.н., проф., ORCID 0000-0001-6652-7903, e-mail: bai@centercem.ru
Шведов Е.Г., e -mail: Shvedov-evgeny@yandex.ru
Бекмурзов С.М., e-mail: bekuno77@mail.ru
Бабенко Е.А., к.м.н., ORCID 0000-0001-6973-1002

Information about authors:

Babenko A.I., doctor of medical sciences, professor, ORCID 0000-0001-6652-7903, e-mail: bai@centercem.ru
Shvedov E.G., e-mail: Shvedov-evgeny@yandex.ru
Bekmurzov S.M., e-mail: bekuno77@mail.ru
Babenko E.A., candidate of medical sciences, ORCID 0000-0001-6973-1002