

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОГО БРОНХИТА И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Евгений Алексеевич КУРТУКОВ, Юлия Игоревна РАГИНО

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

В литературном обзоре по данным публикаций последних лет систематизируются современные представления о новых биохимических маркерах бронхолегочной патологии, а именно хронической обструктивной болезни легких, хронического бронхита и бронхиальной астмы. Представлена информация о потенциальных биохимических маркерах, ассоциированных с патологией бронхолегочной системы: легочный хемокин, регулируемый активацией (хемокиновый лиганд CCL20), сурфактантные белки А и D, пентраксин-3, дефензины, альфа-1-антитрипсин, белок клеток Клара, интерлейкин-19, резистинподобные молекулы. Для каждой биомолекулы описаны ее характеристика, биологические свойства и эффекты, а также результаты экспериментальных и клинических исследований применения при бронхолегочной патологии, ассоциации повышенного уровня в крови с клиническими проявлениями заболеваний. Сделан вывод, что на сегодняшний день существует немало количество новых потенциальных биомаркеров заболеваний дыхательной системы для ранней и эффективной диагностики, профилактики и терапии заболеваний, однако эффекты некоторых из них либо недостаточно изучены, либо противоречивы и требуют дальнейших исследований, которые активно продолжаются в настоящее время в мире и в России.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма, биохимические маркеры, регулируемый активацией легочный хемокин, сурфактантный белок А, сурфактантный белок D, пентраксин-3, дефензин, α 1-антитрипсин, интерлейкин-19, макрофагальный белок воспаления.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Литературный обзор выполнен в рамках бюджетной НИР по Государственному заданию № АААА-А17-117112850280-2.

Автор для переписки: Рагино Ю.И., e-mail: ragino@mail.ru

Для цитирования: Куртуков Е.А., Рагино Ю.И. Потенциальные биохимические маркеры хронического бронхита и бронхиальной астмы. Современное состояние проблемы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 5–13. doi: 10.15372/SSMJ20190601

POTENTIAL BIOCHEMICAL MARKERS OF CHRONIC BRONCHITIS AND BRONCHIAL ASTHMA. CURRENT STATE OF THE PROBLEM

Evgeniy Alekseevich KURTUKOV, Yuliya Igorevna RAGINO

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

The literature review, according to recent publications, systematizes modern ideas about new biochemical markers of bronchopulmonary pathology, namely chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchitis and bronchial asthma. Information on potential biochemical markers associated with pathology of the bronchopulmonary system is presented: pulmonary activation regulated chemokine (chemokine ligand CCL20), surfactant proteins A and D, pentraxin-3, defensins, alpha-1 antitrypsin, Clara cell protein, interleukin-19, resistin-like molecules. For each biomolecule, its characteristic, biological properties and effects are described, as well as the results of experimental and clinical studies of its effects in bronchopulmonary pathology, the association of elevated blood levels of a biomolecule with clinical manifestations of diseases. It is concluded that today there are a considerable number of new potential biomarkers of the respiratory system diseases for early and effective diagnosis, prevention and treatment of diseases, however, the effects of some of them are either insufficiently studied or contradictory and require further research, which is actively ongoing in the whole world and in Russia.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, bronchial asthma, biochemical markers, pulmonary activation regulated chemokine, surfactant protein A, surfactant protein D, pentraxin-3, defensin, alpha-1 antitrypsin, interleukin-19, macrophage inflammatory protein.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors thank the Russian Government (State assignment No. AAAA-A17-117112850280-2) for financial support.

Correspondence author: Ragino Yu.I., e-mail: ragino@mail.ru

Citation: Kurtukov E.A., Ragino Yu.I. Potential biochemical markers of chronic bronchitis and bronchial asthma. Current state of the problem. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 5–13. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190601

В настоящее время достаточно широкую распространённость в популяции получили болезни бронхолегочной системы, такие как хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) и бронхиальная астма. По данным ВОЗ, на сегодняшний день в мире насчитывается около 300 млн больных бронхиальной астмой. В России её распространённость составляет 6,9 % среди взрослого населения, распространённость ХОБЛ – 21,8 % среди лиц с респираторными симптомами, среди лиц общей популяции – 15,3 %. Согласно данным ВОЗ, сегодня ХОБЛ является 3-й лидирующей причиной смерти в мире, ежегодно от неё умирает около 2,8 млн человек, что составляет 4,8 % всех причин смерти. Поэтому так важно понимать необходимость более ранней диагностики данных заболеваний, поиска возможных предикторов и путей воздействия на ключевые точки патогенеза респираторной патологии. В настоящем обзоре рассмотрены перспективные на сегодняшний день биохимические маркеры, которые по имеющимся литературным данным могут иметь диагностическую пользу при обследовании легочной патологии.

Легочный хемокин, регулируемый активацией (PARC). Легочный хемокин, регулируемый активацией (PARC/CCL18), представляет собой небольшой цитокин, принадлежащий к семейству хемокинов CC. Также он упоминается в литературе как хемокин-1 дендритных клеток (DC-CK1), альтернативный ассоциированный с активацией хемокин (AMAC-1) и макрофагальный воспалительный протеин-4 (MIP-4) [14]. CCL18 продуцируется главным образом антигенпрезентирующими клетками врожденного иммунитета: макрофагами, дендритными клетками, моноцитами; ни Т-, ни В-лимфоциты его не производят [11, 55]. Продукция CCL18 индуцируется Т-хелперами 2 типа посредством преимущественно интерлейкинов ИЛ-4, ИЛ-13. Его повышенное содержание у пациентов с аллергической астмой и другими заболеваниями, связанными с гипер-

чувствительностью, подтверждает важную роль хемокина в генерации и поддержания ответа Т-хелперов 2 типа. Кроме того, уровень CCL18 увеличен при воспалительных заболеваниях суставов, кожи, злокачественных новообразованиях [49].

Изменение уровня CCL18 зарегистрировано при различных патологиях лёгких. Сывороточная концентрация CCL18 имеет умеренную дискриминационную способность дифференцировать пациентов с идиопатическим фиброзом лёгких и бактериальной пневмонией от здоровых субъектов. CCL18 оказывает хемотаксическое действие на фибробласты лёгких и стимулирует выработку коллагена [32]. В пользу участия CCL18 в патогенезе аллергической астмы свидетельствует его способность привлекать *in vitro* стимулированные Т-хелперы 2 типа и базофилы, провоцировать высвобождение эндогенного гистамина и кальция. Также зарегистрировано повышение уровня легочного хемокина после воздействия аллергена через 48 и 72 ч у больных с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми лицами [19, 20].

Сурфактантный белок А (SP-A). SP-A, представитель сурфактантной системы лёгких, продуцируется альвеолярными эпителиоцитами 2 типа, а также частью немелкоклеточных карцином лёгких (NSCLC), выполняет важную роль в цитокиновой защите лёгких [7]. SP-A функционирует в качестве опсонизирующего агента и иммуномодулятора. Показано, что SP-A воздействует на рост и жизнеспособность микроорганизмов, повышая проницаемость их цитоплазматической мембраны, регулирует механизмы иммунной защиты в лёгких путем связывания звеньев врожденного и приобретенного компонентов иммунитета [15], стимулирует хемотаксис макрофагов, влияет на пролиферацию клеток иммунного ответа и на продукцию провоспалительных цитокинов, повышает генерацию активных форм кислорода, регулирует продукцию оксида азота, стимулирует фагоцитоз [4].

SP-A и SP-D являются молекулами для распознавания субстратов с лектиновыми доменами, связывающимися преимущественно с сахарами на поверхностях патогенных микроорганизмов и тем самым способствующими иммунным функциям, включая нейтрализацию вирусов, очистку от бактерий, грибов и апоптотических и некротических клеток, модуляцию аллергических реакций и воспаления. SP-A может взаимодействовать с рецепторными молекулами, присутствующими в иммунных клетках, что приводит к усилению микробного клиренса и регулированию воспаления [38, 51]. Интраназальное введение сурфактанта SP-A у мышей снижало уровни Ig-E и Ig-G, а также эозинофилию как в периферической крови, так и в бронхиальном лаваже. Также известно, что SP-A способен блокировать связывание IgE с аллергеном, тем самым управляя высвобождением гистамина из сенсibilизированных клеток, полученных от пациентов [34].

Сурфактантный белок D (SP-D). SP-D представляет собой коллагенсодержащий лектин С-типа (кальций-зависимый), входящий в группу коллектинов, которые вносят значительный вклад в гомеостаз сурфактантной системы и легочного иммунитета. SP-D участвует в ряде иммунных функций, в том числе обладает противовоспалительным действием [6], а также регулирует аллергическое воспаление и способствует удалению апоптотических клеток. Нарушение регуляции SP-D проявляется при некоторых заболеваниях легких. Так, например, R.M. Maska и соавторы продемонстрировали более низкий уровень SP-D в жидкости бронхиального лаважа, большую нейтрофилию и бактериальную инвазию у пациентов с тяжелой астмой, а также более высокое содержание SP-D и продуктов его деградации в сыворотке крови [37]. Дефицит SP-D у мышей приводит к активации альвеолярных макрофагов, усилению окислительного стресса в дыхательных путях и эмфизематозным изменениям в паренхиме легких [53].

Значимую роль SP-D выполняет в качестве защитного барьера от внешних факторов агрессии. В одном из последних крупных рандомизированных исследований международного генетического консорциума по ХОБЛ было проанализировано 11 157 человек с повышенным риском или с имеющимся ХОБЛ и 36 699 человек группы контроля. Была доказана достоверная связь между риском возникновения ХОБЛ и экспрессией SP-D, а также связь между течением обструктивного бронхита и уровнем SP-D в бронхиальном лаваже [42].

Пентраксин-3 (PTX3). Пентраксиновое семейство является одним из основополагающих

элементов иммунного ответа. Филогенетически это более древняя и менее развитая система белков врожденного иммунитета, прослеживаемая от паукообразных до человека [8]. Термин «пентраксин» был впервые применен для С-реактивного белка (СРБ), имеющего ультраструктуру из пяти субъединиц. На основании первичной структуры субъединиц пентраксины разделены на коротко- и длинноцепочечные белки. Пентраксины распознают широкий спектр экзогенных патогенных веществ и измененных молекул макроорганизма, проявляя свойства белков острой фазы воспаления. Пентраксин-3 (PTX3) и другие протеины, открытые в последующем, представляют собой длинноцепочечные белки [39].

Ген PTX3 располагается в хромосоме 3q25.3, белок состоит из 381 аминокислотного остатка и 17 аминокислот сигнального пептида [14]. PTX3 продуцируется несколькими типами клеток, в том числе мононуклеарными фагоцитами, дендритными клетками, фибробластами и эндотелиальными клетками, в ответ на первичные воспалительные сигналы, например, включение Toll-подобного рецептора, ФНО- α , ИЛ-1 β [54]. PTX3 во многом схож с протеином из того же семейства, получившим широкое распространение в клинической практике – СРБ. Известна роль PTX3 в организации противомикробной защиты в легких. При инактивации PTX3 в ответ на бактериальную инфекцию замечены следующие эффекты: более медленная, по сравнению с контрольной группой, миграция нейтрофилов в очаг воспаления, более ранняя диссеминация бактерий в кровь, значительно более высокая летальность в группе [33].

PTX3 уменьшает выраженность вирусной нагрузки, а также увеличивает толерантность к проникновению цитомегаловируса в культивируемых тканях [12]. Уровень пентраксина в крови у здорового человека составляет менее 2 нг/мл, при этом экспоненциально увеличивается в крови, достигая пика до 200–800 нг/мл через 6–8 ч после воздействия причинного фактора: во время эндотелиального шока, сепсиса и других воспалительных и инфекционных заболеваний. Это позволяет использовать PTX3 в качестве экспресс-маркера воспалительных реакций [10].

Резистинподобные молекулы (RELM). Резистин – гормон, выделяемый адипоцитами, обладающий контринсулярным действием и повышающий толерантность к инсулину и ожирению. В ходе недавних исследований благодаря достаточной уникальности С-пептидного конца данного гормона было открыто семейство резистинподобных молекул, известных как RELM. Белок RELM- α в основном был найден в тканях,

богатых жировой тканью. Другой представитель семейства, RELM- β , был открыт в ходе исследования экспрессии белков RELM в толстом кишечнике [26].

Семейство RELM представлено 4 изоформами у мышей (RELM- α , RELM- β , резистин и RELM- γ) и 2 изоформами у человека (резистин и RELM- β), каждая из которых имеет структурно консервативный 10-цистеиновый фрагмент [51]. Показано, что при активной стимуляции аллергеном у мышей индуцируется значительное повышение уровня тканевого и плазменного RELM- α в легочной ткани, которое неизбежно приводит к ремоделированию сосудов легких, легочной гипертензии, повышенной нагрузке на правые отделы сердца [41]. Установлено, что повышенная экспрессия RELM- β в дыхательных путях при бронхиальной астме способствует их ремоделированию, по крайней мере частично, за счет увеличения пролиферации и дифференцировки фибробластов с последующим отложением белков внеклеточного матрикса [27]. Однако стоит отметить, что метаплазия бокаловидных клеток была менее выражена у экспериментальных мышей, которые имели высокий уровень экспрессии RELM- β [35].

Таким образом, можно предположить, что данный цитокин непосредственно задействован в воспалительных процессах легочной ткани, активно участвует не только в самом воспалении, но и в процессах ремоделирования легких, хронического иммунного ответа.

Дефензины. Дефензины – небольшие катионные амфифильные пептиды из 12–50 аминокислот, обладающие микробицидной активностью в отношении бактерий, вирусов и грибов. Дефензины млекопитающих можно подразделить на три основных класса в соответствии с их структурными различиями: альфа-дефензины, бета-дефензины и недавно описанные тета-дефензины [48]. Помимо микробицидной активности, данные пептиды выполняют регуляторную функцию во многих физиологических процессах, включая противоопухолевый иммунитет, высвобождение цитокинов, хемотаксис, выработку гистамина, воспаление и заживление ран [40]. Продемонстрирована достоверная обратная связь между наличием аллергического ринита у детей и высоким уровнем β -дефензина-2: у детей, страдающих данным заболеванием, содержание пептида в назальной жидкости было значимо ниже, чем в группе без аллергического ринита [21].

Дефензины не только индуцируются во время вирусных инфекций, но и оказывают прямое действие против некоторых вирусов с оболочкой, а также могут ослаблять вирусную инфекцию

клеток. Кроме того, дефензины изменяют активность некоторых типов клеток, таких как тучные клетки, эпителиальные клетки, естественные киллеры и дендритные клетки. Они также способны модулировать адаптивный иммунитет и вносить вклад в ремоделирование дыхательных путей [45].

Альфа-1-антитрипсин. Альфа-1-антитрипсин (A1AT) – ингибитор протеаз семейства серпинов, преимущественной мишенью которого является нейтрофильная эластаза. Дефицит A1AT – генетически детерминированное заболевание, вызванное его недостаточностью в сыворотке крови и проявляющееся в виде ХОБЛ, эмфиземы легких, поражения печени и сосудов [2]. По данным Европейского респираторного общества, в странах Европы распространенность дефицита A1AT варьирует в пределах одного случая на 1800–2500 новорожденных, что составляет около 125 тыс. человек [31].

A1AT, гликопротеид с молекулярной массой 52 кДа, продуцируется в основном в печени эндоплазматической сетью гепатоцитов, в моноцитах, эпителии кишечника и легких [46]. Кодировющий его ген расположен на правом плече 14-й хромосомы, включает в себя пять экзонов. Пятый экзон – область частых мутаций, связанных с недостаточностью A1AT. Аллели наименованы от A до Z; аномальными считаются S и Z, наследование осуществляется по кодоминантному типу: фенотип определяют обе аллели [31]. Измененный A1AT накапливается в гепатоцитах ввиду невозможности прохождения через цитоплазматическую мембрану из-за большей, чем у нормального белка, молекулярной массы, что приводит к апоптозу клеток [5].

Референсные значения содержания A1AT в крови у здоровых людей варьируют от 0,9 до 2 г/л, концентрация менее 80 мг/дл свидетельствует о дефиците белка [9]. Развитие эмфиземы легких у пациентов с дефицитом A1AT связано с невозможностью ингибирования эластазы нейтрофилов небольшим количеством антитрипсина сыворотки [5]. Дисбаланс между протеазой и антипротеазой способствует разрушению легочной ткани, приводя к развитию эмфиземы (в большей степени у курильщиков). Дефицит A1AT является причиной 1–2 % случаев ХОБЛ [3]. В исследовании E. Eden и соавторов показано, что среди лиц с дефицитом A1AT бронхиальная астма встречается в три раза чаще при гетерозиготном генотипе PiMZ, чем при гомозиготном генотипе PiZZ, авторы связывают это со сложностью ранней диагностики ХОБЛ [22].

Белок клеток Клара. Клетки Клара – это кубические или цилиндрические эпителиальные

клетки, выстилающие наиболее дистальные воздухопроводящие пути. Они расположены на базальной мембране и выступают в просвет бронхиол [1]. Клетки Клара играют роль в защите организма, обладают иммуномодулирующим действием и принимают участие в ремоделировании дыхательных путей посредством производства специфических факторов, таких как белок клеток Клара 16 (CC16). CC16 представляет собой белок массой 15,8 кДа, секретируемый по всему трахеобронхиальному дереву и, особенно, в терминальных бронхиолах, где локализуются одноименные клетки [16].

Согласно исследованию F. Braido и соавторов, уровень CC16 обратно коррелировал со степенью тяжести протекания ХОБЛ, при этом не было статистически значимой разницы между концентрацией CC16 и количеством клеток в мокроте (за исключением макрофагов), содержанием газов в артериальной крови и спирометрическими параметрами [13]. Однако нельзя сказать однозначно про корреляцию уровней белка клеток Клара и степенью выраженности астмы из-за противоречивых данных предыдущих исследований [23, 29, 52].

S. Guetta и соавторы не выявили значимой разницы между уровнем CC16 в сыворотке крови и в бронхиальном лаваже, а обнаружили лишь слабо значимую связь содержания CC16 со степенью тяжести бронхиальной астмы. Корреляция была продемонстрирована только между группами пациентов с астмой и контрольной группой. Результаты исследований показывают, что значительный дефицит CC16, присутствующий в дыхательных путях пациентов с астмой, указывает на то, что снижение экспрессии CC16 в легких или уменьшение количества продуцирующих его эпителиальных клеток может быть этиологическим фактором бронхиальной астмы или расцениваться как ее предиктор [30].

Хемокиновый лиганд 20 (CCL20). CCL20, он же макрофагальный белок воспаления 3а (MIP-3а), был открыт в ткани печени, благодаря чему получил название печеночный хемокин, регулируемый активацией (LARC). Молекула состоит из 70 аминокислотных остатков с молекулярной массой 8 кДа [45]. Данный хемокин экспрессируется постоянно, однако также возможно значительное увеличение его продукции вследствие индукции. В нормальных условиях в бронхоальвеолярном лаваже концентрация CCL20 составляет примерно 10,4 пг/мл. Преимущественно его продукцию осуществляют эпителиоциты 2 типа, фибробласты, макрофаги, нейтрофилы. При индукции ИЛ-1 концентрация CCL20 увеличивается более чем в 30 раз, до 167 нг/мл [47].

CCL20 играет ведущую роль в патогенезе бронхиальной астмы, в частности, гиперчувствительности бронхиального дерева в ответ на широкий спектр связанных с астмой стимулов, провоспалительных цитокинов, окружающих частиц и аллергенов [44]. У пациентов с бронхиальной астмой, резистентной к кортикостероидам, наблюдается существенно более выраженное увеличение содержания CCL20 в бронхоальвеолярной лаважной жидкости, чем у больных с астмой, чувствительной к кортикостероидам [28]. A. Faiz и соавторы связывают повышенный уровень CCL20 и увеличение продукции слизи при бронхиальной астме [25].

Таким образом, CCL20 является перспективным потенциальным биомаркером бронхиальной патологии.

Интерлейкин-19 (ИЛ-19). ИЛ-19 принадлежит к семейству ИЛ-10, образуется преимущественно в моноцитах и В-лимфоцитах. Молекула гомологична ИЛ-20 и связывается с его рецепторным комплексом, что приводит к активации сигнального белка – активатора транскрипции 3 (STAT3) [43]. *In vivo* мышинный ИЛ-19 стимулирует выброс ФНО- α и ИЛ-6, индуцирует апоптоз, продукцию активных форм кислорода моноцитами. Также ИЛ-19 обладает модулирующим действием на Т-хелперы 2 типа, индуцируя экспрессию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13 активированными Т-клетками [36].

ИЛ-19 обладает плейотропным иммуномодулирующим действием, в том числе при бронхиальной патологии [24]. На экспериментальной модели зарегистрировано значительное повышение концентрации в крови ИЛ-19 у пациентов с бронхиальной астмой по сравнению с контрольной группой [18]. Имеются данные исследований, которые показали, что уровень ИЛ-19 при ХОБЛ в сыворотке крови снижается, однако возможна вариабельность поведения ИЛ-19 в зависимости от этиологического фактора обострения ХОБЛ [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на сегодняшний день существует немалое количество новых потенциальных биомаркеров заболеваний дыхательной системы, в частности, хронических обструктивных заболеваний легких и бронхиальной астмы, перспективных для использования в целях ранней и эффективной диагностики, профилактики и терапии заболеваний. Однако эффекты некоторых новых потенциальных биомаркеров либо недостаточно изучены, либо противоречивы и требуют дальнейших исследований, которые активно продолжаются в настоящее время в мире и в России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боркина А.Н. Роль клеток Клара в гистофизиологии бронхиального эпителия и их значение в развитии легочной патологии. *Пульмонология*. 2007; (5): 94–99.

Borkina A.N. The role of Clara cells in the histophysiology of bronchial epithelium and their importance in the development of pulmonary pathology. *Pulmonologiya = Pulmonology*. 2007; (5). 94–99. [In Russian].

2. Дефицит альфа-1-антитрипсина у взрослых. Рекомендации Российского респираторного общества. Министерство здравоохранения РФ, 2017.

Alpha-1 antitrypsin deficiency in adults. Recommendations of Russian Respiratory Society. Ministry of Health of the Russian Federation, 2017. [In Russian].

3. Дидковский Н.А., Жарова М.А. Значение наследственных факторов в развитии эмфиземы легких. *Терапевт. арх.* 2006; (3): 70–74.

Didkovsky N.A., Zharova M.A. The value of hereditary factors in the development of emphysema. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive*. 2006; (3): 70–74. [In Russian].

4. Жигальцова-Кучинская О.А., Сивицкая Л.Н., Даниленко Н.Г., Жигальцов А.М., Нагорнов И.В., Метельский С.М. Дефицит альфа-1-антитрипсина: генетические основы, эпидемиология, значение в развитии бронхолегочной патологии. *Вестн. ВГМУ*. 2015; 14 (6): 39–52.

Zhigaltsova-Kuchinskaya O.A., Sivitskaya L.N., Danilenko N.G., Zhigaltsov A.M., Nagornov I.V., Metelsky S.M. Alpha-1-antitrypsin deficiency: genetic fundamentals, epidemiology, role in the development of bronchopulmonary pathology. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Vestnik of Vitebsk State Medical University*. 2015; 14 (6): 39–52. [In Russian].

5. Ковалькова Н.А., Рагино Ю.И., Логвиненко Н.И., Мерекина Е.В., Воевода М.И., Значение сурфактантных белков в диагностике терапевтических заболеваний *Терапевт. арх.* 2015; 87 (1): 115–119. doi: 10.17116/terarkh2015871115-119

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; 87 (1): 115–119. doi: 10.17116/terarkh2015871115-119 [In Russian].

6. Лямина С.В., Веденикин Т.Ю., Малышев И.Ю. Современный подход к анализу иммунного ответа при заболеваниях легких: сурфактантный белок D и его роль. *Соврем. пробл. науки и образования*. 2011; (4): 1–2.

Lyamina S.V., Vedenikin T.Yu., Malyshev I.Yu. A modern approach to the analysis of the immune response in lung diseases: surfactant protein D and its role. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya =*

Modern problems of Science and Education. 2011; (4): 1–2. [In Russian].

7. Микеров А.Н. Роль сурфактантного белка А в иммунной защите легких. *Фундам. исслед.* 2012; (2): 204–207.

Mikerov A.N. The role of surfactant protein A in the immune defense of the lungs. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*. 2012; (2): 204–207. [In Russian].

8. Назаров П.Г. Пентраксины в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, организации матрикса, фертильности. *Мед. академ. журн.* 2010; (4): 107–124.

Nazarov P.G. Pentraxins in reactions of innate and acquired immunity, organization of the matrix, fertility. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*. 2010; (4): 107–124. [In Russian].

9. Соловьева О.Г. Дефицит α1-антитрипсина в практике пульмонолога. *Пульмонология*. 2015; 25 (4): 505–508. doi: 10.18093/086901892015254505508

Solovyova O.G. Deficiency A1 antitrypsin in the practice of a pulmonologist. *Pulmonologiya = Pulmonology*. 2015; 25 (4): 505–508. doi: 10.18093/086901892015254505508 [In Russian].

10. Azzurri A., Sow O.Y., Amedei A., Bah B., D'Allo S., Peri G., Benagiano M., D'Elia M.M., Mantovani A., Del Prete G. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect.* 2005; 7 (1): 1–8. doi: 10.1016/j.micinf.2004.09.004

11. Bellinghausen I., Reuter S., Martin H., Maxeiner J., Luxemburger U., Tureci O., Grabbe S., Taube C., Saloga J. Enhanced production of CCL18 by tolerogenic dendritic cells is associated with inhibition of allergic airway reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130 (6): 1384–1393. doi: 10.1016/j.jaci.2012.08.039

12. Bozza S., Bistoni F., Gaziano R., Pitzurra L., Zelante T., Bonifazi P., Perruccio K., Bellocchio S., Neri M., Iorio A.M., Salvatori G., de Santis R., Calviti M., Doni A., Garlanda C., Mantovani A., Romani L. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood*. 2006; 108 (10): 3387–3396. doi: 10.1182/blood-2006-03-009266

13. Braidò F., Riccio A.M., Guerra L., Gamalero C., Zolezzi A., Tarantini F., de Giovanni B., Folli C., Descalzi D., Canonica G.W. Clara cell 16 protein in COPD sputum: a marker of small airways damage? *Respir. Med.* 2007; 101 (10): 2119–2124. doi: 10.1016/j.rmed.2007.05.023

14. Breviario F., d'Aniello E.M., Golay J., Peri G., Bottazzi B., Bairoch A., Saccone S., Marzella R., Predazzi V., Rocchi M. et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.* 1992; 267 (31): 22190–22197.

15. Brinker K.G., Garner H., Wright J.R. Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003; 284: L232–L241.
16. Broeckaert F., Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin. Exp. Allergy.* 2000; 30 (4): 469–475. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00760.x
17. Caramori G., Adcock I.M., di Stefano A., Chung K.F. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon Dis.* 2014; 9: 397–412. doi: 10.2147/COPD.S42544
18. Chen H., Wang Y., Bai C., Wang X. Alterations of plasma inflammatory biomarkers in the healthy and chronic obstructive pulmonary disease patients with or without acute exacerbation. *J. Proteomics.* 2012; 75: 2835–2843. doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.027
9. Chenivesse C., Chang Y., Azzaoui I., Ait Yahia S., Morales O., Plé C., Foussat A., Tonnel A.B., Delhem N., Yssel H., Vorng H., Wallaert B., Tsicopoulos A. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells. *J Immunol.* 2012; 189 (1): 128–137. doi: 10.4049/jimmunol.1003616
20. De Nadaï P., Charbonnier A.S., Chenivesse C., Sénéchal S., Fournier C., Gilet J., Vorng H., Chang Y., Gosset P., Wallaert B., Tonnel A.B., Lassalle P., Tsicopoulos A. Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J. Immunol.* 2006; 176 (10): 6286–6293. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6286
21. Dilek F., Emin O., Gültepe B., Yazici M., Cakir E., Gedik A.H. Evaluation of nasal fluid β -defensin 2 levels in children with allergic rhinitis. *Turk. Pediatri. Ars.* 2017; 52 (2): 79–84. doi: 10.5152/TurkPediatri-Ars.2017.4497
22. Eden E., Strange C., Holladay B., Xie L. Asthma and allergy in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir. Med.* 2006; 100 (8): 1384–1391. doi: 10.1016/j.rmed.2005.11.017
23. Emmanouil P., Loukides S., Kostikas K., Papatheodorou G., Papaporfyriou A., Hillas G., Vamvakaris I., Triggidou R., Katafigiotis P., Kokkini A., Papis S., Koulouris N., Bakakos P. Sputum and BAL Clara cell secretory protein and surfactant protein D levels in asthma. *Allergy.* 2015; 70 (6): 711–714. doi: 10.1111/all.12603
24. Ermers M.J., Janssen R., Onland-Moret N.C., Hodemaekers H.M., Rovers M.M., Houben M.L., Kimpen J.L., Bont L.J. IL10 family member genes IL19 and IL20 are associated with recurrent wheeze after respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr. Res.* 2011; 70 (5): 518–523. doi: 10.1203/PDR.0b013e31822f5863
25. Faiz A., Weckmann M., Tasena H., Vermeulen C.J., van den Berge M., Ten Hacken N.H.T., Halayko A.J., Ward J.P.T., Lee T.H., Tjin G., Black J.L., Haggi M., Xu C.J., King G.G., Farah C.S., Oliver B.G., Heijink I.H., Burgess J.K. Profiling of healthy and asthmatic airway smooth muscle cells following interleukin-1 β treatment: a novel role for CCL20 in chronic mucus hypersecretion. *Eur. Respir. J.* 2018; 52 (2). doi: 10.1183/13993003.00310-2018
26. Fan C., Meuchel L.W., Su Q., Angelini D.J., Zhang A., Cheadle C., Kolosova I., Makarevich O.D., Yamaji-Kegan K., Rothenberg M.E., Johns R.A. Resistin-like molecule α in allergen-induced pulmonary vascular remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015; 53 (3): 303–313. doi: 10.1165/rcmb.2014-0322OC
27. Fang C.L., Yin L.J., Sharma S., Kierstein S., Wu H.F., Eid G., Haczku A., Corrigan C.J. Resistin-like molecule- β (RELM- β) targets airways fibroblasts to effect remodelling in asthma: from mouse to man. *Clin. Exp. Allergy.* 2015; 45 (5): 940–952. doi: 10.1111/cea.12481
28. Francis J.N., Sabroe I., Lloyd C.M., Durham S.R., Till S.J. Elevated CCR6+ CD4+ T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 152 (3): 440–447 doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03657.x
29. Guerra S., Halonen M., Vasquez M.M., Spangenberg A., Stern D.A., Morgan W.J., Wright A.L., Lavi I., Tares L., Carsin A.E., Dobano C., Barreiro E., Zock J.P., Martinez-Moratalla J., Urrutia I., Sunyer J., Keidel D., Imboden M., Probst-Hensch N., Hallberg J., Melen E., Wickman M., Bousquet J., Belgrave D.C., Simpson A., Custovic A., Anto J.M., Martinez F.D. Relation between circulating CC16 concentrations, lung function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective study. *Lancet Respir. Med.* 2015; 3 (8): 613–620. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00196-4
30. Guerra S., Vasquez M.M., Spangenberg A., Halonen M., Martin R.J. Club cell secretory protein in serum and bronchoalveolar lavage of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016; 138 (3): 932–934. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.047
31. Haitham S., Ashry A., Strange C. COPD in individuals with the PiMZ alpha-1 antitrypsin genotype. *Eur. Respir. Rev.* 2017; 26 (146). pii 170068. doi: 10.1183/16000617.0068-2017
32. Hamai K., Iwamoto H., Ishikawa N., Horimasu Y., Masuda T., Miyamoto S., Nakashima T., Ohshimo S., Fujitaka K., Hamada H., Hattori N., Kohno N. Comparative study of circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as disease markers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis. Markers.* 2016; 2016: 4759040. doi: 10.1155/2016/4759040
33. He X., Han B., Liu M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am. J. Physiol.* 2007; 292 (5): 1039–1049. doi: 10.1152/ajplung.00490.2006
34. Kishore U., Greenhough T.J., Waters P., Shrive A.K., Mohammed R., Kamran M.F., Bernal A.L., Reid K.B., Madan T., Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol. Immunol.* 2006; 43 (9): 1293–1315. doi: 10.1016/j.molimm.2005.08.004

35. LeMessurier K.S., Palipane M., Tiwary M., Gavin B., Samarasinghe A.E. Chronic features of allergic asthma are enhanced in the absence of resistin-like molecule-beta. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 7061. doi: 10.1038/s41598-018-25321-y
36. Liao S.C., Cheng Y.C., Wang Y.C., Wang C.W., Yang S.M., Yu C.K., Shieh C.C., Cheng K.C., Lee M.F., Chiang S.R., Shieh J.M., Chang M.S. IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. *J. Immunol.* 2004; 173 (11): 6712–6718. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6712
37. Mackay R.M., Grainge C.L., Lau L.C., Barber C., Clark H.W., Howarth P.H. Airway surfactant protein D deficiency in adults with severe asthma. *Chest.* 2016; 149 (5): 1165–1172. doi: 10.1016/j.chest.2015.11.012
38. Madan T., Kishore U., Singh M., Strong P., Clark H., Hussain E.M., Reid K.B.M., Sarma P.U. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J. Clin. Invest.* 2001; 107 (4): 467–475. doi: 10.1172/JCI10124
39. Mantovani A., Garlanda C., Doni A., Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J. Clin. Immunol.* 2008; 28 (1): 1–13. doi: 10.1007/s10875-007-9126-77
40. Mattar E.H., Almehdar H.A., Yacoub H.A., Uversky V.N., Redwan E.M. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 28: 95–111. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.002
41. Munitz A., Cole E., Karo-Atar D., Finkelman F.D., Rothenberg M.E. Resistin-like molecule-alpha regulates IL-13-induced chemokine production but not allergen-induced airway responses. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2012; 46 (5): 703–713. doi: 10.1165/rcmb.2011-0391OC
42. Obeidat M., Li X., Burgess S., Zhou G., Fishbane N., Hansel N.N., Bossé Y., Joubert P., Hao K., Nickle D.C., van den Berge M., Timens W., Cho M.H., Hobbs B.D., de Jong K., Boezen M., Hung R.J., Rafaels N., Mathias R., Ruczinski I., Beaty T.H., Barnes K.C., Pare P.D., Sin D.D. Surfactant protein D is a causal risk factor for COPD: results of Mendelian randomisation. *Eur. Respir. J.* 2017; 50 (5). doi: 10.1183/13993003.00657-2017
43. Oral H.B., Kotenko S.V., Yilmaz M., Mani O., Zumkehr J., Blaser K., Akdis C.A., Akdis M. Regulation of T cells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 380–388. doi: 10.1016/s0165-2478(03)00087-7
44. Reibman J., Hsu Y., Chen L.C., Bleck B., Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 28 (6): 648–654. doi: 10.1165/rcmb.2002-0095OC
45. Proud D. The role of defensins in virus-induced asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2006; 6 (1): 81–85. doi: 10.1007/s11882-006-0015-6
46. Pini L., Tiberio L., Venkatesan N., Bezzi M., Corda L., Luisetti M., Ferrarotti I., Malerba M., Lomas D.A., Janciauskiene S., Vizzardi E., Modena D., Schiaffonati L., Tantucci C. The role of bronchial epithelial cells in the pathogenesis of COPD in α 1 antitrypsin deficiency. *Respir. Res.* 2014; 15 (1): 112. doi: 10.1186/s12931-014-0112-3
47. Sanmiguel C.J., Oлару F., Li J., Mohr E., Jensen E. Interleukin-1 regulates keratinocyte expression of T cell targeting chemokines through interleukin-1 receptor associated kinase-1 (IRAK1) dependent and independent pathways. *Cell Signal.* 2009; 21 (5): 685–694. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.01.005
48. Schneider J.J., Unholzer A., Schaller M., Schäfer-Korting M., Korting H.C. Human defensins. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2005; 83 (8): 587–595. doi: 10.1007/s00109-005-0657-1
49. Schutyser E., Richmond A., van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78 (1): 14–26. doi: 10.1189/jlb.1204712
50. Sorensen GL1, Husby S., Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology.* 2007; 212 (4-5): 381–416. doi: 10.1016/j.imbio.2007.01.003
51. Stepan C.M., Brown E.J., Wright C.M., Bhat S., Banerjee R.R., Dai C.Y., Enders G.H., Silberg D.G., Wen X., Wu G.D., Lazar M.A. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98 (2): 502–506. doi: 10.1073/pnas.98.2.502
52. Van Vyve T., Chanez P., Bernard A., Bousquet J., Godard P., Lauwerijs R., Sibille Y. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95 (1, Pt. 1): 60–68. doi: S0091674995000121
53. Wert S.E., Yoshida M., LeVine A.M., Ikegami M., Jones T., Ross G.F., Fisher J.H., Korfhagen T.R., Whitsett J.A. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (11): 5972–5977. doi: 10.1073/pnas.100448997
54. Wirestam L., Enocsson H., Skogh T., Eloranta M.L., Rönnblom L., Sjöwall C., Wettero J. Interferon-alpha coincides with suppressed levels of pentraxin-3 (PTX3) in systemic lupus erythematosus and regulates leucocyte PTX3 *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 2017; 189 (1): 83–91. doi: 10.1111/cei.12957
55. Yoshie O., Imai T., Nomiya H. Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.* 2001; 78: 57–110.

Сведения об авторах:

Куртуков Е.А., ORCID: 0000-0001-7837-406X, e-mail: cawerty@gmail.com

Рагино Ю.И., д.м.н., проф., член-корр. РАН, ORCID: 0000-0002-4936-8362, e-mail: ragino@mail.ru

Information about authors:

Kurtukov E.A., ORCID: 0000-0001-7837-406X, e-mail: cawerty@gmail.com

Ragino Yu. I., doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, ORCID: 0000-0002-4936-8362,
e-mail: ragino@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НОВОГО НОРМОТИМИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ЦИТРАТА ЛИТИЯ, ОКСИДА АЛЮМИНИЯ И ПОЛИМЕТИЛСИЛОКСАНА

Максим Александрович КОРОЛЁВ¹, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ¹,
Любовь Никифоровна РАЧКОВСКАЯ¹, Константин Игоревич ЕРШОВ²,
Герман Игоревич БАЙКАЛОВ^{1,2}, Наталья Евгеньевна БАЙКАЛОВА^{1,2},
Ксения Игоревна БАХАРЕВА¹, Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{1,2}

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

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

Для лечения биполярных аффективных расстройств наиболее известными и эффективными являются препараты лития, но главной проблемой их применения является узкий «терапевтический коридор». Актуальной задачей представляется создание лекарственных форм лития с замедленным высвобождением и широким терапевтическим диапазоном. В данной работе объектом исследования явилось новое нормотимическое лекарственное средство на основе лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана. Благодаря новой матрице-носителю литий высвобождается из её пористой структуры постепенно, обеспечивая пролонгированный эффект и поддержание оптимальной концентрации в крови, что также способствует минимизации побочных эффектов. Цель исследования – изучение фармакокинетических параметров нормотимического лекарственного средства на основе комплекса цитрата лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана (ЛЮАП). **Материал и методы.** Для оценки фармакокинетических параметров использовался метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой и двухкамерного моделирования. **Результаты и их обсуждение.** Фармакокинетические данные показали линейный характер фармакокинетики лекарственного средства на основе ЛЮАП в плазме крови кроликов после внутрижелудочного введения в дозах 200, 400 и 800 мг/кг. Лекарственный препарат при внутрижелудочном введении в дозе 800 мг/кг хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта с биодоступностью 74 %. Данная доза показывает максимальное приращение площади под фармакокинетической кривой ($AUC - 32787,1$ (нг × ч)/мл), а показатели константы элиминации ($K_{el} - 0,06$ 1/ч), клиренса ($Cl - 0,09$ л/(кг × ч), периода полувыведения ($T_{1/2\beta} - 11,4$ ч) по сравнению с другими дозами остаются неизменными.

Ключевые слова: нормотимик, цитрат лития, оксид алюминия, полиметилсилоксан, фармакокинетика.

Автор для переписки: Мадонов П.Г., e-mail: pmadonov@yandex.ru

Для цитирования: Королёв М.А., Коненков В.И., Рачковская Л.Н., Ершов К.И., Байкалов Г.И., Байкалова Н.Е., Бахарева К.И., Мадонов П.Г. Изучение фармакокинетических параметров нового нормотимического лекарственного средства на основе комплекса цитрата лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 14–21. doi: 10.15372/SSMJ20190602

STUDYING THE PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF NEW NORMOTHYMIC DRUG BASED ON THE COMPLEX OF LITHIUM CITRATE, ALUMINUM OXIDE AND POLYMETHYLSILOXANE

Maksim Aleksandrovich KOROLEV¹, Vladimir Iosifovich KONENKOV¹,
Lyubov Nikiforovna RACHKOVSKAYA¹, Konstantin Igorevich ERSHOV²,
German Igorevich BAYKALOV^{1,2}, Natalya Evgen'evna BAYKALOVA^{1,2},
Kseniya Igorevna BAKHAREVA¹, Pavel Gennad'evich MADONOV^{1,2}

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –
Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

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

For the treatment of bipolar affective disorders, lithium preparations are the most famous and effective. But the main problem with the use of lithium preparations is the narrow «therapeutic corridor». An urgent task is the creation of dosage forms of lithium with a slow release and a wide therapeutic range. The study object was a new normotymic drug based on lithium, aluminum oxide and polymethylsiloxane. Due to the new carrier matrix lithium is released from its porous structure gradually providing a prolonged effect and maintaining an optimal concentration in the blood which also helps to minimize side effects. The purpose of the study was to explore the pharmacokinetic parameters of a normotymic drug based on a complex lithium citrate, aluminum oxide and polymethylsiloxane (LOAP). **Material and methods:** for the assessment of pharmacokinetic parameters the method of atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma and two-chamber modeling were used. **Results and discussion.** The pharmacokinetic data showed a linear nature of pharmacokinetics of the drug based on LOAP as the foundation of data of the lithium's amount in the blood plasma of rabbits after intragastric administration at doses of 200, 400 and 800 mg/kg. The drug with intragastric administration at a dose of 800 mg/kg is well absorbed from the gastrointestinal tract, with bioavailability (F) 74 %. This dose shows the maximum increase of the area under the pharmacokinetic curve (AUC - 32787.1 (ng × h)/ml), and indicators of elimination constant ($K_{el} - 0.062 \text{ h}^{-1}$), clearance (Cl - 0.09 l/(kg × h)), elimination half-life ($T_{1/2\beta} - 11.436 \text{ h}$) in comparison with other doses remain unchanged.

Key words: normotymic, lithium citrate, aluminum oxide, polymethylsiloxane, pharmacokinetics.

Correspondence author: Madonov P.G., e-mail: pmadonov@yandex.ru

Citation: Korolev M.A., Konenkov V.I., Rachkovskaya L.N., Ershov K.I., Baykalov G.I., Baykalova N.E., Bakhareva K.I., Madonov P.G. Studying the pharmacokinetic parameters of new normotymic drug based on the complex of lithium citrate, aluminum oxide and polymethylsiloxane. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 14–21. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190602

Лекарственные препараты на основе химических соединений лития в настоящее время широко используются в психиатрии, что делает их чрезвычайно востребованными, поскольку психические расстройства, вызванные тревожными и депрессивными состояниями, усугубленные сопутствующими патологиями, социальными факторами, являются большой медико-биологической и социальной проблемой для всего мира. Число пациентов с психическими расстройствами, обратившихся в психоневрологические организации Российской Федерации в 2018 г., составило почти 4 млн (3 933 156) человек [10]. Лекарственные препараты лития остаются важными средствами в списке психофармакологических препаратов во всем мире [18].

При анализе научной литературы, посвященной перспективам применения соединений лития в медицинской практике, обнаруживается много публикаций, в которых показаны его pleiotropic фармакологические эффекты [1, 14, 16]. Заслуживает отдельного внимания то обстоятельство, что литий реализует свои фармакологические эффекты в зависимости не только от дозы, но и от химической природы препарата. В России используется преимущественно карбонат лития, в зарубежных странах – хлорид и оротат лития. Соли лития существенно различаются по

фармакокинетическим и другим биологическим свойствам, что обуславливает существенные различия в их биодоступности и фармакологическом действии. Неорганические соли (хлорид, карбонат), вследствие сравнительно малых размеров аниона, в принципе не могут проявлять высоко-специфичных взаимодействий с белками, в результате транспорт ионов лития внутрь клетки существенно затруднен, и большая их часть рассеивается в межклеточной жидкости. В отличие от неорганических солей, соли с органическими анионами (аскорбат, никотинат, оксибутират и др.), способные к более специфическим взаимодействиям с белками, обеспечивают более эффективный транспорт ионов лития внутрь клетки и, кроме того, могут также проявлять специфические эффекты. Систематическое исследование различий в биологических и фармакологических свойствах солей лития и соответствующих анионов не проводилось [8].

Важными характеристиками лекарственного средства являются сведения, получаемые при фармакокинетическом исследовании. Научных данных по изучению фармакокинетики препаратов лития немного. Фармакокинетические исследования солей лития отличаются друг от друга: по методике исследования, по анионному компоненту, по дозе вводимых соединений в пересчете

на литий, по кратности введения. Предполагается, что при попадании в организм соли лития диссоциируют, приводя к очень похожим значениям концентрации ионов лития в плазме и мозге [11, 12, 19].

Главной проблемой применения препаратов лития является узкий терапевтический диапазон. Для карбоната лития диапазон концентраций иона лития в плазме составляет 0,6–1,2 ммоль/л. Концентрация Li^+ 1,5–2,5 ммоль/л ассоциирована со слабой токсичностью, 2,5–3,5 ммоль/л – с тяжелым отравлением, а превышение порога в 3,5 ммоль/л может быть опасным для жизни [13]. Для достижения искомого терапевтического эффекта в психиатрии необходимо использование значительных дозировок карбоната лития (1–3 г/сут, в остром периоде – до 9 г/сут), что, ввиду его высокой токсичности, снижает привлекательность этой соли лития для назначения врачами [15]. Поэтому для повышения безопасности необходимы исследования других солей лития. В частности, аскорбат лития характеризуется низкой токсичностью (5-й класс, $LD_{50} = 6334$ мг/кг, токсичность в 8,4 раза меньше, чем у Li_2CO_3) [5, 6]. Наиболее токсичными считаются гидрид, тетрагидроалюминий и тетрагидроборат лития [19, 20].

Создание лекарственных форм лития с замедленным высвобождением и широким терапевтическим диапазоном является актуальной медицинской и технологической задачей. В данной работе объектом исследования явилось новое нормотимическое лекарственное средство на основе лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана. Стартовой идеей этого препарата явилась необходимость создания системы пролонгированного поступления лития в кровоток для реализации специфического фармакологического действия и минимизации побочных эффектов.

Основная часть работ, представленная в данной статье, выполнена в рамках исполнения государственного контракта № 14.N08.12.1041 от 28.08.2015.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В разработанном лекарственном средстве в качестве активного фармакологического ингредиента использован лития цитрат четырехводный (ООО «Алтайфарм», Россия) с химической чистотой по основному веществу не менее 98,5 %. Лекарственное средство представляет собой комплекс цитрата лития, иммобилизованного на матрице-носителе из оксида алюминия и кремнийорганического полимера полиметилоксана (ЛС на основе ЛОАП), порошок белого цвета с

размером частиц 0,1 мм. Готовая лекарственная форма представляет собой пакетики «саше» по 10 г ЛС на основе ЛОАП (ООО «Санат», Новосибирск; АО «СЦФБ», Новосибирск).

Фармакокинетические параметры изучались при однократном и курсовом внутрижелудочном введении ЛС на основе ЛОАП в двух дозах двум видам лабораторных животных – половозрелым конвенциональным аутбредным крысам и половозрелым конвенциональным кроликам породы шиншилла. Все экспериментальные работы и расчет фармакокинетических параметров проводились в соответствии с общепринятыми рекомендациями [2–4, 7, 9]. Высвобождение ионов лития с поверхности порошкообразного ЛС в плазму крови исследовали при однократном и курсовом внутрижелудочном введении ЛС на основе ЛОАП в дозах 200, 400 и 800 мг/кг массы двум видам животных – крысам и кроликам. Забор крови осуществляли через 0 ч (непосредственно перед введением ЛС на основе ЛОАП), 0,17 ч, 0,33, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч. Кровь и органы у крыс забирали после декапитации в CO_2 -камере. Отобранные образцы крови помещали в чистые пробирки и хранили при температуре -20 °С до выполнения анализа. Полученные образцы тканей и органов промывали в физиологическом растворе и замораживали в индивидуальных контейнерах при температуре -20 °С до выполнения анализа.

Количественное определение ионов лития в биологических объектах (сыворотка крови, органы и ткани животных, продукты экскреции) проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно-связанной плазмой модели IRIS Advantage (Jarrell Ash., США) с рабочим диапазоном длин волн от 170 до 800 нм. Аналитическая длина волны для ионов лития – 670,784 нм. Работы выполняли в аналитической лаборатории ФГБУН Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН. Метод анализа предполагает переведение биологических проб в раствор. Для этого необходимо выполнить предварительную пробоподготовку с целью разрушения органической части пробы, мешающей определению ионов лития в растворе. Разработаны методики пробоподготовки из замороженного состояния для крови, почек, печени, мозга, сердца, мышц, мочи и кала животных. Для получения калибровочных графиков использовали чистые водные растворы соединений лития, приготовленные с использованием государственных стандартных образцов ГСО 5224-90 с добавлением внутреннего стандарта скандия. Для каждой серии однородных проб готовили

один или два холостых опыта, повторяя все операции, выполняемые для проб. Результаты фотометрирования холостых проб показали, что все применяемые реактивы были чистыми по литию в пределах реализуемых концентраций.

После калибровки спектрометра по литию на длине волны 670,784 нм распыляли сначала холостые пробы, а затем пробы биологического материала. Через каждые 10–12 проб снимали показатель для раствора сравнения, близкого по концентрации ионов лития к каждой серии проб, что необходимо для учета некомпенсируемого дрейфа сигнала. При отклонении значения концентрации ионов лития в растворе сравнения от номинального значения для предыдущей серии проб вводили корректирующий коэффициент, который, как правило, составлял 2–5 %. Кроме того, ряд одних и тех же проб снимали в разные дни, при этом отклонение составило 0–10 %. При параллельном определении ряда проб крови с разными навесками отклонение составило 5–20 % для содержания лития 0,1–0,6 мкг/г.

Расчет концентрации лития в крови, почках, печени, мозге, сердце, мышцах, сальниках, кале производили по следующей формуле: $C = (A \times V/m) \times 100 \% \times 10000$, где C – содержание лития в биологической пробе, мкг/г; A – концентрация лития в растворе пробы, мг/л (высвечивающаяся на дисплее прибора); V – объем раствора (для проб крови – 0,01 л, для проб почек, печени, мозга, сердца, мышц, сальника – 0,005 л, для проб кала – 0,1 л); m – масса навески, мг; 10000 – коэффициент пересчета из процентов в массовые доли, мкг/г. Концентрацию лития в моче рассчитывали по формуле: $C = A \times 50$, где C – содержание лития в пробе мочи, мкг/г; A – концентрация лития в растворе пробы, мкг/л; 50 – коэффициент разбавления 2 мл пробы до 100 мл.

Расчет фармакокинетических параметров ЛС на основе ЛОАП в плазме крови кроликов и крыс проводили модельным способом путем построения двухкамерных моделей (центральная камера – кровь и интерстициальная жидкость, периферическая камера – ткани исследуемых органов), в тканях и органах – модельно независимым методом статистических моментов. Рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: максимальное экспериментальное значение концентрации ЛС в плазме крови (органе/ткани) после однократного введения ЛС – C_{max} ; площадь под экспериментальной кривой концентрации лития в плазме крови за исследуемый период – AUC_{0-t} ; период полувыведения субстанции лития – $T_{1/2}$; среднее время удерживания субстанции лития в органе – MRT; константу элиминации –

k_{el} ; тканевую доступность – F ; коэффициент тканевого распределения – K_p .

Распределение ЛС в организме кроликов оценивали путем определения и сопоставления основных фармакокинетических параметров в различных органах (печень, мозг, сальник, скелетная мышца, почки, сердце). Тканевую доступность рассчитывали по формуле: $F = AUC_t/AUC_p$, где t – ткани, p – плазма. Коэффициент тканевого распределения определяли по формуле: $K_p = C_t/C_p$, где C_t и C_p – концентрация соответственно в тканях органа и в плазме. Для вычисления C_t и K_{el} конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывали с помощью линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных по изучению количества лития в плазме крови кроликов после внутрижелудочного введения в дозах 200, 400 и 800 мг/кг установлен линейный характер фармакокинетики ЛС на основе ЛОАП; концентрационные профили представлены на рис. 1. Для проверки линейности фармакокинетики исследуемого вещества проводили сравнение фармакокинетических данных, полученных при введении исследуемого препарата в различных дозах и рассчитанных в рамках двухкамерной модели. На основании приведенных в табл. 1 результатов можно резюмировать, что линейность дозозависимого фармакокинетического параметра – площади под фармакокинетической кривой, а также инвариантность дозозависимых параметров, таких как клиренс, константа элиминации, объем распределения и среднее время удерживания, достоверно доказывают линейность фармакокинетики в диапазоне доз от 200 до 800 мг/кг.

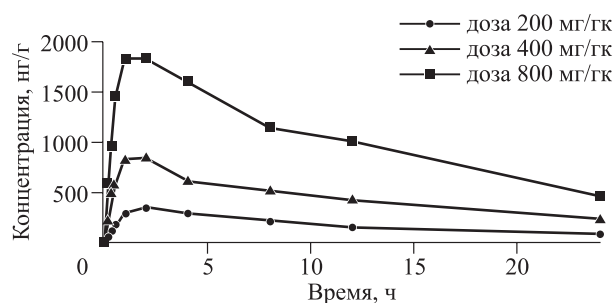


Рис. 1. Профиль концентраций лития в плазме крови кроликов после внутрижелудочного введения в дозах 200, 400 и 800 мг/кг

Fig. 1. The profile of plasma lithium concentrations in rabbits after intragastric administration at doses of 200, 400 and 800 mg/kg

Таблица 1. Инвариантность фармакокинетических параметров от введенной дозы при внутрижелудочном введении ЛС на основе ЛОАП

Table 1. Invariance of pharmacokinetic parameters at the administered dose during intragastric administration of drugs based on LOAP

| Доза ЛОАП, мг/кг | Параметр | | | | | |
|------------------|----------------|--------------------|--------------|--------|------------------|--------|
| | K_{el} , 1/ч | C_1 , л/(кг × ч) | V_1 , л/кг | MRT, ч | AUC, (нг × ч)/мл | AUC/D |
| 200 | 0,063 | 0,09 | 1,065 | 21,097 | 5961,1 | 5961,1 |
| 400 | 0,062 | 0,09 | 1,101 | 20,450 | 15678,0 | 7839,0 |
| 800 | 0,062 | 0,09 | 0,606 | 16,502 | 32787,1 | 8196,8 |

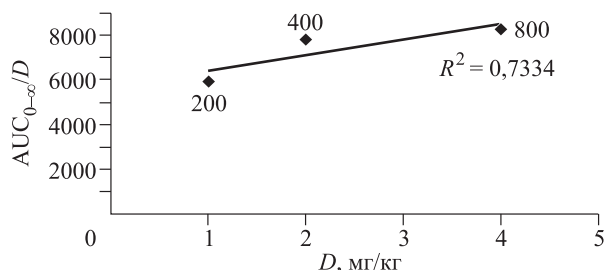


Рис. 2. Зависимость площади под фармакокинетической кривой от дозы

Fig. 2. Dose dependence on the area under the pharmacokinetic curve

Расчет параметра AUC/D проводили в пересчете на содержание лития в ЛС на основе ЛОАП, таким образом, при введении доз 200, 400 и 800 мг/кг для расчета использовали содержание лития в ЛОАП 1, 2 и 4 мг/кг соответственно. Анализ зависимости AUC/D от дозы (рис. 2) показывает линейную зависимость с коэффициентом корреляции 0,73. Результаты оценки линейности показали, что в диапазоне доз от 200 до 800 на-

блюдается линейный характер; небольшие отклонения, возможно, связаны с насыщением процесса элиминации в диапазоне от 200 до 800 мг/кг.

Для расчета фармакокинетических параметров ЛС на основе ЛОАП после однократного внутривенного введения была построена математическая модель, адекватно описывающая фармакокинетические процессы. Далее проводилась оценка фармакокинетических параметров после внутрижелудочного введения ЛС на основе ЛОАП в дозе от 200 до 800 мг/кг. Сравнение фармакокинетических параметров у кроликов и крыс показано в табл. 2.

Степень перехода лекарственного средства из системной циркуляции в ткани и органы кроликов определяется такими факторами, как поток крови через орган, объем ткани, свойства клеточных мембран и физико-химические свойства вещества. Степень насыщенности веществом исследуемых тканей и органов оценивали на основании рассчитанного параметра коэффициента распределения. Количественная оценка распределения

Таблица 2. Сравнение фармакокинетических параметров после внутрижелудочного и внутривенного введения

Table 2. Comparison of pharmacokinetic parameters after intragastric and intravenous administration

| Доза, мг/кг | K_{el} , 1/ч | C_1 , л/(кг × ч) | MRT, ч | AUC, (нг × ч)/мл | V_1 , л/кг | α , 1/ч | β , 1/ч | $T_{1/2\alpha}$, ч | $T_{1/2\beta}$, ч | T_{max} , ч | F, % |
|---------------------------------|----------------|--------------------|--------|------------------|--------------|----------------|---------------|---------------------|--------------------|---------------|-------|
| <i>Кролики</i> | | | | | | | | | | | |
| 200, однократно внутривенно | 0,21 | 0,09 | 12,37 | 11195,71 | 0,43 | 5,128 | 0,079 | 0,14 | 8,78 | 0,83 | 100 |
| 200, однократно внутрижелудочно | 0,063 | 0,09 | 21,097 | 5961,1 | 1,065 | 0,234 | 0,047 | 2,968 | 14,620 | 2,019 | 53,93 |
| 400, однократно внутрижелудочно | 0,062 | 0,09 | 20,450 | 15677,97 | 1,101 | 0,685 | 0,049 | 1,011 | 14,172 | 1,540 | 71 |
| 800, однократно внутрижелудочно | 0,062 | 0,09 | 16,502 | 32787,1 | 0,606 | 0,219 | 0,061 | 3,159 | 11,436 | 1,781 | 74 |
| <i>Крысы</i> | | | | | | | | | | | |
| 400, однократно внутрижелудочно | 0,149 | 0,18 | 10,267 | 5149,78 | 1,151 | 2,120 | 0,097 | 0,327 | 7,115 | 0,310 | – |
| 400, курсовая внутрижелудочно | 0,083 | – | 13,089 | 13421,57 | – | 0,805 | 0,076 | 0,861 | 9,071 | 0,346 | – |

Таблица 3. Коэффициент распределения в органах и тканях

Table 3. The coefficient of distribution in organs and tissues

| Время, ч | Мозг | Печень | Мышцы | Почки | Сердце | Сальник |
|----------|------|--------|-------|-------|--------|---------|
| 0,17 | 0,06 | 1,52 | 0,37 | 2,80 | 1,58 | 0,16 |
| 0,33 | 0,08 | 1,01 | 0,45 | 3,52 | 2,04 | 0,10 |
| 0,5 | 0,12 | 1,19 | 0,65 | 4,63 | 1,96 | 0,16 |
| 1 | 0,20 | 1,02 | 0,77 | 4,77 | 1,94 | 0,13 |
| 2 | 0,28 | 0,75 | 0,81 | 4,83 | 1,63 | 0,07 |
| 4 | 0,53 | 0,70 | 1,11 | 2,44 | 1,30 | 0,09 |
| 8 | 0,69 | 0,44 | 1,29 | 2,83 | 1,06 | 0,10 |
| 12 | 0,92 | 0,36 | 1,46 | 3,12 | 0,98 | 0,03 |
| 24 | 1,68 | 0,30 | 1,76 | 1,83 | 1,27 | 0,00 |

лития в ткани и органы крыс после однократно-го внутрижелудочного введения в дозе 400 мг/кг представлена в табл. 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований фармакокинетики ЛС на основе ЛОАП проведена оценка фармакокинетических параметров ЛС на лабораторных животных (кролики, крысы) в диапазоне доз от 200 до 800 мг/кг при внутрижелудочном и внутривенном введениях. Для каждой концентрационной зависимости от времени была подобрана математическая модель, адекватно описывающая фармакокинетические кривые. В результате расчета параметров в рамках двухкамерной модели было показано, что константа фазы элиминации (β -фаза) составляет от 0,047 до 0,097 1/ч. Наиболее быстрый процесс распределения (α -фаза) наблюдался при внутрижелудочном введении исследуемого вещества крысам в дозе 400 мг/кг и препарата сравнения лития цитрата 4-водного с периодом полураспределения 0,327 и 0,538 ч соответственно. При внутрижелудочном введении ЛС на основе ЛОАП кроликам наблюдался длительный участок распределения (α -фаза) с периодом полураспределения 2,02, 1,01 и 3,16 ч при введении доз 200, 400 и 800 мг/кг соответственно. Показано, что во всех случаях параметры, описывающие терминальный участок кривой, были схожи, константа элиминации составила $0,105 \pm 0,05$ 1/ч. Наиболее длительный процесс элиминации вещества наблюдался при внутрижелудочном введении ЛС на основе ЛОАП кроликам, константа элиминации составила $0,063 \pm 0,0003$ 1/ч, время удерживания – $19,35 \pm 2,03$ 1/ч. При внутрижелудочном введении ЛС на основе ЛОАП крысам процесс элиминации протекал более ускоренно, константа элиминации равнялась $0,114 \pm 0,027$ 1/ч, время удерживания – $11,61 \pm 1,16$ 1/ч.

Результаты исследования биодоступности ЛС на основе ЛОАП при внутрижелудочном введении доз 200, 400 и 800 мг/кг показали, что препарат хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта с биодоступностью от 54 до 74 %. Линейность фармакокинетики достоверно подтверждена сравнительным анализом фармакокинетических параметров. Установлено приращение константы абсорбции и площади под фармакокинетической кривой при повышении дозы, а также инвариантность дозозависимых параметров, таких как клиренс, среднее время удерживания, константа элиминации, период полувыведения.

Исследование тканевого распределения лития при введении ЛС на основе ЛОАП показало, что вещество неравномерно распределяется в организме крыс. Достаточно высокие концентрации были обнаружены в ткани почек и сердца, тканевая доступность для которых составила 3,13 и 1,30 соответственно. В ткани почек и сердца наблюдались наиболее высокие значения коэффициента распределения на протяжении всего временного интервала, с максимальным значением к 2 ч и 20 мин после введения. Проникновение в ткань головного мозга было меньше, время достижения максимальной концентрации – 2,0 ч. Возможно, это обусловлено физиологически затрудненным прохождением через гематоэнцефалический барьер. Среднее время удерживания в ткани мозга составило 20 ч после введения. Наименьшей тропностью вещество обладает к жировой ткани.

Результаты исследования процессов элиминации показали, что основным путем выведения лития из организма крыс является почечная экскреция. За 3 суток после внутрижелудочного введения препарата крысам с мочой выводится 80,2 % от введенной дозы. Суммарное выведение препарата с калом составило 11 % от введенной дозы. При этом в первые сутки из организма выводится основная часть лития – 84 % от введенной дозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бородин Ю.И., Робинсон М.В., Дарнева И.С., Рачковская Л.Н., Королёв М.А., Летыгин А.Ю. Соединения лития в биологии и медицине. Новосибирск: Азарт, 2016. 50 с.
Borodin Yu.I., Robinson M.V., Darneva I.S., Rachkovskaya L.N., Korolev M.A., Letyagin A.Yu. Lithium compounds in biology and medicine. Novosibirsk: Azart, 2016. 50 p. [In Russian].
2. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. Ростов-на-Дону, 2001. 383 с.
Karkishchenko N.N., Khoronko V.V., Sergeeva S.A., Karkishchenko V.N. Pharmacokinetics. Rostov-on-Don, 2001. p. 383. [In Russian].
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
Lakin G.F. Biometrics. Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p. [In Russian].
4. Мирошниченко И.И. Основы фармакокинетики. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. 188 с.
Miroshnichenko I.I. Fundamentals of pharmacokinetics. Moscow: GEOTAR-Media, 2002. 188 p. [In Russian].
5. Остренко К.С., Колоскова Е.М. Антидепрессивный эффект аскорбата лития в экспериментальной модели стресса у крыс. *Вестн. науки и образования*. 2016; (1): 19–21.
Ostrenko K.S., Koloskova E.M. The antidepressant effect of lithium ascorbate in experimental model of stress in rats. *Vestnik nauki i obrazovaniya = Bulletin of Science and Education*. 2016; (1): 19–21. [In Russian].
6. Остренко К.С., Расташанский В.В. Влияние различных доз композиции аскорбата лития, пиридоксина гидрохлорида и тиамин мононитрата на нервно-психическое возбуждение и адаптивную активность у крыс. *Наука и мир*. 2016; (1): 104–105.
Ostrenko K.S., Rastashansky V.V. The effect of various doses of the composition of lithium ascorbate, pyridoxine hydrochloride and thiamine mononitrate on neuropsychic excitation and adaptive activity in rats. *Nauka i mir = Science and World*. 2016; (1): 104–105. [In Russian].
7. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. *Фармакология и токсикология*. 1986; (5): 118–125.
Piotrovsky V.K. The method of statistical moments and integral model-independent parameters of pharmacokinetics. *Farmakologiya i toksikologiya = Pharmacology and Toxicology*. 1986; (5): 118–125. [In Russian].
8. Пронин А.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю., Гоголева И.В., Жидоморов Н.Ю. Исследование фармакокинетики и компартментализации аскорбата лития. *Молодой ученый*. 2016; (15): 547–555.
Pronin A.V., Gromova O.A., Torshin I.Yu., Volkov A.Yu., Gogoleva I.V., Zhidomorov N.Yu. Investigation of the pharmacokinetics and compartmentalization of lithium ascorbate. *Molodoy uchenyy = Young Scientist*. 2016; (15): 547–555. [In Russian].
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Общ. ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
Guideline for preclinical studies of drugs. Part One. Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. [In Russian].
10. Социально-значимые заболевания населения России в 2018 году (Статистические материалы). М., 2019. 37.
Socially significant diseases of the Russian population in 2018 (Statistical materials), Moscow, 2019. 37. [In Russian].
11. Ahmed I., Manno F.A.M., Manno S.H.C., Liu Y., Zhang Y., Lau C. Detection of lithium in breast milk and in situ elemental analysis of the mammary gland. *Biomed. Opt. Express*. 2018; 9 (9): 4184–4195. doi: 10.1364/BOE.9.004184
12. Ahmed I., Yang J., Law A.W.L., Manno F.A.M., Ahmed R., Zhang Y., Lau C. Rapid and in situ optical detection of trace lithium in tissues. *Biomed. Opt. Express*. 2018; 9 (9): 4459–4471. doi: 10.1364/BOE.9.004459
13. El-Balkhi S., Megarbane B., Poupon J., Baud F.J., Galliot-Guilley M. Lithium poisoning: is determination of the red blood cell lithium concentration useful? *Clin. Toxicol. (Phila.)*. 2009; 47 (1): 8–13.
14. Ge W., Jakobsson E. Systems biology understanding of the effects of lithium on affective and neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci*. 2018; 12: 933. doi: 10.3389/fnins.2018.00933
15. Kandil E., Dackiw A.P., Alabbas H., Abdullah O., Tufaro A.P., Tufano R.P. A profile of patients with hyperparathyroidism undergoing lithium therapy for affective psychiatric disorders. *Head Neck*. 2011; 33 (7): 925–927.
16. Malhi G.S., Tanious M., Das P., Berk M. The science and practice of lithium therapy. *Aust. N. Z. J. Psychiatry*. 2012. 46: 192–211.
17. Muller-Oerlinghausen B., Lewitzka U. Lithium reduces pathological aggression and suicidality: a mini-review. *Neuropsychobiology*. 2010; 62 (1): 43–49. doi: 10.1159/000314309
18. Post R.M. The new news about lithium: An underutilized treatment in the United States. *Neuropsychopharmacology*. 2018; 43 (5): 1174–1179. doi: 10.1038/npp.2017.238
19. Qassem M., Triantis I., Hickey M., Palazidou E., Kyriacou P. Methodology for rapid assessment of blood lithium levels in ultramicro volumes of blood plasma for applications in personal monitoring of patients with bipolar mood disorder. *J. Biomed. Opt.* 2018; 23 (10): 1–6. doi: 10.1117/1.JBO.23.10.107004
20. Saeidnia S., Abdollahi M. Concerns on the growing use of lithium: the pros and cons. *Iran Red. Crescent. Med. J.* 2013; 15 (8): 629–632. doi: 10.5812/ircmj.13756

Сведения об авторах:

Королев М.А., к.м.н., ORCID: 0000-0002-4890-0847, e-mail: kormax@bk.ru

Коненков В.И., д.м.н., проф., академик РАН, ORCID: 0000-0001-7385-6270, e-mail: vikonenkov@gmail.com

Рачковская Л.Н., к.х.н., e-mail: noolit@niikel.ru

Ершов К.И., к.б.н., e-mail: ershov_k@bk.ru

Байкалов Г.И., e-mail: gbaikalov@yandex.ru

Байкалова Н.Е., e-mail: natalya_m_2205@mail.ru

Бахарева К.И., e-mail: wolfin1@mail.ru

Мадонов П.Г., д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Information about authors:

Korolev M.A., candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4890-0847, e-mail: kormax@bk.ru

Konenkov V.I., doctor of medical sciences, professor, academician of the RAS, ORCID: 0000-0001-7385-6270,
e-mail: vikonenkov@gmail.com

Rachkovskaya L.N., candidate of chemical sciences, e-mail: noolit@niikel.ru

Ershov K.I., candidate of biological sciences, e-mail: ershov_k@bk.ru

Baykalov G.I., e-mail: gbaikalov@yandex.ru

Baykalova N.E., e-mail: natalya_m_2205@mail.ru

Bakhareva K.I., e-mail: wolfin1@mail.ru

Madonov P.G., doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНУ УРОКИНАЗЫ НА УРОВЕНЬ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В ТКАНЯХ МЫШЕЙ – НОСИТЕЛЕЙ МЕЛАНОМЫ

Елена Михайловна ФРАНЦИЯНЦ, Ирина Викторовна КАПЛИЕВА,
Екатерина Игоревна СУРИКОВА, Ирина Валерьевна НЕСКУБИНА,
Валерия Ахтямовна БАНДОВКИНА, Лидия Константиновна ТРЕПИТАКИ,
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 динамику биогенных аминов в головном мозге, опухоли и коже на 21-е сутки развития меланомы B16/F10 у мышей с нокаутом по гену урокиназы (uPA). **Материал и методы.** Исследование проведено на разнополых мышях с нокаутом по гену uPA (–uPA, $n = 38$) и животных дикого типа (+uPA, $n = 61$). Меланому перевивали подкожно. Методом ИФА определяли содержание биогенных аминов в тканях, изъятых на 21-е сутки канцерогенеза. **Результаты и их обсуждение.** У интактных (–uPA) мышей было повышено суммарное содержание биогенных аминов: в коже – за счет роста уровня норадреналина в 4,8 раза у самцов и в 4,9 раза у самок, гистамина – в 3,6 раза у самцов и в 1,6 раза у самок, серотонина – в 3,4 раза у самцов и в 8,3 раза у самок; в головном мозге – за счет роста концентрации норадреналина в 3,5 раза у самцов и в 3,2 раза у самок, дофамина – в 2,1 раза у самцов и в 2,9 раза у самок, при этом содержание гистамина падало. Отличительными чертами развития меланомы у (–uPA) мышей были: меньший уровень адреналина на фоне более высокой концентрации норадреналина и увеличения метаболизма серотонина в головном мозге; большая концентрация гистамина в опухоли и больший уровень серотонина в коже; идентичное (+uPA) мышам содержание адреналина (самцы) и норадреналина (все) в опухоли и большие уровни адреналина в опухоли и гистамина в коже у (–uPA) самок. **Заключение.** Нокаут по гену uPA ограничивает развитие стресса на центральном регуляторном уровне путем формирования меньшего уровня адреналина на фоне увеличения серотонинергической медиации в головном мозге, а также модулирует иммунный противоопухолевый ответ за счет больших уровней гистамина в опухоли и серотонина в коже, вследствие меньшей активности моноаминоксидазы, у мышей – носителей меланомы B16/F10.

Ключевые слова: биогенные амины, кожа, меланома, головной мозг, нокаут по гену uPA, мыши.

Конфликт интересов. Авторы отрицают наличие конфликта интересов.

Автор для переписки: Нескубина И.В., e-mail: kaplirina@yandex.ru

Для цитирования: Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепитаки Л.К., Погорелова Ю.А., Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на уровень биогенных аминов в тканях мышей – носителей меланомы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 22–30. doi: 10.15372/SSMJ20190603

EFFECT OF UROKINASE GENE KNOCKOUT ON TISSUE LEVELS OF BIOGENIC AMINES IN MICE WITH MELANOMA

Elena Mikhaylovna FRANTSIYANTS, Irina Viktorovna KAPLIEVA,
Ekaterina Igorevna SURIKOVA, Irina Valerievna NESKUBINA,
Valeriya Akhtyamovna BANDOVKINA, Lidia Konstantinovna TREPITAKI,
Yuliya Aleksandrovna POGORELOVA, Lyudmila Anatolievna NEMASHKALOVA

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

The research aim was to study the dynamics of biogenic amines in the brain, tumor and intact skin of urokinase (uPA) gene knockout mice on day 21 of the B16/F10 melanoma growth. **Material and methods.** The study included male and female uPA gene knockout (–uPA, $n = 38$) and wild type mice (+uPA, $n = 61$). Melanoma was transplanted subcutaneously. Levels of biogenic amines were studied by ELISA in tissues obtained on day 21 of carcinogenesis.

Results and discussion. Intact (–uPA) mice showed an increased total content of biogenic amines: in the skin – due to noradrenaline increase by 4.8 times in males and by 4.9 times in females, histamine – by 3.6 times in males and by 1.6 times ($p < 0.05$) in females, serotonin – by 3.4 times in males and by 8.3 times in females; in the brain – due to noradrenaline increase by 3.5 times in males and by 3.2 times in females, dopamine by 2.1 times in males and by 2.9 times in females, while histamine content decreased. Melanoma development in (–uPA) mice was characterized by: lower levels of adrenaline with high NA concentrations and an increase in the serotonin metabolism in the brain; higher histamine concentrations in the tumor and higher serotonin levels in the skin; similar to (+uPA) mice levels of adrenaline (males) and noradrenaline in the tumor and higher levels of adrenaline in the tumor and histamine in the skin in (–uPA) females. **Conclusions.** The uPA gene knockout limits the development of stress at the central regulatory level due to lower levels of A together with increasing serotonergic mediation in the brain, as well as modulates the immune antitumor response due to higher levels of histamine in the tumor and 5 serotonin in the skin, as a result of lower monoamine oxidase activity, in mice with B16/F10 melanoma.

Key words: biogenic amines, skin, melanoma, brain, uPA gene knockout, mice.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contact person: Neskubina I.V., e-mail: kaplirina@yandex.ru

For citation: Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Neskubina I.V., Bandovkina V.A., Trepitaki L.K., Pogorelova Yu.A., Nemashkalova L.A. Effect of urokinase gene knockout on tissue levels of biogenic amines in mice with melanoma. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 22–30. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190603

Меланома – это сложное заболевание с этиологическими, гистологическими, генетическими особенностями и разными терапевтическими реакциями. Модели мышей с измененным геномом являются важным инструментом для изучения молекулярных механизмов развития меланомы [13]. Динамическое развитие генной инженерии позволяет расширить информацию о роли тех или иных генов в канцерогенезе и прогрессировании злокачественного процесса.

Известно, что в коже, одном из самых объемных барьерных «органов» нейроэктодермального происхождения, синтезируются биогенные амины, которые местно участвуют в различных физиологических и патологических процессах. Установлено, что серотонин индуцирует меланогенез в клетках меланомы кожи SK-MEL-2 и B16/F10 [8, 18]. Рецептор гистамина HR4 играет решающую роль в регуляции пролиферации и прогрессировании меланомы человека, поэтому считается, что гистамин может использоваться в комбинированной терапии для повышения эффективности при ее лечении [9, 10]. Высокая концентрация катехоламинов в зоне роста злокачественных опухолей на ранних стадиях канцерогенеза, так же как и в период эмбрионального развития, способствует выживанию и пролиферации неопластических клеток в условиях гипоксии [5]. Клетки меланомы экспрессируют β -адренергические рецепторы, которые, в свою очередь, активируются при метастатической меланоме [4]. Уровень дофамина в коже коррелирует с частотой возникновения в ней меланоцитарных и немеланоцитарных опухолей [17].

Также доказано участие системы «uPA – рецептор uPA» в образовании опухолей. У мышей с дефицитом uPA замедляется прогрессирование меланомы. В клетках рака молочной железы РНК-опосредованное ингибирование как uPA, так и рецептора uPA одновременно запускает апоптоз через активацию каспазы. Несмотря на то, что обе системы (активации плазминогена и биогенных аминов) отмечены в патогенезе меланомы, данные о взаимном влиянии компонентов этих систем друг на друга в настоящий момент отсутствуют.

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики биогенных аминов в головном мозге, опухоли и коже на 21-е сутки развития меланомы B16/F10 у мышей с нокаутом по гену uPA.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 99 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», одобрены биоэтическим комитетом по работе с животными ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, протокол № 4 от 10.08.2018.

Мыши линии C57BL/6-PlautmI.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu ($n = 38$, в том числе 19 самцов и 19 самок) получены из питомника лабораторных животных «Пушино»; 24 животных с нокаутом uPA (-uPA) составили основную группу, 14 (-uPA) мышей служили интактным контролем к ним. Мыши линии C57BL/6 ($n = 61$, в том числе 32 самца и 29 самок) получены из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА, 47 животных этой линии (+uPA) составили группу сравнения, 14 (+uPA) мышей служили им интактным контролем.

Меланому B16/F10, полученную из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, перевивали под кожу правой подлопаточной области в объеме 0,5 мл (разведение 1 : 10, физиологический раствор), пролиферативный пул опухоли – 71,6 %. Материал для перевивки получали от мышей-доноров линии C57BL/6 на 12–16-е сутки развития опухолей. Головной мозг, опухоль и кожу изымали для исследований на 21-й день канцерогенеза после декапитации мышей на гильотине. Все манипуляции с извлеченными тканями проводили на льду. Из тканей получали 10%-е цитозольные фракции, приготовленные на содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7,4, в которых с помощью стандартных тест-систем для определения адреналина, норадреналина, дофамина, гистамина, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5ОИУК) в тканях у мышей методом ИФА («Cusabio», Китай) определяли со-

держание биогенных аминов и 5ОИУК с соблюдением всех методических рекомендаций производителя.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интактная кожа. В коже (-uPA) мышей обоего пола был выше, чем в коже (+uPA) животных, уровень ряда биогенных аминов: норадреналина – в 4,8 раза у самцов и в 4,9 раза у самок, гистамина – в 3,6 раза у самцов и в 1,6 раза ($p < 0,05$) у самок, серотонина – в 3,4 раза у самцов и в 8,3 раза у самок (табл. 1). По содержанию 5ОИУК статистически значимых различий не выявлено. Концентрация адреналина в интактной коже (-uPA) самцов была такой же, как у (+uPA) мышей, а у (-uPA) самок была больше в 2,6 раза. По уровню дофамина (-uPA) и (+uPA) самки не различались, у (-uPA) самцов он был меньше в 1,5 раза ($p < 0,05$); гендерных различий для дофамина не обнаружено (см. табл. 1). Суммарное содержание биогенных аминов в коже интактных (-uPA) мышей было выше, чем в коже интактных (+uPA) животных, – в 3,3 раза у самцов ($2101,2 \pm 154,3$ и $617,2 \pm 52,1$ нг/г ткани со-

Таблица 1. Содержание биогенных аминов в коже и опухоли у (-uPA) мышей-носителей меланомы

Table 1. Biogenic amine content in the skin and tumor of (-uPA) mice with melanoma

| Содержание биогенного амина | Кожа интактных мышей | | Мыши с меланомой B16/F10 | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | Кожа | | Опухоль | |
| | самцы | самки | самцы | самки | самцы | самки |
| Адреналин, нг/г ткани | 2,7 ± 0,2 | 8,4 ± 0,7 ^{#,Δ} | 3,5 ± 0,3 ^Δ | 7,0 ± 0,6 ^{#,Δ} | 5,3 ± 0,5* | 6,3 ± 0,4 ^{*,Δ} |
| Норадреналин, нг/г ткани | 17,8 ± 1,2 ^Δ | 28,7 ± 2,1 ^{#,Δ} | 15,1 ^Δ ± 1,2 | 6,6 ± 0,5 ^{*,#} | 13,7 ± 2,4 | 11,4 ± 1,1* |
| Дофамин, нг/г ткани | 31,1 ± 2,8 ^Δ | 33,3 ± 2,8 | 33,4 ± 4,4 ^Δ | 77,4 ± 6,3 ^{*,#} | 65,9 ± 5,4 ^{*,+,Δ} | 53,6 ± 4,8 ^{*,+} |
| Гистамин, нг/г ткани | 2047,2 ± 186,3 ^Δ | 2130,1 ± 195,2 ^Δ | 2130,1 ± 187,2 | 2104,8 ± 18,9 ^Δ | 238,4 ± 19,6 ^{*,+,Δ} | 200,7 ± 18,3 ^{*,+,Δ} |
| Серотонин, нг/г ткани | 2,4 ± 0,3 ^Δ | 3,4 ± 0,3 ^Δ | 0,5 ± 0,0 ^{*,Δ} | 0,51 ± 0,0 ^{*,Δ} | 0,70 ± 0,1 ^{*,+} | 3,2 ± 0,4 ^{*,#} |
| 5ОИУК, мкг/г ткани | 0,40 ± 0,02 | 0,26 ± 0,01 [#] | 0,40 ± 0,03 ^Δ | 0,21 ± 0,01 ^{#,Δ} | 0,26 ± 0,03 ^{*,+} | 0,28 ± 0,02 |

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – кожи интактных (-uPA) мышей соответствующего пола, + – кожи (-uPA) мышей с меланомой B16/F10 соответствующего пола, # – самцов той же группы, Δ – (+uPA) мышей.

Таблица 2. Содержание биогенных аминов в коже и опухоли у (+uPA) мышей – носителей меланомы

Table 2. Levels of biogenic amines in the skin and tumors of (+uPA) mice with melanoma

| Содержание биогенного амина | Кожа интактных мышей | | Мыши с меланомой B16/F10 | | | |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| | | | Кожа | | Опухоль | |
| | самцы | самки | самцы | самки | самцы | самки |
| Адреналин, нг/г ткани | 2,9 ± 0,25 | 3,2 ± 0,3 | 19,5 ± 1,8* | 3,0 ± 0,3 [#] | 5,1 ± 0,4* ⁺ | 4,2 ± 0,4* ⁺ |
| Норадреналин, нг/г ткани | 3,7 ± 0,35 | 5,8 ± 0,5 [#] | 27,4* ± 2,5 | 8,5 ± 0,8* [#] | 12,7 ± 1,3* ⁺ | 12,6 ± 1,2* ⁺ |
| Дофамин, нг/г ткани | 45,3 ± 4,2 | 30,9 ± 2,8 [#] | 56,2 ± 5,1 | 26,4 ± 2,4 [#] | 38,8 ± 4,1 ⁺ | 64,3 ± 6,1* ⁺ [#] |
| Гистамин, нг/г ткани | 564,6 ± 52,1 | 1357,7 ± 105,0 | 1734,5 ± 168,0* | 1135,1 ± 97,0 [#] | 67,2 ± 9,1* ⁺ | 109,3 ± 9,8* ⁺ [#] |
| Серотонин, нг/г ткани | 0,71 ± 0,06 | 0,41 ± 0,04 [#] | 0,28 ± 0,02* | 0,38 ± 0,02 | 1,10 ± 0,20* ⁺ | 0,52 ± 0,05* ⁺ [#] |
| 5ОИУК, мкг/г ткани | 0,36 ± 0,03 | 0,32 ± 0,03 | 1,60 ± 0,15* | 0,40 ± 0,04 [#] | 0,25 ± 0,03* ⁺ | 0,23 ± 0,02* ⁺ |

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – кожи интактных (+uPA) мышей соответствующего пола, + – кожи (+uPA) мышей с меланомой B16/F10 соответствующего пола, # – самцов той же группы.

ответственно) и в 1,6 раза ($p < 0,05$) у самок (2203,9 ± 148,3 и 1398,0 ± 115,4 нг/г ткани соответственно). Следовательно, в коже интактных (+uPA) мышей суммарное содержание биогенных аминов у самок было в 2,3 раза больше, чем у самцов, тогда как в коже (-uPA) мышей этот показатель не имел половых различий (табл. 1, 2). При этом у интактных самок дикого типа в коже содержалось больше норадреналина (в 1,6 раза) и гистамина (в 2,4 раза) и меньше дофамина (в 1,5 раза) и серотонина (в 1,7 раза), чем у самцов (см. табл. 2), тогда как у интактных (-uPA) самок – больше адреналина и норадреналина (соответственно в 3,1 раза и 1,6 раза) и меньше 5ОИУК (в 1,5 раза), чем у самцов соответствующей линии (см. табл. 1).

Кожа после перевивки меланомы. В непораженной злокачественным процессом коже (-uPA) самцов значимые изменения найдены только у уровне серотонина – снижение в 4,8 раза без изменения уровня его метаболита (см. табл. 1). У самцов из группы сравнения найдено увеличение содержания адреналина (в 6,7 раза), норадреналина (в 7,4 раза), гистамина (в 3,1 раза), не изменялся уровень дофамина и снижалась концентрация серотонина (в 2,5 раза) при увеличении содержания 5ОИУК (в 4,4 раза) (см. табл. 2). В непораженной злокачественным процессом коже (-uPA) самок по сравнению с кожей интактных животных этой линии найдено снижение уровня норадреналина (в 4,3 раза) и серотонина (в 6,7 раза) без изменения его метаболита. Концентрация гистамина и адреналина оставалась

прежней, а содержание дофамина возросло в 2,3 раза (см. табл. 1). У (+uPA) самок в непораженной коже статистически значимо изменялся только уровень норадреналина (повышался в 1,5 раза) относительно интактных животных соответствующей линии (см. табл. 2). Суммарное содержание биогенных аминов в непораженной злокачественным процессом коже (-uPA) самцов составило 2182,6 ± 125,3 нг/г ткани, у самок (-uPA) – 2196,3 ± 104,8 нг/г ткани и в обоих случаях не имело статистически значимых отличий от показателей в интактной коже этих животных. В непораженной злокачественным процессом коже (+uPA) самцов суммарное содержание биогенных аминов составило 1837,9 ± 95,9 нг/г ткани и было в 3,0 раза больше, чем в коже интактных мышей этой линии; для самок величины соответствующих показателей составили 1173,4 ± 84,8 и 1398,0 ± 19,8 нг/г ткани, статистически значимо не различаясь.

Меланома. В ткани меланомы (-uPA) самцов найдено повышение по сравнению с интактной кожей соответствующих контрольных животных уровня адреналина (в 2,0 раза) и дофамина (в 2,1 раза) и снижение содержания серотонина и его метаболита 5ОИУК (в 3,4 раза и 1,5 раза соответственно). Отдельно стоит отметить резкое падение уровня гистамина (в 8,6 раза) (см. табл. 1). В ткани опухоли (+uPA) самцов отмечено увеличение уровня адреналина (в 1,8 раза), норадреналина (в 3,4 раза) и серотонина (в 1,6 раза) при уменьшении содержания 5ОИУК в 1,4 раза ($p < 0,05$); уровень гистамина был снижен в

8,4 раза. Не обнаружено изменения концентрации дофамина (см. табл. 2). Суммарное содержание биогенных аминов в ткани опухоли (-uPA) самцов было в 6,3 раза меньше, чем в коже интактных животных ($324,0 \pm 27,8$ и $2101,2 \pm 154,3$ нг/г ткани соответственно), в ткани опухоли (+uPA) самцов – в 2,6 раза ($124,9 \pm 13,1$ и $617,2 \pm 52,1$ нг/г ткани соответственно). В ткани меланомы (-uPA) самок обнаружено снижение уровня адреналина (в 1,3 раза), норадrenalина (в 2,5 раза) и резкое падение уровня гистамина (в 10,6 раза) на фоне увеличения содержания дофамина (в 1,6 раза) относительно показателей в коже интактных самок (см. табл. 1). Не найдено изменения концентрации серотонина и его метаболита. В ткани опухоли (+uPA) самок наблюдалось увеличение уровня адреналина (в 1,3 раза), норадrenalина (в 2,2 раза), дофамина (в 2,1 раза), серотонина (в 1,3 раза) на фоне снижения содержания 5ОИУК (в 1,4 раза) и резкого падения уровня гистамина (в 12,4 раза) (см. табл. 2). Суммарное содержание биогенных аминов в ткани опухоли (-uPA) самок было существенно меньше, чем в коже интактных животных соответствующего пола, – в 8,0 раза ($275,2 \pm 19,5$ и $2203,9 \pm 19,8$ нг/г ткани соответственно), так же как и в ткани меланомы (+uPA) самок (в 7,3 раза: $190,9 \pm 14,7$ и $1398,0 \pm 19,8$ нг/г ткани соответственно).

Головной мозг. У интактных (-uPA) мышшей суммарное содержание биогенных аминов в мозге было больше, чем у (+uPA) животных: в 1,8 раза у самцов ($151 \pm 12,8$ и $84,2 \pm 9,1$ нг/г ткани соответственно) и в 1,7 раза у самок ($p < 0,05$) ($137 \pm 14,3$ и $80,9 \pm 7,2$ нг/г ткани соответствен-

но). При этом уровень адреналина у интактных (-uPA) мышшей не имел различий с показателями у (+uPA) животных, тогда как концентрация норадrenalина и дофамина была выше: у самцов – в 3,5 и 2,1 раза, у самок – в 3,2 и 2,9 раза соответственно (табл. 3). Уровень серотонина был выше только у самцов (в 1,9 раза) за счет усиления его синтеза и/или уменьшения инактивации: концентрация 5ОИУК у них снижалась в 1,8 раза. У (-uPA) самок содержание серотонина в мозге не отличалось от величины соответствующего показателя у (+uPA) самок, при этом количество 5ОИУК было в 2,0 раза больше, что свидетельствовало об усилении инактивации серотонина. Содержание гистамина в мозге (-uPA) животных обоего пола было меньше, чем у мышшей из группы сравнения: у самцов – в 2,2 раза, у самок – в 2,1 раза (см. табл. 3).

Процесс канцерогенеза вносил существенные коррективы в аминергический баланс головного мозга у мышшей обеих линий. Так, у (-uPA) мышшей стирались гендерные различия уровня адреналина в мозге, при этом его концентрация становилась меньше, чем у (+uPA) мышшей: у самцов – в 2,9 раза, у самок – в 1,2 раза (см. табл. 3). Содержание норадrenalина у (-uPA) мышшей оставалось высоким: у самцов не изменялось, у самок уменьшалось в 1,5 раза, в результате у (-uPA) самцов концентрация норадrenalина в мозге была в 1,6 раза большей, чем у самок, т.е. регистрировалось такое же гендерное соотношение, как и у (+uPA) мышшей с меланомой, но при большей концентрации этого биогенного амина в мозге. Количество дофамина в мозге у

Таблица 3. Содержание биогенных аминов в головном мозге мышшей-носителей меланомы

Table 3. Levels of biogenic amines in the brain of mice with melanoma

| Содержание биогенного амина | -uPA | | | | +uPA | | | |
|-----------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| | интактные | | с меланомой B16/F10 | | интактные | | с меланомой B16/F10 | |
| | самцы | самки | самцы | самки | самцы | самки | самцы | самки |
| Адреналин, нг/г ткани | $5,7 \pm 0,3$ | $8,6 \pm 0,5^+$ | $7,3 \pm 0,4^{*,\Delta}$ | $7,4 \pm 0,3^{*,\Delta}$ | $5,1 \pm 0,6$ | $8,5 \pm 0,7^+$ | $21,1 \pm 1,9^*$ | $9,0 \pm 0,8^+$ |
| Норадреналин, нг/г ткани | $62,3 \pm 5,1^\Delta$ | $61,4 \pm 6,3^\Delta$ | $65,2 \pm 6,1^\Delta$ | $40,3 \pm 3,8^{*,\Delta}$ | $17,68 \pm 1,9$ | $19,4 \pm 1,8$ | $37,2 \pm 3,3^*$ | $23,2 \pm 2,2^+$ |
| Дофамин, нг/г ткани | $69,0 \pm 6,5^\Delta$ | $50,0 \pm 4,7^{*,\Delta}$ | $44,5 \pm 4,5^{*,\Delta}$ | $33,4 \pm 3,5^{*,+}$ | $32,7 \pm 2,8$ | $17,5 \pm 1,8^+$ | $4,0 \pm 0,5^*$ | $31,0 \pm 3,1^{*,+}$ |
| Гистамин, нг/г ткани | $12,5 \pm 0,9^\Delta$ | $16,4 \pm 1,7^\Delta$ | $21,2 \pm 1,8^*$ | $34,0 \pm 3,6^{*,+}$ | $27,6 \pm 2,8$ | $34,9 \pm 3,2$ | $25,4 \pm 2,3$ | $30,4 \pm 2,9$ |
| Серотонин, нг/г ткани | $1,20 \pm 0,20^\Delta$ | $0,33 \pm 0,03^+$ | $3,00 \pm 0,40^{*,\Delta}$ | $1,90 \pm 0,2^{*,\Delta}$ | $0,62 \pm 0,05$ | $0,43 \pm 0,03^+$ | $0,42 \pm 0,04^*$ | $0,97 \pm 0,05^{*,+}$ |
| 5ОИУК, мк/г ткани | $0,25 \pm 0,04^\Delta$ | $0,30 \pm 0,03^\Delta$ | $0,46 \pm 0,04^{*,\Delta}$ | $0,40 \pm 0,02^{*,\Delta}$ | $0,45 \pm 0,08$ | $0,15 \pm 0,03^+$ | $0,17 \pm 0,02^*$ | $0,23 \pm 0,03$ |

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – интактных мышшей соответствующей линии и пола, + – самцов той же группы, Δ – (+uPA) мышшей.

(-uPA) животных уменьшалось в 1,6 раза, что сохраняло тенденцию превалирования дофамина в мозге у (-uPA) самцов, как и у интактных мышей этой линии, в то время как количество дофамина в мозге у (+uPA) самцов с меланомой резко падало (в 8,2 раза), у (+uPA) самок увеличивалось почти двукратно (см. табл. 3). После перевивки меланомы низкий уровень гистамина в мозге у (-uPA) мышей увеличивался практически до значений мышей без нокаута, но и здесь прослеживалось гендерное неравенство: у (-uPA) самок количество гистамина в мозге было в 1,6 раза ($p < 0,05$) больше, чем у самцов, тогда как у (+uPA) мышей статистически значимой гендерной разницы по содержанию гистамина в мозге не было. Уровень серотонина в мозге у (-uPA) мышей на фоне роста меланомы также увеличивался: у самцов – в 2,5 раза, у самок – в 5,8 раза, однако сохранялось превалирование этого биогенного амина у самцов (в 1,6 раза), как и у интактных животных этой линии, тогда как у (+uPA) мышей концентрация серотонина в мозге увеличивалась только у самок (в 2,3 раза), а у самцов снижалась (в 1,5 раза) по сравнению с контролем. Уровень 5ОИУК возрастал у (-uPA) самцов и самок (в 1,8 и 1,3 раза соответственно) и уменьшался в 2,6 раза у (+uPA) самцов, в результате количество 5ОИУК в мозге у (-uPA) мышей было больше, чем у (+uPA) животных: у самцов – в 2,7 раза, у самок – в 1,7 раза (см. табл. 3). В целом, в мозге (-uPA) мышей с меланомой B16/F10 суммарное содержание биогенных аминов не отличалось от величин соответствующих показателей интактных животных этой линии: у самцов – $141,0 \pm 15,3$ и $151,0 \pm 12,8$, у самок – $117,4 \pm 12,8$ и $137,0 \pm 14,3$ нг/г ткани соответственно. Такая же картина наблюдалась и в мозге (+uPA) мышей: у самцов – $88,3 \pm 9,1$ и $84,2 \pm 10,3$, у самок – $94,2 \pm 11,8$ и $80,9 \pm 10,1$ нг/г ткани соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Кожа может реагировать на неблагоприятные воздействия, а каждый ее тканеспецифичный ответ способен вносить вклад в центральную нейроэндокринную регуляцию. Эта новая концепция тонкой настройки заключается в том, что периферические ткани могут обеспечивать важную модуляцию управления системными регуляторами [7]. Понимание путей, посредством которых кожа может способствовать центральным нейроэндокринным реакциям, обеспечит новые терапевтические подходы к лечению меланомы.

При анализе полученных нами результатов исследования особенностей функционирования аминергической системы у мышей, нокаутиро-

ванных по урокиназе, обращают на себя внимание общие признаки, не зависящие от половой принадлежности животных, и гендерные особенности. К общим признакам можно отнести увеличение суммарного пула биогенных аминов с выраженной гипернорадреналинергией (кожа, мозг) и гипердофаминергией (мозг) в сочетании с гипергистаминергией и гиперсеротонинергией кожи и гипогистаминергией головного мозга. Гендерными особенностям у (-uPA) самок являются увеличение суммарной концентрации катехоламинов в коже (адреналина и норадреналина) и головном мозге (норадреналина, дофамина) без изменения уровня серотонина в головном мозге; у (-uPA) самцов – гиподофаминергия на фоне стабильного суммарного пула катехоламинов в коже, гиперсеротонинергия в сочетании с увеличением суммарного пула катехоламинов (норадреналина, дофамина) в головном мозге.

Для понимания значения полученных результатов необходимо обратиться к роли этих факторов в коже. Синтезированные в коже катехоламины опосредуют свои местные эффекты, вступая в связь с соответствующими рецепторами или посредством нерцепторных механизмов. Вполне вероятно, что кожная катехоламинергическая система будет оказывать влияние на головной мозг путем активации сенсорных нервов или путем воздействия на иммунные клетки, циркулирующие от кожи к другим органам [15]. Клетки кожи млекопитающих обладают способностью продуцировать и метаболизировать серотонин – классический нейротрансмиттер и вазоактивный амин, который является важным медиатором двусторонних взаимодействий между нейроэндокринной системой и кожей. Иммунная и сосудистая системы кожи являются традиционными мишенями для серотонина в биорегуляции, амин опосредует меланогенез-модулирующие эффекты стресса. Рецепторы 5HT_{1A/1B} особенно важны в связи между мозгом и кожей для регуляции пигментации кожи [19]. Кожная серотонинергическая система может быть вовлечена в преобразование световой энергии солнечного излучения в локальные и системные биологические реакции, причем последнее опосредуется через передачу в мозг, эндокринные эффекты или регуляцию системных реакций [15].

Гистамин вырабатывается клетками эпидермиса и дермы и действует локально, модулируя функцию кератиноцитов, меланоцитов и клеток иммунной системы кожи. Это влияет на внутриклеточные сигнальные каскады, пролиферацию клеток и меланогенез. Гистамин передает сигналы клеткам иммунной системы и влияет на их миграцию и паттерны секреции цитокинов, мо-

дулирует иммунные ответы типа Th2 и экспрессию антимикробных пептидов. Таким образом, гистамин является важной частью нервно-иммунноэндокринной системы кожи с локальными и системными эффектами [14].

Нами установлено, что суммарное содержание биогенных аминов в коже, не пораженной злокачественным процессом, у (-uPA) мышей обоего пола с перевитой меланомой не изменялось по сравнению с показателями в коже интактных животных этой линии, хотя отмечены внутренние перестройки в соотношении индивидуальных катехоламинов у самок. В ткани меланомы (-uPA) мышей, напротив, регистрировалось резкое снижение суммарного содержания биогенных аминов, которое происходило за счет редукции гистамина, также как и у (+uPA) мышей [1]. В целом концентрация гистамина в опухоли у (-uPA) мышей была выше, чем у мышей без генетической мутации. Кроме того, на фоне роста меланомы изначально низкий уровень гистамина головного мозга увеличивался до интактных значений (+uPA) мышей. Хотя существует ряд исследований, описывающих действие гистамина как модулятора пролиферации некоторых опухолей, его роль в этиопатогенезе злокачественной меланомы до сих пор не доказана [10]. Похоже, что влияние гистамина на пролиферацию опухоли зависит от типа клеток, баланса между различными подтипами рецепторов, концентрацией гистамина, достигнутой в опухолевой среде.

Несмотря на то что нет единого мнения о роли гистамина при меланоме, патогенетическая значимость снижения его уровня в ткани этой опухоли, показанного в настоящем исследовании, подтверждается рядом экспериментальных и клинических работ. Так, эксперименты *in vivo* на модели первичной меланомы человека M1/15 показали, что у мышей, получающих гистамин, отмечено увеличение средней выживаемости, связанное с уменьшением роста опухоли и внутриопухолевой неоваскуляризацией. Многочисленные клинические испытания II и III фазы по метастатической меланоме также продемонстрировали клиническую пользу гистамина в качестве адьюванта для иммунотерапии IL-2, особенно у пациентов с метастазами меланомы в печени [3]. Восстановление низкого уровня гистамина в головном мозге на фоне роста меланомы, вероятно, было обусловлено его участием в эндокринном контроле и гомеостатической регуляции, изменившихся в ходе канцерогенеза.

Рассматривая уровень катехоламинов и серотонина в головном мозге, меланоме и коже, не затронутой патологическим процессом, у мышей с нокаутом по урокиназе в сравнительном аспекте

с показателями генетически полноценных животных, складывается впечатление об ингибировании стресса, имеющего место у мышей из группы сравнения. Так, у (-uPA) животных на фоне роста меланомы наблюдалось уменьшение содержания или низкий уровень стресс-реализующих биогенных аминов (адреналина, норадреналина): меньшая концентрация адреналина в мозге у всех (-uPA) мышей, по сравнению с (+uPA) животными; снижение изначально высокого уровня норадреналина в коже, опухоли и мозге у (-uPA) самок и меньшая выраженность гипернорадреналинергии кожи у (-uPA) самцов, по сравнению с (+uPA) самцами, сочетались с высоким уровнем стресс-лимитирующих биогенных аминов (дофамина, серотонина) в головном мозге, при этом содержание дофамина (самцы) и серотонина (все (-uPA) животные) было больше, чем у (+uPA) мышей. По всей видимости, высокая концентрация дофамина и увеличение интенсивности метаболизма серотонина в мозге при росте меланомы у мышей с нокаутом по урокиназе направлены на ограничение прогрессирования неоплазмы как выраженного стрессирующего фактора. Выявленные признаки ингибирования стресса у (-uPA) мышей на фоне канцерогенеза согласуются с менее агрессивным течением меланомы B16/F10 у мышей этой линии, описанным нами ранее [2], и с результатами других исследователей, установивших *in vitro* роль стресса как кофактора в развитии меланомы и подавление норадреналинзависимых ответов, ингибирующее ангиогенез и нарушающее миграцию раковых клеток при действии β -блокаторов и пропранолола [6].

Считается, что нейроиммуноэндокринная схема связи между мозгом и кожей лежит в основе многих заболеваний кожи, в том числе и при меланоме [19]. Кожа и мозг совместно используют несколько одинаковых нейрогормонов, нейротрансмиттеров и нейропептидов, и эти сигналы опосредуют и модулируют реакцию на системный стресс, изменяющий гомеостаз клеток кожи [12]. Стимулирующие факторы, такие как ультрафиолетовый свет, нейрогормоны и нейропептиды, могут влиять на функцию меланоцитов в реакции нейроэндокринного стресса. Pang et al. установили, что хронический стресс может подавлять меланогенез у мышей C57BL/6 и снижать экспрессию мРНК ключевых факторов на кожной оси «гипоталамус – гипофиз – надпочечники» (ГГН) [11]. Из-за эволюционного сохранения ГГН-подобных сетей на центральном и кожном уровнях могут существовать взаимодействия между этими системами, и такие взаимодействия могут влиять на функции каждой системы [16]. Например, ультрафиолетовое облучение кожи

приводит к возбуждению центральной нервной системы [6], а кожные заболевания связаны с более высокой активностью центральной оси ГГН [20].

Следовательно, можно предположить, что изменение уровня и индивидуального состава биогенных аминов в коже и головном мозге (–uPA) мышей связано с сигнализацией клеток кожи в ЦНС как об изменении метаболических процессов, опосредуемых главным образом нейротрансмитерами, так и о модуляции иммунных свойств кожи. Учитывая увеличение уровня некоторых катехоламинов, серотонина и гистамина, можно говорить о том, что нокаут по урокиназе приводит к повышению иммунной функции кожи животных. И такое состояние будет коррелировать с замедлением роста и прогрессирования злокачественной опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нокаут по гену uPA ограничивает развитие стресса на центральном регуляторном уровне путем формирования меньшего уровня адреналина на фоне увеличения серотонинергической медиации в головном мозге, а также модулирует иммунный противоопухолевый ответ за счет увеличения содержания гистамина в опухоли и серотонина в коже вследствие меньшей активности моноаминоксидазы у мышей-носителей меланомы B16/F10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котиева И.М., Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Влияние экспериментальной хронической боли на уровень биогенных аминов в коже у мышей в динамике роста меланомы B16/F10. *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки.* 2018; 198 (1): 130–139.

Kotieva I.M., Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Effect of experimental chronic pain on levels of biogenic amines in skin of mice in dynamics of B16/F10 melanoma growth. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennyye nauki = University news. North-Caucasian region. Natural Sciences Series.* 2018; 198 (1): 130–139. [In Russian].

2. Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепитакки Л.К., Лесовая Н.С., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сиб. науч. мед. журн.* 2019; 39 (4): 62–70. doi: 10.15372/SSMJ20190408

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

3. Agarwala S.S., Glaspy J., O'Day S.J., Mitchell M., Gutheil J., Whitman E., Gonzalez R., Hersh E., Feun L., Belt R., Meyskens F., Hellstrand K., Wood D. Results from a randomized phase III study comparing combined treatment with histamine dihydrochloride plus interleukin-2 versus interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 125–133.

4. Calvani M., Pelon F., Comito G., Taddei M.L., Moretti S., Innocenti S., Chiarugi P. Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity through β 3-adrenoreceptors during melanoma progression. *Oncotarget.* 2015; 6 (7): 4615–4632. doi:10.18632/oncotarget.2652

5. Calvani M., Cavallini L., Tondo A., Spinelli V., Ricci L., Pasha A., Bruno G., Buonvicino D., Bigagli E., Vignoli M., Bianchini F., Sartiani L., Lodovici M., Semeraro R., Fontani F., de Logu F., Dal Monte M., Chiarugi P., Favre C., Filippi L. β 3-Adrenoreceptors control mitochondrial dormancy in melanoma and embryonic stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018; 2018: 816508. doi: 10.1155/2018/6816508

6. De Giorgi V., Grazzini M., Benemei S. Propranolol for off-label treatment of patients with melanoma: results from a cohort study. *JAMA Oncol.* 2018; 4 (2): ID e172908. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.2908

7. Jozic I., Stojadinovic O., Kirsner R.S., Tomic-Canic M. Skin under the (spot)-light: cross-talk with the central hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Invest. Dermatol.* 2015; 135 (6): 1469–1471. doi: 10.1038/jid.2015.56

8. Lee H.J., Park M.K., Kim S.Y., Park Choo H.Y., Lee A.Y. Serotonin induces melanogenesis via serotonin receptor 2A. *Br. J. Dermatol.* 2011; 165: 1344–1348. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10490.x

9. Massari N.A., Medina V.A., Cricco G.P., Martinel Lamas D.J., Sambuco L., Pagotto R., Ventura C., Ciralo P.J., Pignataro O., Bergoc R.M., Rivera E.S. Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma. *J. Dermatol. Sci.* 2013; 72: 252–262. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.07.012

10. Massari N.A., Nicoud M.B., Sambuco L., Cricco G.P., Martinel Lamas D.J., Herrero Ducloux M.V., Medina V.A. Histamine therapeutic efficacy in metastatic melanoma: Role of histamine H4 receptor agonists and opportunity for combination with radiation. *Oncotarget.* 2017; 8 (16): 26471–26491. doi: 10.18632/oncotarget.15594

11. Pang S., Wu H., Wang Q., Cai M., Shi W., Shang J. Chronic stress suppresses the expression of cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis elements and melanogenesis. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e98283. doi: 10.1371/journal.pone.0098283
12. Paus R., Theoharides T.C., Arck P.C. Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends Immunol.* 2006; 27 (1): 32–39. doi: 10.1016/j.it.2005.10.002
13. 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
14. Slominski A., Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr. Rev.* 2000; 21: 457–487. doi: 10.1210/edrv.21.5.0410
15. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Skobowiat C., Zbytek B., Slominski R.M., Steketee J.D. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2012; 212 (v, vii): 1–115. doi: 10.1007/978-3-642-19683-6_1
16. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Zbytek B., Tobin D.J., Theoharides T.C. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr. Rev.* 2013; 34: 827–884. doi: 10.1210/er.2012-1092
17. Tchernev G., Lozev I., Temelkova I., Chernin S., Yungareva I. Schizophrenia as potential trigger for melanoma development and progression! The psychoneuro-endocrine-oncology (P.N.E.O) network! *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2018; 6 (8): 1442–1445. doi: 10.3889/oamjms.2018.276
18. Wu H.L., Pang S.L., Liu Q.Z., Wang Q., Cai M.X., Shang J. 5-HT1A/1B receptors as targets for optimizing pigmentary responses in C57BL/6 mouse skin to stress. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e89663. doi: 10.1371/journal.pone.0089663
19. Wu H., Zhao Y., Huang Q., Cai M., Pan Q., Fu M., An X., Xia Z., Liu M., Jin Y., He L., Shang J. NK1R/5-HT1AR interaction is related to the regulation of melanogenesis. *FASEB J.* 2018; 32 (6): 3193–3214. doi: 10.1096/fj.201700564RR
20. Zhang X., Yu M., Yu W., Weinberg J., Shapiro J. Development of alopecia areata is associated with higher central and peripheral hypothalamic-pituitary-adrenal tone in the skin graft induced C3H/HeJ mouse model. *J. Invest. Dermatol.* 2009; 129: 1527–1538. doi: 10.1038/jid.2008.371

Сведения об авторах:

Франциянц Е.М., д. б. н., проф., ORCID: 0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Каплиева И.В., к.м.н., ORCID: 0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru
Сурикова Е.И., к.б.н., ORCID: 0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru
Нескубина И.В., к.б.н. ORCID: 0000-0002-7395-3086, e-mail: nes kubina.irina@mail.ru
Бандовкина В.А., к.б.н. ORCID: 0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Трепитаки Л.К., ORCID: 0000-0002-9749-2747, e-mail: legolab69@yandex.ru
Погорелова Ю.А., к.б.н., ORCID: 0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Немашкалова Л.А., ORCID: 0000-0003-2713-8598, e-mail: tilde09@rambler.ru

Information about authors:

Frantsiyants E.M., doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0003-3618-6890, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Kaplieva I.V., candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-3972-2452, e-mail: kaplirina@yandex.ru
Surikova E.I., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-4318-7587, e-mail: sunsur2000@mail.ru
Neskubina I.V., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-7395-3086, e-mail: nes kubina.irina@mail.ru
Bandovkina V.A., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2302-8271, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Trepitaki L.K., ORCID: 0000-0002-9749-2747; e-mail: legolab69@yandex.ru
Pogorelova Yu.A., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2674-9832, e-mail: super.gormon@yandex.ru
Nemashkalova L.A., ORCID: 0000-0003-2713-8598; e-mail: tilde09@rambler.ru

ПОГЛОЩЕНИЕ ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА В СОСТАВЕ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ ЛИПОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ОРГАНАМИ И ТКАНЯМИ КРЫС

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

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

В работе рассмотрены функции основных классов липопротеинов (ЛП) плазмы крови, связанные с транспортом входящих в их состав эфиров холестерина. Цель исследования – изучить особенности поглощения органами и тканями крыс эфиров холестерина, ассоциированных с фракциями ЛП плазмы крови (ЛП очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности), и показать участие различных подфракций ЛПВП в качестве специфических переносчиков эфиров холестерина в основные стероидпродуцирующие органы крыс. **Материал и методы.** Выполнены исследования с *in vivo* с внутривенным введением меченого углеродом олеата холестерина (^{14}C -ОХ), ассоциированного с фракциями ЛП плазмы крови. **Результаты.** Внутривенное введение крысам ^{14}C -ОХ, ассоциированного с ЛПОНП, приводило к максимальному поглощению метки печенью. В три раза меньшее поглощение меченого холестерина наблюдали в надпочечниках, семенниках и в сердечной мышце. В других тканях радиоактивность постепенно уменьшалась в ряду: селезенка > легкие > почки > щитовидная железа и жировая ткань. После введения ^{14}C -ОХ в составе ЛПНП отмечено преимущественное поглощение метки надпочечниками, семенниками, а также печенью. Самое выраженное поглощение меченого холестерина стероидпродуцирующими органами отмечено в результате введения ЛПВП. Изучена динамика поглощения ^{14}C -ОХ в составе ЛПВП надпочечниками и семенниками в различные интервалы времени после введения (30 мин, 3, 6 и 12 ч). Надпочечники активно поглощали ^{14}C -ОХ из ЛПВП, в результате чего радиоактивность ткани быстро увеличивалась и уже через 30 мин практически достигала максимума. В отличие от надпочечников поглощение семенниками характеризовалось постепенным увеличением радиоактивности с максимумом на 6 ч и достаточно резким снижением к 12 ч от начала эксперимента. В опытах *in vitro* показаны различия влияния ЛПВП₂ и ЛПВП₃ на продукцию кортикостерона надпочечниками крыс. **Заключение.** В работе представлены особенности поглощения органами и тканями крыс эфиров холестерина в зависимости от используемого ЛП-переносчика (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП). Кроме того, полученные результаты позволяют считать, что подфракция ЛПВП₃ может являться более предпочтительным источником холестерина для синтеза стероидов в коре надпочечников крыс по сравнению с подфракцией ЛПВП₂.

Ключевые слова: липопротеины очень низкой плотности, липопротеины низкой плотности, липопротеины высокой плотности, эфиры холестерина, транспортные формы, стероидпродуцирующие органы.

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. Поглощение эфиров холестерина в составе различных фракций липопротеинов плазмы крови органами и тканями крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 31–36. doi: 10.15372/SSMJ20190604

UPTAKE OF CHOLESTEROL ESTERS BEING A PART OF THE DIFFERENT FRACTIONS OF BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS BY RATS ORGANS AND TISSUES

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

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

The paper deals with the functions of the main classes of blood plasma lipoproteins (LP) that are associated with the transport of cholesterol esters included in their composition. The aim of the study was to investigate the features of the uptake of cholesterol esters associated with plasma LP fractions (very low (VLDL), low (LDL), and high density LPs (HDL)) by rat organs and tissues, and to show the participation of various subfractions of HDL (HDL₂ and HDL₃) as specific cholesterol carriers in the main steroid-producing organs of rats. **Material and methods.** The *in vivo* studies with intravenous LP injection of ¹⁴C labeled cholesterol oleate (¹⁴C-OCh) associated with plasma LP fractions have been carried out. **Results.** Intravenous injection of a ¹⁴C-OCh in the composition with VLDL led to the maximal mark uptake by the liver. Three times less uptake of labeled cholesterol was observed in the adrenal glands, testes and heart muscle. In other tissues radioactivity gradually decreased in the row: spleen > lungs > kidneys > thyroid gland and adipose tissue. After the injection of ¹⁴C-OCh in the composition of LDL marked predominant uptake of the label by the adrenal glands, testes, and liver. A feature of the use of HDL as a carrier platform for ¹⁴C-OCh is the high accumulation of label in steroid-producing organs: the adrenal glands and testis. The dynamics of uptake of ¹⁴C-OCh in the composition of HDL by the adrenal glands and testes of rats in different time intervals after injection (30 min, 3, 6 and 12 h) was studied. Adrenal cells actively uptake ¹⁴C-OCh from HDL, as a result of which the radioactivity of the tissue increased rapidly and after 30 minutes almost reached its maximum. In contrast to the adrenal glands uptake of the testis was characterized by a gradual increase in radioactivity with a maximum of 6 hours and a rather sharp decrease to 12 hours from the beginning of the experiment. *In vitro* experiments showed the differences in the effect of HDL₂ and HDL₃ on the corticosterone production by the adrenal glands of rats. **Conclusions.** The paper presents the features of uptake of cholesterol esters by organs and tissues of rats depending on the used LP-transporter (VLDL, LDL, HDL). In addition, the results suggest that HDL₃ subfraction may be the more preferred source of cholesterol for steroid synthesis in the adrenal cortex of rats compared to HDL₂ subfraction.

Key words: very low density lipoproteins, low density lipoproteins, high density lipoproteins, cholesterol esters, transport forms, steroid-producing organs.

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., Knyasev R.A., Ryabchenko A.V., Kotova M.V., Trifonova N.V. Uptake of cholesterol esters being a part of the different fractions of blood plasma lipoproteins by rats organs and tissues. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 31–36. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190604

Динамическое равновесие процессов поступления и образования холестерина в организме сводится к поддержанию его строго определенной концентрации в плазматических мембранах, что обеспечивает создание необходимого оптимального физического состояния липидного бислоя мембран, необходимого для нормальной жизнедеятельности клеток организма [16]. Среди переносчиков холестерина особое место занимают липопротеины (ЛП) плазмы крови. Внимание исследователей к этим структурам значительно возросло после открытия в конце 70-х годов «классического» В/Е-рецептор-опосредованного механизма поглощения ЛП низкой плотности (ЛПНП) клетками [7]. В отличие от хорошо охарактеризованных рецепторов ЛПНП, рецепторы ЛП высокой плотности (ЛПВП) оставались неизвестными до середины 90-х годов [3, 4]. Сквенджер-рецептор класса В типа I (SR-BI), или, как его еще называют, «рецептор-мусорщик», был первым белком клеточной поверхности, охарактеризованный как рецептор, физиологически и молекулярно соответствующий ЛПВП [12]. Стало известно, что SR-BI служит посредником

селективного поглощения эстерифицированного холестерина (ЭХС), триглицеридов, фосфолипидов и витамина Е клетками от ЛПВП. Рецептор формирует гидрофобный канал через плазматическую мембрану, по которому осуществляется двунаправленное движение ЭХС. Во время этого перемещения частицы ЛПВП теряют ЭХС без поглощения и обязательной лизосомальной деградации непосредственно самой ЛП-частицы [9, 10, 20].

Селективное поглощение ЭХС ЛПВП в печени является основной функцией SR-BI. Предполагается, что экспрессия SR-BI в гепатоцитах имеет решающее значение в контроле уровня холестерина в плазме; его высокое содержание в стероидогенных тканях указывает на важную роль в поглощении ЭХС для синтеза гормонов [5, 6]. В настоящее время SR-BI клонирован [3, 4] и обнаружен на поверхности жировых клеток [18], моноцитов/макрофагов [15], фибробластов, дендритных клеток, в молочных железах беременных грызунов, в головном мозге мышей [13, 19]. Следует заметить, что имеются наблюдения, свидетельствующие об участии в транспорте холе-

стераина и в регуляции стероидогенеза, помимо ЛПВП, других классов ЛП: очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛПНП [1, 2, 8, 14]. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение особенностей поглощения эфиров холестерина, ассоциированных с основными фракциями ЛП плазмы крови (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП), органами и тканями крыс, а также показать участие различных подфракций ЛПВП в качестве переносчиков ЭХС в стероидпродуцирующие органы крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали меченный углеродом олеат холестерина (^{14}C -ОХ) («Amersham», Англия) в растворе хлороформа со специфической активностью 50 мКи/ммоль. Из раствора ^{14}C -ОХ на роторном испарителе формировалась липидная пленка, которую растворяли в Твине-20 (4%-й раствор в метаноле), высушивали в токе азота и образовавшуюся на дне пробирки пленку инкубировали 2,5 ч при 20 °С со 100 мл плазмы крови человека. Фракции ЛП, содержащие ^{14}C -ОХ, выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования в растворах КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА- Na_2 на центрифуге «Optima L-90K» («Beckman-Coulter», Австрия) с использованием ротора 70.1Ti [11]. Получали три основные фракции ЛП (ЛПОНП ($0,94 < d < 1,006$ г/мл), ЛПНП ($1,006 < d < 1,063$ г/мл) и ЛПВП ($1,063 < d < 1,21$ г/мл)) и анализировали их на наличие радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Марк-II» («Nuclear Chicago, Inc», США) в ЦКП ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины «Современные оптические системы». Фракцию ЛПВП, насыщенную немеченым ОХ, разделяли на две основные подфракции: ЛПВП₂ ($1,063 < d < 1,125$ г/мл) и ЛПВП₃ ($1,125 < d < 1,21$ г/мл).

Опыты *in vivo* проведены на крысах-самцах Вистар массой 180–220 г. Исследования выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Фракции ЛП, содержащие ^{14}C -ОХ, вводили крысам в одну из хвостовых вен. Через 30 мин животных декапитировали под эфирным наркозом. Тушки крыс перфузировали 0,15 М NaCl через аорту и v. porta. Радиоактивность органов и тканей измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark II» («Nuclear Chicago, Inc») в ЦКП ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины «Современные оптические

системы». Динамику поглощения надпочечниками и семенниками крыс ^{14}C -ОХ в составе ЛПВП изучали в различные интервалы времени после введения: 30 мин, 3, 6 и 12 ч. Величину удельной радиоактивности органов и тканей рассчитывали в имп/мин на 1 мг ткани.

Влияние различных подклассов ЛПВП, насыщенных немеченым ОХ, на продукцию кортикоостерона надпочечниками крыс изучали в опытах *in vitro*. Срезы надпочечников инкубировали в термостате при 37 °С с использованием фосфатного буфера Кребса – Рингера (рН 7,4) в течение 1,5 ч. ЛПВП добавляли в количестве 20 мкг белка ЛПВП на 1 мл инкубационной среды. Стероидогенез стимулировали путем добавления адренкортикотропного гормона (АКТГ) («Sigma-Aldrich», CIF. № по каталогу А7075b) в количестве 100 мЕд/мл среды. Содержание гормона в среде инкубации надпочечников определяли иммуноферментным методом с помощью тестов для количественного определения кортикоостерона в сыворотке и плазме крови «corticosterone EIA» производства «Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG» (Германия).

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 считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице представлено распределение радиоактивности в органах и тканях крыс через 30 мин после внутривенного введения ^{14}C -ОХ в составе комплексов с ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП. После введения ^{14}C -ОХ в составе ЛПОНП наибольшая удельная радиоактивность была обнаружена в печени. Почти в три раза меньшее поглощение меченого холестерина наблюдали в надпочечниках и семенниках. В остальных тканях радиоактивность постепенно уменьшалась в ряду: сердечная мышца > селезенка > легкие > почки и щитовидная железа. Минимальное содержание метки было отмечено в жировой ткани. Использование в качестве транспортной платформы для ^{14}C -ОХ фракции ЛПНП выявило некоторые отличия: снизилась радиоактивность печени, а на первое и второе места стали претендовать надпочечники и семенники; далее радиоактивность постепенно убывала в ряду: легкие > жировая ткань > селезенка > сердце > почки и щитовидная железа. Применение ЛПВП в качестве транспортной платформы для ^{14}C -ОХ позволило выявить,

Таблица. Поглощение ^{14}C -ОХ органами и тканями крыс через 30 мин после внутривенного введения в составе комплексов с ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП (имп/мин на 1 мг ткани)

Table. Uptake of ^{14}C -OCh by rat organs and tissues after 30 min intravenous injection as part of complexes with VLDL, LDL and HDL (cpm per 1 mg of tissue)

| Орган/ткань | Радиоактивность, имп/мин на 1 мг ткани | | |
|---------------|--|---------------------------|---------------------------|
| | ЛПОНП- ^{14}C -ОХ | ЛПНП- ^{14}C -ОХ | ЛПВП- ^{14}C -ОХ |
| Печень | 38,9 ± 11,2 | 14,6 ± 2,5 | 20,2 ± 7,5 |
| Легкие | 9,1 ± 1,6 | 10,1 ± 2,1 | 16,5 ± 2,4 |
| Сердце | 10,21 ± 1,8 | 8,5 ± 1,2 | 4,6 ± 0,5 |
| Селезенка | 9,6 ± 2,3 | 9,7 ± 0,5 | 15,7 ± 1,0 |
| Почки | 4,2 ± 0,8 | 5,9 ± 1,8 | 5,4 ± 4,4 |
| Надпочечники | 13,7 ± 2,3 | 18,1 ± 4,7 | 58,6 ± 9,2 |
| Семенники | 12,4 ± 2,6 | 16,6 ± 5,4 | 46,7 ± 7,8 |
| Тимус | 4,1 ± 0,9 | 5,8 ± 0,4 | 7,9 ± 1,6 |
| Жировая ткань | 2,6 ± 0,3 | 10,1 ± 2,6 | 6,8 ± 2,1 |

Примечание. Число животных в каждой группе равно 5.

прежде всего, высокое поглощение меченого холестерина стероидпродуцирующими органами – надпочечниками и семенниками. В печени поглощение метки было в три раза меньше, чем в надпочечниках, и в два раза меньше, чем в семенниках; радиоактивность постепенно уменьшалась в ряду: легкие > селезенка > тимус > жировая ткань > почки и сердечная мышца.

Результаты, представленные в таблице, однозначно свидетельствуют об определенной селективности поглощения меченого холестерина органами и тканями в зависимости от применяемого липопротеинового переносчика. Следует отметить факт обнаружения максимальной удельной радиоактивности в печени при внутривенном введении ^{14}C -ОХ в составе ЛПОНП. Наличие высокого уровня радиоактивности в печени не вызывает сомнения и вполне объясняется ведущей ролью этого органа в метаболизме ЛПОНП и транспортируемых ими различных гидрофобных лигандов как эндогенной, так и экзогенной природы [16]. Преимущественное поглощение метки из ЛПВП надпочечниками и семенниками объясняется тем, что в стероидпродуцирующих органах крыс для синтеза стероидных гормонов используется холестерин и его эфиры сосудисто-го происхождения [1, 2, 5, 6].

Учитывая связь между стероидогенной активностью и фракцией ЛПВП, мы изучили динамику поглощения ^{14}C -ОХ в составе ЛПВП надпочечниками и семенниками крыс в различные интервалы времени после введения. Как следует из рис. 1, клетки надпочечников активно поглощали меченый холестерин из ЛПВП, в результате чего радиоактивность ткани надпочечников уже к 30 мин практически достигла максимума.

Максимальная величина радиоактивности была зарегистрирована через 3 ч после внутривенного введения, ее снижение на 30 % наблюдали лишь через 6 ч после начала эксперимента.

Динамика поглощения семенниками ^{14}C -ОХ в составе ЛПВП была иной. В отличие от надпочечников поглощение характеризовалось постепенным увеличением радиоактивности с максимумом на 6 ч и достаточно резким снижением к 12 ч от начала эксперимента. Таким образом, несмо-

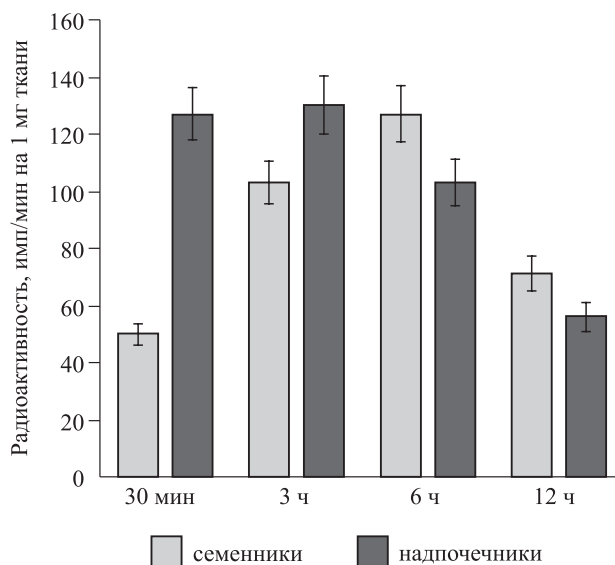


Рис. 1. Динамика поглощения ^{14}C -ОХ в составе ЛПВП надпочечниками и семенниками крыс в различные интервалы времени после внутривенного введения

Fig. 1. Dynamics of uptake of ^{14}C -OCh incorporated into HDL by rat adrenal glands and testis at various time intervals after intravenous injection

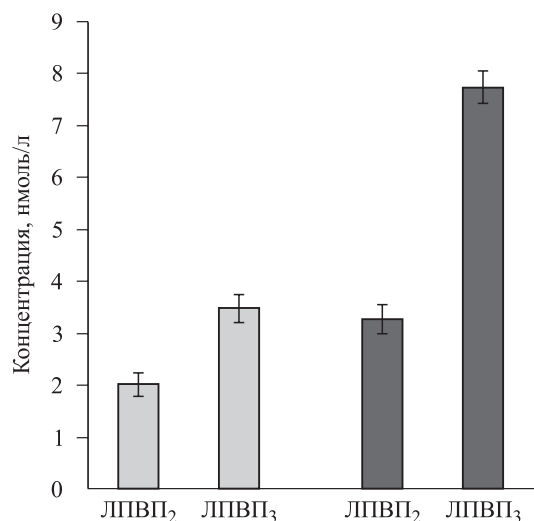


Рис. 2. Влияние подклассов ЛПВП₂ и ЛПВП₃, насыщенных немеченым ОХ, на продукцию кортикостерона надпочечниками крыс в контроле (серые столбцы) и при стимуляции АКТГ (черные столбцы); * – отличие от величины соответствующего показателя группы ЛПВП₂ статистически значимо при $p < 0,05$.

Fig. 2. The effect of subclasses HDL₂ and HDL₃, saturated with unlabeled OCh, on the corticosterone production of rat adrenal gland in the control and at adrenocorticotrophic hormone stimulation; * $p < 0.05$ compared to group HDL₂

тря на то, что клетки этих органов для биосинтеза стероидных гормонов используют холестерин из ЛПВП плазмы крови, активность поглощения эфиров холестерина клетками и, по-видимому, скорость метаболических превращений в них холестерина из частиц ЛПВП различаются. Отмеченные различия в динамике поглощения ¹⁴C-ОХ из ЛПВП несомненно отражают особенности регуляции и функционирования этих органов крыс, продуцирующих стероидные гормоны.

Как известно, класс ЛПВП представлен двумя основными подклассами: ЛПВП₂ с плотностью 1,063–1,125 г/мл и ЛПВП₃ с плотностью 1,125–1,21 г/мл [17]. Однако какой из этих подклассов ЛПВП является предпочтительным источником холестерина для стероидогенеза в надпочечниках, предстояло выяснить. Результаты влияния различных подклассов ЛПВП, насыщенных немеченым ОХ, на продукцию кортикостерона надпочечниками крыс представлены на рис. 2, из которого следует, что различия между ними обозначились уже в контроле: концентрация гормона в среде инкубации при добавлении ОХ в составе ЛПВП₃ на 71 % превышала результат влияния фракции ОХ-ЛПВП₂. Обнаруженные различия еще более проявились при стимуляции стероидогенеза с помощью адренкортикотропного гормо-

на (АКТГ). Результаты могут свидетельствовать в пользу того, что эфиры холестерина из третьей подфракции ЛПВП являются более предпочтительным субстратом для синтеза стероидов в коре надпочечников крыс.

Таким образом, в настоящей работе рассмотрены транспортные функции основных классов ЛП, связанные с обменом входящих в их состав эфиров холестерина. В опытах *in vivo* с внутривенным введением крысам комплексов ЛП различных классов плотности с ¹⁴C-ОХ показана избирательность поглощения метки различными органами и тканями в зависимости от класса используемого ЛП переносчика (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП). Так, самое выраженное поглощение метки печенью отмечено после введения ¹⁴C-ОХ, ассоциированного с ЛПОНП. Значительно меньшее поглощение меченого холестерина наблюдали в надпочечниках, семенниках и в сердечной мышце. В других тканях радиоактивность постепенно уменьшалась в ряду: селезенка > легкие > почки > щитовидная железа и жировая ткань. Введение ¹⁴C-ОХ в составе ЛПНП приводило к преимущественному накоплению метки в надпочечниках и семенниках. Однако самое выраженное поглощение ¹⁴C-ОХ стероидпродуцирующими органами отмечено после введения ¹⁴C-ОХ, ассоциированного с ЛПВП. Отмечены существенные различия в динамике поглощения ¹⁴C-ОХ в составе ЛПВП надпочечниками и семенниками крыс в зависимости от интервала времени после введения. Радиоактивность надпочечников уже через 30 мин практически достигала максимума. Поглощение ¹⁴C-ОХ семенниками характеризовалось постепенным увеличением радиоактивности с максимумом на 6 ч и достаточно резким снижением к 12 ч от начала введения. В опытах *in vitro* показаны различия влияния ЛПВП₂ и ЛПВП₃, насыщенных немеченым ОХ, на продукцию кортикостерона надпочечниками крыс. Полученные результаты позволяют считать, что подфракция ЛПВП₃ может являться более предпочтительным источником холестерина для синтеза стероидов в коре надпочечников крыс по сравнению с подфракцией ЛПВП₂.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панин Л.Е., Поляков Л.М. Изучение взаимоотношений между глюкокортикоидной функцией коры надпочечников и липопротеидами сыворотки крови. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1976; 82 (10): 1202–1204.
- Panin L.E., Polyakov L.M. Study of the relationship between the glucocorticoid function of the adrenal cortex and serum lipoproteins. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1976; 82 (10): 1202–1204. [In Russian].

2. Панин Л.Е., Поляков Л.М. Механизм регуляции стероидогенеза в надпочечниках липопротеидами сыворотки крови. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1979; 88 (9): 267–269.
- Panin L.E., Polyakov L.M. The mechanism of regulation of steroidogenesis in the adrenal glands of serum lipoproteins. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1979; 88 (9): 267–269. [In Russian].
3. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996; 271 (5248): 518–520.
4. Acton S.L., Scherer P.E., Lodish H.F., Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (33): 21003–21009.
5. 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.
6. 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.
7. Brown M.S., Goldstein J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986; 232 (4746): 34–47.
8. Carr B.R., Porter J.C., MacDonald P.C., Simpson E.R. Metabolism of low density lipoprotein by human fetal adrenal tissue. *Endocrinology*. 1980; 107 (4): 1034–1040.
9. Connelly M.A. SR-BI-mediated HDL cholesteryl ester delivery in the adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009; 300 (1-2): 83–88.
10. Connelly M.A., Williams D.L. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003; 14 (10): 467–472.
11. Hatch F.T. Practical method for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.* 1968; (6): 2–68.
12. Leiva A., Verdejo H., Benítez M.L., Martínez A., Busso D., Rigotti A. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis*. 2011; 217 (2): 299–307.
13. Lyu J., Imachi H., Fukunaga K., Yoshimoto T., Zhang H., Murao K. Roles of lipoprotein receptors in the entry of hepatitis C virus. *World J. Hepatol.* 2015; 7 (24): 2535–2542.
14. Reaven E., Chen Y.D., Spicher M., Hwang S.F., Mondon C.E., Azhar S. Uptake of low density lipoproteins by rat tissues. Special emphasis on the luteinized ovary. *J. Clin. Invest.* 1986; 77 (6): 1971–1984.
15. Rinninger F., Deichen J.T., Jackle S., Windler E., Greten H. Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters and high-density lipoprotein particle uptake by human monocytemacrophages. *Atherosclerosis*. 1994; 105 (2): 145–157.
16. Russell D.W. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J. Lipid Res.* 2009; 50: 120–125.
17. Rye K.A., Barter P.J. Predictive value of different HDL particles for the protection against or risk of coronary heart disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2012; 1821 (3): 473–480.
18. Schorsch F., Malle E., Sattler W. Selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by differentiated Ob1771 adipocytes is modulated by endogenous and exogenous lipoprotein lipase. *FEBS Lett.* 1997; 414 (3): 507–513.
19. Shen W.-J., Asthana S., Fredric B., Kraemer F.B., Azhar S. Scavenger receptor B type 1: expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *J. Lipid Res.* 2018; 59: 1114–1131.
- Williams D.L., Temel R.E., Connelly M.A. Roles of scavenger receptor BI and APO A-I in selective uptake of HDL cholesterol by adrenal cells. *Endocr. Res.* 2000; 26 (4): 639–651.

Сведения об авторах:

Поляков Л.М., д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: plm@niibch.ru
Князев Р.А., к.б.н., ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru
Рябченко А.В., к.б.н., ORCID: 0000-0002-1658-4982, e-mail: borrelia@mail.ru
Котова М.В., ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru
Трифоновна Н.В., e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru

Information about authors:

Polyakov L.M., doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-5905-8969, e-mail: plm@niibch.ru
Knjazev R.A., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2678-8783, e-mail: Knjazev_roman@mail.ru
Ryabchenko A.V., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1658-4982, e-mail: borrelia@mail.ru
Kotova M.V., ORCID: 0000-0001-6276-9630, e-mail: zerokiri@mail.ru
Trifonova N.V., e-mail: nataliya-tverdohleb@yandex.ru

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХИМЕРНОЙ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

Мария Борисовна ПЫХТИНА^{1,2}, Владимир Павлович РОМАНОВ¹,
Светлана Михайловна МИРОШНИЧЕНКО^{1,2}, Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ¹

¹ НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² НИИ лимфологии ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Цель исследования – получение и изучение биологических свойств рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (G-CSF), «сшитого» посредством пептидного линкера с аполипопротеином А-I (apoA-I), для разработки в перспективе на его основе цитокина пролонгированного действия. **Материал и методы.** Нуклеотидные последовательности генов *G-CSF* и *apoA-I* были оптимизированы для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Сборку гена, кодирующего химерный цитокин G-CSF-apoA-I, его клонирование в составе вектора pPICZα-A и экспрессию в клетках *P. pastoris* выполняли с использованием стандартных генно-инженерных методов. Полученный цитокин очищали методом двухступенчатой ионообменной хроматографии. Биологическую активность химеры определяли *in vitro* на клетках костного мозга (ККМ) крысы и человека с применением методов проточной цитометрии, анализа клеточного цикла и миелограмм. **Результаты.** Сконструирован рекомбинантный штамм дрожжей *P. pastoris* X-33, продуцирующий химерный цитокин, содержащий с N-конца аминокислотную последовательность G-CSF, а с C-конца – зрелого apoA-I человека. На ККМ крыс показано, что G-CSF-apoA-I в 1,8–2 раза менее эффективно увеличивает количество гранулоцитов, чем G-CSF. Вместе с тем химерный цитокин поддерживал жизнеспособность клеток моноцитарного и лимфоцитарного ряда и так же, как G-CSF, поддерживал пролиферацию и созревание клеток гранулоцитарного ряда. В отличие от G-CSF, химера повышала количество бластных клеток и нормализовала сегментацию нейтрофилов, в 1,5 раза эффективнее снижая количество аномалий. **Заключение.** Сконструирован новый химерный цитокин G-CSF-apoA-I, проявляющий свойства не только колониестимулирующего, но и ростового фактора, поддерживающего жизнеспособность других типов ККМ.

Ключевые слова: G-CSF человека, apoA-I, клонирование, химерный ген, *Pichia pastoris* X-33, ионообменная хроматография, клетки костного мозга, проточная цитометрия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Пыхтина М.Б., e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

Для цитирования: Пыхтина М.Б., Романов В.П., Мирошниченко С.М., Беклемишев А.Б. Получение и анализ биологических свойств химерной формы рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 37–45. doi: 10.15372/SSMJ20190605

PRODUCTION AND ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR CHIMERIC FORM

Mariya Borisovna PYKHTINA^{1,2}, Vladimir Pavlovich ROMANOV¹,
Svetlana Mikhaylovna MIROSHNICHENKO^{1,2}, Anatoliy Borisovich BEKLEMISHEV¹

¹ Research Institute for Biochemistry of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

² Research Institute for Lymphology of Federal Research Center «Institute of Cytology and Genetics SB RAS»
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

The aim of this work was to design and study biological properties of the recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), «linked» to apolipoprotein A-I (apoA-I) by a peptide linker, for obtaining in perspective a prolong form of the drug based on this cytokine. **Material and methods.** The nucleotide sequences of the genes encoding G-CSF and apoA-I were designed and optimized for expression in *Pichia pastoris* yeast using several computer programs. The assembly of the gene coding for the G-CSF-apoA-I chimeric cytokine, its cloning in the pPICZα-A vector, and expression in *P. pastoris* cells were performed using standard genetic engineering methods. Purification of the chimeric cytokine was carried out by two-stage ion-exchange chromatography. The biological activity of the chimera was determined *in vitro* on rat and human bone marrow cells (BMC) using flow cytometry, cell cycle analysis and myelograms. **Results.** A recombinant *P. pastoris* X-33 yeast strain producing a chimeric cytokine containing the amino acid sequence G-CSF from the N-terminus, and mature human apoA-I from the C-terminus was constructed. In experiments on BMC of rat, it was shown that G-CSF-apoA-I increases the number of granulocytes in 1.8–2 times less compared with G-CSF. At the same time, the chimeric cytokine maintained the viability of monocytic and lymphocytic cells. Unlike G-CSF, the chimera increased the number of blast cells and normalized neutrophil segmentation, reducing the number of anomalies 1.5 times more efficiently. **Conclusion.** A new chimeric cytokine G-CSF-apoA-I was constructed, exhibiting the properties of not only a colony-stimulating factor, but also a growth factor, supporting the viability of other types of BMC.

Key words: human G-CSF, apoA-I, cloning, chimeric gene, *Pichia pastoris* X-33, ion exchange chromatography, bone marrow cells, flow cytometry.

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

Correspondence author: Pykhtina M.B., e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

Citation: Pykhtina M.B., Romanov V.P., Mirosnichenko S.M., Beklemishev A.B. Production and analysis of the biological properties of the chimeric form of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 37–45. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190605

G-CSF является важным гемопоэтическим фактором, стимулирующим созревание, пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов. В клинике препараты рекомбинантного G-CSF используются для лечения нейтропении, вызванной химио- и радиотерапией, а также для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток периферической крови как при аутологичной, так и при аллогенной трансплантации [16]. Кроме того, последние исследования демонстрируют перспективность использования G-CSF в лечении болезнью Паркинсона [13] и Альцгеймера [14], для терапии последствий инсультов и инфарктов [12].

Одной из важных проблем применения в терапии рекомбинантных цитокинов, в том числе G-CSF, является их короткое время полужизни в организме [11], в связи с чем возникает необходимость проведения многократных инъекций для поддержания их эффективных концентраций. Это, в свою очередь, усугубляет побочные эффекты, вызываемые токсическим действием цитокинов. В связи с этим разработка цитокин-содержащих препаратов пролонгированного действия является актуальной задачей медицинской биотехнологии. Одной из стратегий увеличения времени полужизни цитокина в организме является ковалентное присоединение к нему полиэтиленгликоля [15]. Однако длительный период деградации и индукция иммунных реакций на

пэгилированный цитокин являются существенными недостатками их использования [7]. Другой подход основан на создании рекомбинантных химерных белков, содержащих цитокин, слитый с длительно циркулирующим белком крови: альбумином [8], фрагментом IgG [5] или трансферрином [3]. В последнее время в качестве средств доставки различного рода соединений широко исследуются липопротеины плазмы крови и их белковые компоненты аполипопротеины [9, 10]. В частности, аполипопротеин А-I (apoA-I) обладает рядом ценных свойств белка-транспортёра, а именно: амфифильный, неиммуногенный, длительное время циркулирует в организме, легко подвергается биодegradации, специфически связывается с большинством типов клеток за счет наличия у них рецепторов SR-BI [2].

Целью настоящей работы было получение рекомбинантного G-CSF человека, «сшитого» пептидным линкером с apoA-I, и изучение его биологических свойств. В качестве системы экспрессии были выбраны дрожжи *P. pastoris*, обладающие в сравнении с прокариотами рядом преимуществ при продукции терапевтических белков, а именно: сходные с человеком посттрансляционные модификации белков, отсутствие экзо- и эндотоксинов, высокий выход рекомбинантных белков и их секреция в культуральную среду, что, в свою очередь, существенно облегчает их очистку [4].

Таким образом, мы ожидаем, что химерный цитокин G-CSF-ароА-I будет обладать свойственной G-CSF активностью, но существенно большей стабильностью, как за счет его гликозилирования, так и благодаря наличию в составе химеры ароА-I.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основные реактивы для молекулярно-биологических исследований приобретены в фирме «Sigma-Aldrich» (США), ферменты – в фирме «Thermo Fisher Scientific» (США), материалы для культуральных работ – в фирме «Биолот» (Россия); соли, кислоты и щелочи – квалификации «ХЧ» или «ОСЧ» производства «Реахим» (Россия).

Штаммы микроорганизмов: бактерии *Escherichia coli* шт. BL 21 (DE3) («Novagen», США) и шт. TOP10 («Invitrogen», США), дрожжи *Pichia pastoris* шт. X-33 («Invitrogen», США).

Плазмидные ДНК: рPICZ-alpha-A фирмы «Invitrogen» (США).

Конструирование синтетического гена, кодирующего зрелый G-CSF человека. Нуклеотидную последовательность гена зрелого G-CSF спроектировали и оптимизировали для экспрессии в дрожжах *P. pastoris* с использованием компьютерной программы «Gene designer» («ATUM», США), пакета программного обеспечения VisualGeneDeveloper (<http://www.visualgenedeveloper.net/Download.html>) и Invitrogen GeneOptimizer™. Оптимизированный ген G-CSF был синтезирован фирмой «GenScript» (США). Синтетический ген G-CSF содержал в 5'-концевой области сайт рестрикции для XhoI и нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт протеолиза Kex2 и 2 сайта протеолиза Ste13; в 3'-концевой области гена был локализован сайт рестрикции для KpnI, стоп-кодон и сайты рестрикции для EcoRI и SalI.

Конструирование рекомбинантной плазмиды рPICZα-A/G-CSF-ароА-I. В качестве исходного вектора использовали сконструированную нами ранее плазмиду рPICZα-A/IFN-α2b-ароА-I. Плаزمида содержала последовательность гена интерферона α 2b человека (*IFN-α2b*) в 5'-концевой области, фланкированную сайтами рестрикции XhoI и KpnI и состыкованную с последовательностями линкера и зрелого ароА-I человека в 3'-концевой области. Ген *IFN-α2b* был удален из плазмиды рPICZα-A/IFN-α2b-ароА-I с помощью гидролиза рестриктазами XhoI и KpnI и замещен на вышеописанный синтетический ген G-CSF, встроенный по этим же сайтам рестрик-

ции с помощью ДНК-лигазы фага T4 с образованием рекомбинантной плазмиды рPICZα-A/G-CSF-ароА-I.

Трансформация электрокомпетентных клеток *E. coli* Top10 и скрининг трансформантов. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки Top10, которые затем высевали на агаризованную среду ЛБ на чашки Петри, содержащие 50 мкг/мл зеоцина. Выросшие клоны анализировали на наличие рекомбинантной плазмиды методом ПЦР колоний. ПЦР осуществляли с использованием ДНК-амплификатора («БИС», Россия) в присутствии прямого и обратного праймеров, специфичных для фланкирующих химерный ген G-CSF-ароА-I областей вектора рPICZα. Структура прямого праймера – 5'-ТАСТАТТGCCAGCATТGCTGC-3'; обратного – 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'. Размер ампликонов определяли электрофорезом в 0,8%-м агарозном геле. Один из ПЦР-положительных клонов использовали для препаративной работы плазмиды рPICZα-A/G-CSF-ароА-I.

Получение штамма *P. pastoris* – продуцента химерного белка G-CSF-ароА-I. Трансформацию компетентных клеток дрожжей *P. pastoris* шт. X-33 проводили плазмидой рPICZα-A/G-CSF-ароА-I, предварительно гидролизованной рестриктазой BstXI. Трансформированные клоны отбирали на селективной агаризованной среде YPD, содержащей 500 и 2000 мкг/мл зеоцина, колонии выращивали в течение двух суток на орбитальном шейкере при 300 об/мин в среде BMGY, после чего вносили метанол до 0,5 %. По окончании индукции клетки осаждали центрифугированием (3500g, 20 мин, +4 °C). Белки из супернатантов осаждали 10%-й трихлоруксусной кислотой. Осадки промывали ацетоном и анализировали электрофорезом в 12,5%-м полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН-ПААГ) (рис. 1). Клон, продуцирующий наибольшее количество целевого химерного полипептида, отбирали для дальнейшей работы.

Получение химерного цитокина G-CSF-ароА-I. Клон, продуцирующий химеру G-CSF-ароА-I, выращивали в 50 мл среды BMGY в течение двух суток на орбитальном шейкере при 250 об/мин, после чего вносили метанол до 0,5 %. Перед индукцией в колбы вносили 0,2 % (w/v) Твин 20. На 4-е сутки после индукции клетки осаждали центрифугированием, а в супернатант вносили сульфат аммония до концентрации 50 % от насыщения. Преципитаты белка осаждали центрифугированием (14 000 об/мин, 20 мин, +20 °C). Осадок, содержащий главным образом химеру G-CSF-ароА-I, растворяли в буфере

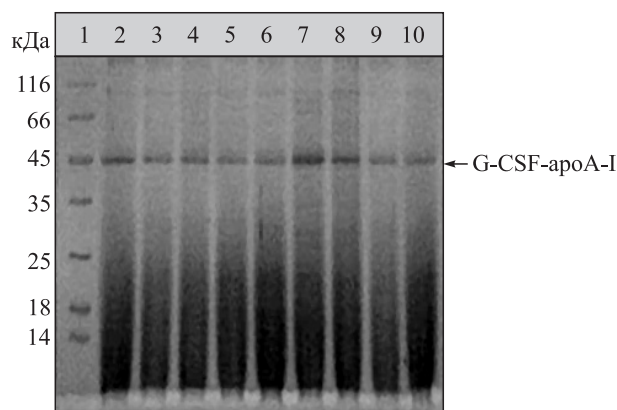


Рис. 1. Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральных жидкостях клонов *P. pastoris*, анализируемых на продукцию рекомбинантной химеры G-CSF-apoA-I после 6 суток культивирования в среде BMGY на орбитальном шейкере в 96-глубоколуночной планшете. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс белков Fermentas (14–116 кДа); 2–10 – белки в культуральных жидкостях анализируемых клонов после внесения индуктора

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of proteins from culture medium of *P. pastoris* clones expressing G-CSF-apoA-I in 96-Deep Square well plate in the BMGY medium for 6 days of fermentation in an orbital shaker. The clones were induced by 0.5 % (v/v) methanol for 96 h at 28 °C. Lane 1 – standard protein molecular weight marker Fermentas (14–116 kDa); lanes 2–10: proteins in the culture fluids of the analyzed induced clones

№ 1 (25 mM ацетат натрия, 1 mM ЭДТА и 0,02 % Твин 20, pH 4.5) и диализовали в ночь против данного буфера.

Выделение и очистка химерного цитокина G-CSF-apoA-I. Очистку G-CSF-apoA-I проводили с помощью двухэтапной ионообменной хроматографии. Диализованный раствор химерного цитокина фракционировали на колонке с DEAE-Sepharose FF против буфера № 1. Несвязавшуюся со смолой фракцию диализовали против буфера № 2 (10 mM натрий-фосфатный буфер, pH 7,6, 1 mM ЭДТА и 0,02 % Твин 20). Диализованный раствор наносили на колонку с DEAE-Sepharose FF, уравновешенную буфером № 2. Колонку промывали буфером № 2, белок элюировали градиентом NaCl (0–0,3 M) в этом же буфере. Наиболее чистые фракции, содержащие химеру G-CSF-apoA-I, объединяли (рис. 2). Концентрацию G-CSF-apoA-I измеряли спектрофотометрически в УФ-поглощении при длине волны 280 нм с учетом молярного коэффициента экстинкции $47\ 540\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (ЦКП «Современные оптические системы», ФИЦ ФТМ), а также денситоме-

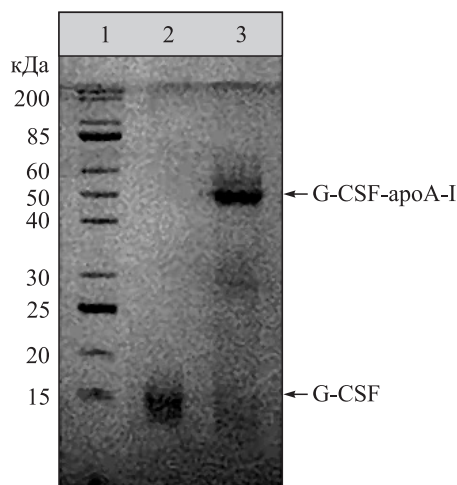


Рис. 2. Электрофореграмма очищенного рекомбинантного химерного цитокина G-CSF-apoA-I. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс белков (Sib Enzyme) (10–200 кДа); 2 – рекомбинантный G-CSF (получен ранее); 3 – очищенный рекомбинантный G-CSF-apoA-I

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of purified recombinant chimeric G-CSF-apoA-I cytokine. Lane 1 – standard protein molecular weight marker (Sib Enzyme) (10–200 kDa); 2 – previously obtained recombinant G-CSF; 3 – purified recombinant G-CSF-apoA-I

трически с использованием программы Gel-Pro Analyzer.

Анализ биологической активности химерного цитокина G-CSF-apoA-I. Самцы линии Wistar (200–250 г, $n = 4$) были получены из вивария ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН». Все процедуры проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и рекомендациями по правильному обращению и уходу за лабораторными животными (European Communities Council Directive 86/609/CEE), протокол одобрен Комитетом по этике НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 14 от 18.06.2019).

Выделение и культивирование клеток костного мозга (ККМ). Костный мозг крыс выделяли в стерильных условиях из большеберцовой кости и бедренных костей по стандартному протоколу [1]. Клеточную суспензию доводили до концентрации 2×10^6 средой для культивирования клеток (RPMI, 10 % фетальной бычьей сыворотки) и по 0,5 мл переносили в 24-луночный планшет. ККМ культивировали в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в течение 24 и 48 ч в присутствии G-CSF-apoA-I (50 нг/мл). В качестве положительного контроля использовали полученный ранее G-CSF в той же концентрации, в качестве исходного контроля – пробы, не содержащие до-

бавок. Все исследования выполнены в трех повторях. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего.

ККМ человека получали с добровольного согласия в клинике НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины. Донором костного мозга был пациент, имеющий сниженное количество клеток гранулоцитарного ряда, с задержкой созревания и аномалиями сегментации – повышенным процентом гипосегментированных нейтрофилов.

ККМ крыс анализировали методом проточной цитометрии («CYTOFLEX S-100», «Beckman Coulter», США). Гейты выставляли согласно размеру и гранулярности клеточных типов (FSC/SSC). Образцы для определения фаз клеточного цикла фиксировали и окрашивали раствором йодида пропидия. Окрашивание ККМ проводили методом Май – Грюнвальда – Гимза. Мазки исследовали под микроскопом «Axio Scope A1» («Zeiss AG», Германия) и подсчитывали 500 клеток на мазок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате встройки по сайтам XhoI и KpnI синтетического гена *G-CSF* в плазмиду pPICZα-A/IFN-α2b-ароА-I, из которой с помощью гидролиза рестриктазами предварительно был удален ген *IFN-α2b*, получена рекомбинантная плаزمида pPICZα-A/G-CSF-ароА-I (рис. 3), которой трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* Top10. Один из клонов, содержащих, по данным ПЦР-анализа, плазмиду pPICZα-A/G-CSF-ароА-I, был отобран для замузеивания и дальнейшей наработки плазмиды в препаративных количествах. Плазмиды pPICZα-A/G-CSF-ароА-I была линейаризована по сайту BstXI и использована для трансформации клеток *P. pastoris* X-33. На 3-й день после трансформации на агаризованной чашке с 2000 мкг/мл зеоцина выросло около 20 колоний. Все клоны были проанализированы на способность продуцировать и синтезировать целевой G-CSF-ароА-I культивированием в 96-глубоколуночном планшете в среде BMGY в шейкере (300 об/мин, 96 ч,

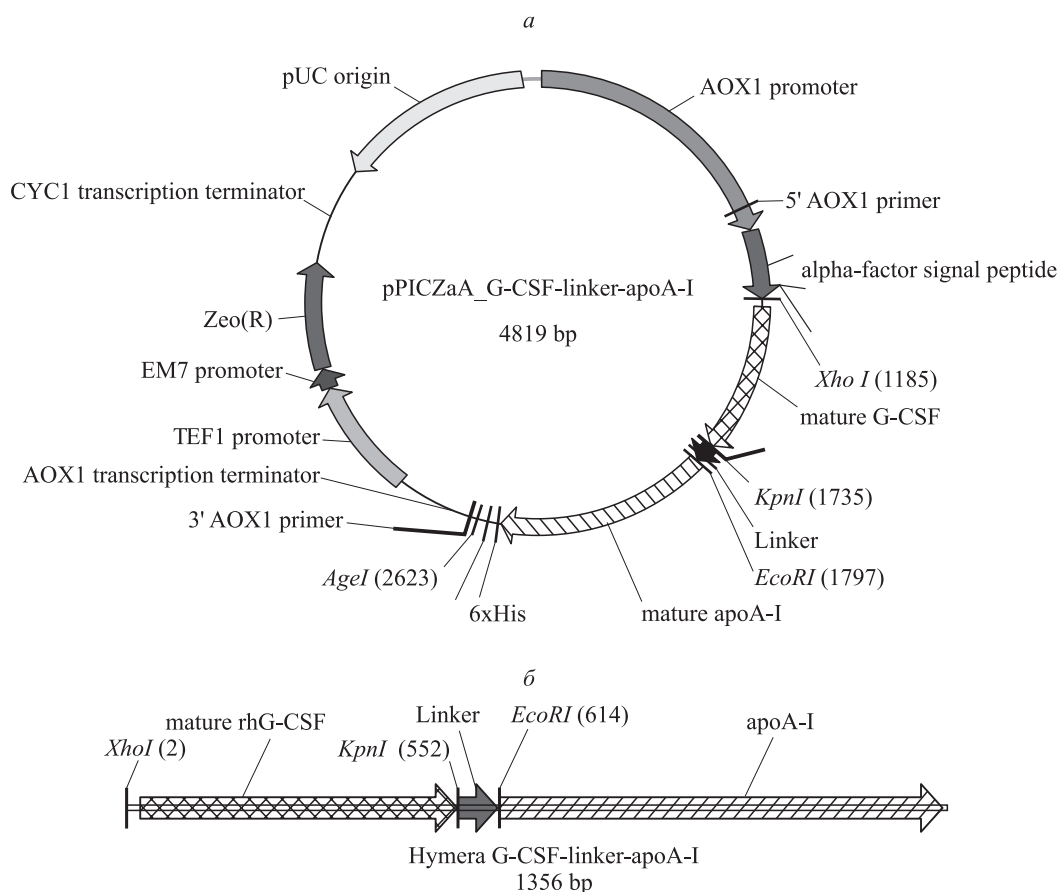


Рис. 3. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/G-CSF-ароА-I (а) и схема химерного белка G-CSF-ароА-I (б)

Fig. 3. Genetic map of pPICZα-A/G-CSF-ароА-I recombinant plasmid (a) and G-CSF-ароА-I chimeric protein scheme (b)

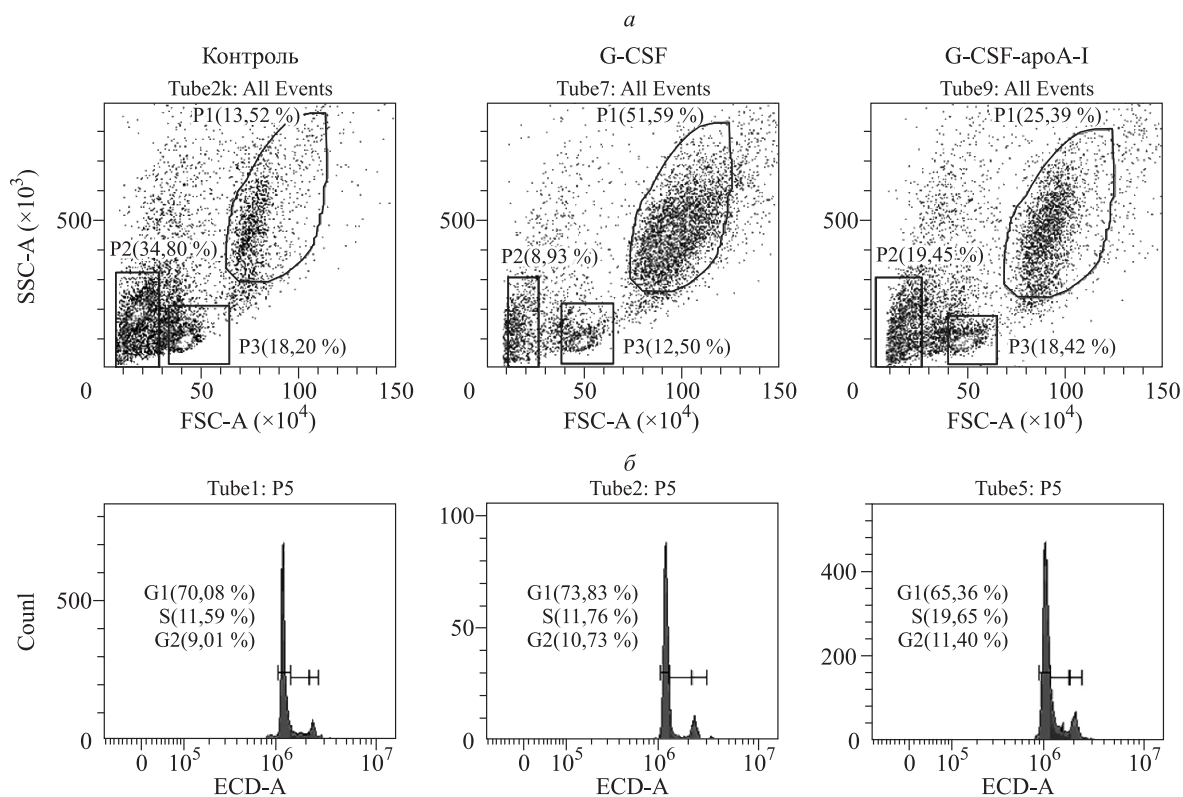


Рис. 4. Анализ клеток ККМ крыс методом проточной цитометрии (а): P1 – гейт гранулоцитарных клеток, P2 – гейт лимфоцитов, апоптотных, мелких клеток, P3 – гейт моноцитарных и бластных лимфоцитарных клеток; распределение ККМ по фазам клеточного цикла (б)

Рис. 4. Analysis of rat BMC by flow cytometry (a): P1 – gate of granulocyte cells, P2 – gate of lymphocytes, apoptotic and small cells, P3 – gate of monocytic and blast lymphocyte cells; distribution of BMC on the phases of the cell cycle (b)

+28 °C): показано, что все анализируемые клоны приблизительно с равной эффективностью синтезировали G-CSF-aroA-I, однако уровень синтеза в них химеры был невысоким (см. рис. 1).

Наиболее продуктивный клон использовали для препаративной наработки химерного цитокина, как описано в «Методах». На всех этапах культивирования отбирали аликвоты культуральной жидкости для определения наличия в них рекомбинантного химерного цитокина с помощью гель-электрофореза в 12,5 % ДСН-ПААГ. Суммарный выход белка по завершении культивирования был незначителен и составил 5–7 мг с 1 л культуры. Чистота конечного препарата составила около 90 % (см. рис. 2). Трудности, связанные с наработкой и очисткой химерного белка, могут быть обусловлены частичным лизисом клеток-продуцентов на этапе индукции метанолом и, как следствие, высвобождением в культуральную жидкость внутриклеточных дрожжевых белков. Кроме того, при культивировании во время фазы индукции в культуральную жидкость секретирется пигмент *P. pastoris*, который прочно связыва-

ется с колонкой на этапе хроматографии и элюируется вместе с целевым белком. Все это влияет на конечный выход целевого белка и на степень его очистки.

Специфическую биологическую активность химеры G-CSF-aroA-I исследовали на ККМ крыс и человека в сравнении с полученным ранее рекомбинантным G-CSF. Костный мозг представляет собой прямую мишень действия ростовых факторов, вызывающих пролиферацию и дифференцировку клеток, и поэтому служит идеальной моделью для их изучения. Поскольку G-CSF человека не является строго видоспецифичным ростовым фактором, первоначальное исследование полученного химерного цитокина было проведено на ККМ крыс. Методом проточной цитометрии было показано, что как G-CSF, так и его химерная форма стимулируют созревание и пролиферацию клеток гранулоцитарного ростка. Однако количество гранулоцитарных клеток под влиянием G-CSF-aroA-I было в 1,8–2 раза меньше, чем в случае с G-CSF (рис. 4, а). В отличие от G-CSF, химера G-CSF-aroA-I поддерживала жиз-

Таблица. Процентное содержание клеток гранулоцитарного ростка костного мозга человека при стимуляции G-CSF-ароА-I в сравнении с контролем и G-CSF в течение 24 и 48 ч инкубации

Table. Distribution of granulocyte germ of human BMC treated with G-CSF-ароА-I compared to control and G-CSF during 24 and 48 hours of incubation

| Содержание клеток на разных стадиях созревания, % | 24 ч инкубации | | | 48 ч инкубации | | |
|---|----------------|-------|--------------|----------------|-------|--------------|
| | Контроль | G-CSF | G-CSF-ароА-I | Контроль | G-CSF | G-CSF-ароА-I |
| Бласты/промиелобласты | 8,9 | 3,2 | 3,2 | 3,4 | 3,5 | 4,7 |
| Миелоциты | 16,1 | 10,2 | 8,4 | 13,2 | 8,8 | 13,5 |
| Метамиелоциты | 13,4 | 8,0 | 7,3 | 11,1 | 6,6 | 9,8 |
| Палочкоядерные нейтрофилы | 11,0 | 5,6 | 11,6 | 19,1 | 7,6 | 6,6 |
| Сегментоядерные нейтрофилы | 21,3 | 56,8 | 58,1 | 26,2 | 57,1 | 53,8 |
| Аномалии сегментации | 26,0 | 16,4 | 10,8 | 27,3 | 15,7 | 11,1 |
| Количество гранулоцитов, % от всех ККМ | 27,0 | 41,1 | 36,0 | 20,0 | 35,1 | 34,0 |

неспособность клеток моноцитарного и лимфоцитарного ряда. Анализ клеточного цикла ККМ показал, что в присутствии G-CSF-ароА-I процентное содержание клеток, находящихся в стадиях S- и G₂M-фазах, было выше, чем в контроле и в присутствии G-CSF (рис. 4, б), свидетельствуя о том, что химера поддерживает жизнеспособность бластных клеток. Обнаруженные отличия двух форм G-CSF, возможно, были обусловлены изменением пространственной структуры G-CSF или непосредственным влиянием ароА-I в составе химеры на ККМ.

Анализ окрашенных мазков костного мозга человека показал, что в контроле через 24 ч инкубации гранулоцитарный росток составлял ~ 27 % от всех клеток, количество зрелых нейтрофилов ~ 21 %, при этом наблюдалась их гипосегментация (более 50 % от зрелых нейтрофилов). При инкубации ККМ с G-CSF общее количество клеток гранулоцитарного ряда возрастало в 1,5 раза, при этом в 1,6 раза снижалось количество аномальных гипосегментированных нейтрофилов. G-CSF-ароА-I также стимулировал пролиферацию и созревание клеток гранулоцитарного ряда, но менее эффективно, чем G-CSF. Количество аномальных нейтрофилов при инкубации с G-CSF-ароА-I уменьшалось более чем в 2 раза (таблица). Снижение процентного содержания клеток гранулоцитарного ряда при инкубации ККМ с G-CSF-ароА-I было обусловлено активацией пролиферации и поддержанием жизнеспособности клеток лимфоцитарного ростка, а также макрофагально-стромальных клеток. В клетках, стимулированных G-CSF, созревание через 48 ч смещалось в сторону палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, в то время как G-CSF-ароА-I поддерживал повышенное количество

бластных клеток, миелоцитов и метамиелоцитов на фоне незначительного снижения числа сегментоядерных нейтрофилов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что G-CSF-ароА-I проявляет свойства колониестимулирующего фактора, влияя на пролиферацию и нормальное созревание клеток гранулоцитарного ряда и снижая количество аномалий в 1,5 раза эффективнее, чем G-CSF. Полученная химера также проявляет свойства ростового фактора в отношении клеток других ростков костного мозга, поддерживая клеточное разнообразие через 48 ч инкубации.

Проявление у химерного белка G-CSF-ароА-I новых свойств по сравнению с G-CSF было для нас несколько неожиданным. Как предположено выше, эти изменения могли быть обусловлены вкладом молекулы ароА-I в составе химеры. Эти предположения подтверждают имеющиеся в литературе работы, связанные с получением гибридных конструкций цитокинов, слитых с ароА-I, в результате чего последние приобретали новые свойства. Так, J. Fioravanti et al. было показано, что рекомбинантный интерферон (ИНФ), слитый с ароА-I, проявлял более выраженную иммуностимулирующую активность, обладал сниженной гематотоксичностью и лучшими фармакокинетическими свойствами в сравнении с ИНФ [6]. Кроме того, эти же исследователи продемонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства и у ряда других цитокинов (anti-TGF-β, FGF15/19, IL-15), слитых с ароА-I. Несомненный интерес представляет дальнейшее изучение влияния G-CSF-ароА-I на другие ростки ККМ, а также исследование фармакокинетических свойств этого химерного белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. 272 с.
Goldberg E.D., Dygay A.M., Shakhov V.P. Methods of tissue culture in hematology. Tomsk, 1992. 272 p. [In Russian].
2. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996; 271 (5248): 518–520. doi: 10.1126/science.271.5248.518
3. Bai Y., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102 (20): 7292–7296. doi: 10.1073/pnas.0500062102
4. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev*. 2000; 24 (1); 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
5. Cox G.N., Smith D.J., Carlson S.J., Bendele A.M., Chlipala E.A., Doherty D.H. Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein. *Exp. Hematol*. 2004; 32 (5); 441–449. doi: 10.1016/j.exphem.2004.01.012
6. Fioravanti J., González I., Medina-Echeverez J., Larrea E., Ardaiz N., González Aseguiñolaza G., Prieto J., Berraondo P. Anchoring interferon alpha to apolipoprotein A-I reduces hematological toxicity while enhancing immunostimulatory properties. *Hepatology*. 2011; 53 (6): 1864–1873. doi: 10.1002/hep.24306
7. Garay R.P., El-Gewely R., Armstrong J.K., Garratty G., Rchette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2012; 9 (11): 1319–1323. doi: 10.1517/17425247.2012.720969
8. Halpern W., Riccobene T.A., Agostini H., Baker K., Stalow D., Gu M.L., Hirsch J., Mahoney A., Carrell J., Boyd E., Grzegorzewski K.J. Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (GCSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys. *Pharm. Res*. 2002; 19 (11): 1720–1729. doi: 10.1023/a:1020917732218
9. Kim S.I., Shin D., Choi T.H., Lee J.C., Cheon G.J., Kim K.Y., Park M., Kim M. Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol. Ther*. 2007; 15 (6): 1145–1152. doi: 10.1038/sj.mt.6300168
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. doi: 10.1021/acsnano.5b07522
11. Kuwabara T., Kobayashi S., Sugiyama Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Drug Metab. Rev*. 1996; 28 (4): 625–658. doi: 10.3109/03602539608994020
12. Lu C.Z., Xiao B.G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia. *Biochem. Soc. Trans*. 2006; 34 (6): 1327–1333. doi: 10.1042/BST0341327
13. Meuer K., Pitzer C., Teismann P., Krüger C., Göricke B., Laage R., Lingor P., Peters K., Schlachetzki J.C., Kobayashi K., Dietz G.P., Weber D., Ferger B., Schäbitz W.R., Bach A., Schulz J.B., Bähr M., Schneider A., Weishaupt J.H. Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2006; 97 (3): 675–686. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03727.x
14. Prakash A., Medhi B., Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- β induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2013; 110: 46–57. doi: 10.1016/j.pbb.2013.05.015
15. Puchkov I.A., Kononova N.V., Bobruskin A.I., Bairamashvili D.I., Mart'ianov V.A., Shuster A.M. Recombinant granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim): optimization of conjugation with polyethylene glycol. *Bioorg. Chem*. 2012; 38 (5): 545–554. doi: 10.1134/s1068162012050111
16. Viret F., Gonçalves A., Tarpin C., Chabannon C., Viens P. G-CSF en oncologie. *Bull. Cancer*. 2006; 93 (5): 463–471.
Viret F., Gonçalves A., Tarpin C., Chabannon C., Viens P. G-CSF in oncology. *Bull. Cancer*. 2006; 93 (5): 463–471. [In French].

Сведения об авторах:

Пыхтина М.Б., ORCID: 0000-0002-7808-9274, e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

Романов В.П., ORCID: 0000-0003-4059-3165

Мирошниченко С.М., ORCID: 0000-0002-6740-8241

Беклемишев А.Б., д.б.н., ORCID: 0000-0001-9732-1246, e-mail: beklem@niibch.ru

Information about authors:

Pykhtina M.B., ORCID: 0000-0002-7808-9274, e-mail: pykhtina_maria@mail.ru

Romanov V.P., ORCID: 0000-0003-4059-3165

Miroshnichenko S.M., ORCID: 0000-0002-6740-8241

Beklemishev A.B., doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0001-9732-1246, e-mail: beklem@niibch.ru

СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПРОГРЕССИВНЫХ ГЕМАТОКСИЛИНОВ ПРИ ОКРАШИВАНИИ ЭЛЕМЕНТОВ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ И ГЕПАТОЛИЕНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Лев Александрович БОГДАНОВ, Дарья Кирилловна ШИШКОВА,
Антон Геннадьевич КУТИХИН

*НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6*

Цель исследования – сравнить различные типы прогрессивных гематоксилинов и оптимизировать протоколы окрашивания гематоксилином и эозином для кровеносных сосудов, миокарда, печени и селезенки. **Материал и методы.** В качестве эталонных объектов исследования были выбраны сердце (желудочки), аорта (брюшной отдел), печень (правая доля) и селезенка (левая часть). После фиксации в 10%-м забуференном формалине производилась вырезка репрезентативных сегментов тканей с дальнейшим промыванием в проточной воде, обезвоживанием с использованием этанола возрастающей концентрации (70 %, 80 %, 95 %) и изопропанола, пропитыванием и заключением в парафин и серийной резкой (5 мкм) замороженных парафиновых блоков на микротоме. Далее проводилось окрашивание гематоксилинами Mayer, Gill или Carazzi в течение 2, 5 или 15 мин и 1%-м водно-спиртовым эозином в течение 2 мин (без использования дифференцирующего раствора), все остальные этапы протокола выполнялись стандартно. Результаты оценивались при помощи световой микроскопии тремя гистологами независимо друг от друга и в разное время. **Результаты.** Все три типа прогрессивных гематоксилинов имели свои особенности окрашивания. Гематоксалин Mayer позволял достичь наиболее интенсивной окраски ядер клеток, однако при 15-минутном окрашивании он в ряде случаев придавал цитоплазме и внеклеточному матриксу фиолетово-синеватый оттенок, затрудняющий надлежащее контрастирование ядер. Гематоксалин Gill, напротив, прокрашивал ядра слабее остальных и позволял достичь четкого сине-фиолетового оттенка лишь после 15 мин окрашивания. В свою очередь, гематоксалин Carazzi позволял добиться сбалансированного контрастирования ядер и цитоплазмы/внеклеточного матрикса, не меняя розовато-красный оттенок эозина, однако окрашивал ядра слабее, чем гематоксалин Mayer. Окрашивания всеми видами гематоксилинов всех изученных типов тканей в течение 2 мин было недостаточным для интенсивной окраски и качественного контрастирования ядер клеток. **Заключение.** Оптимальным способом окрашивания аорты гематоксилином в сочетании с 2-минутным окрашиванием эозином является использование гематоксилина Carazzi в течение 15 мин, для окрашивания печени рекомендуется применять гематоксалин Carazzi или Gill в течение 15 минут либо гематоксалин Mayer в течение 5 мин, окрашивание миокарда оптимально при использовании гематоксилина Carazzi или Gill в течение 15 мин, а для окрашивания селезенки следует использовать гематоксалин Carazzi в течение 5 мин.

Ключевые слова: гематоксалин, эозин, аорта, миокард, печень, селезенка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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: Богданов Л.А., e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Для цитирования: Богданов Л.А., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. Сравнение различных видов прогрессивных гематоксилинов при окрашивании элементов системы кровообращения и гепатолиенальной системы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 46–54. doi: 10.15372/SSMJ20190606

DIFFERENT PROGRESSIVE HEMATOXYLIN STAINS FOR HISTOLOGICAL EXAMINATION OF MYOCARDIUM, BLOOD VESSELS, LIVER AND SPLEEN

Lev Aleksandrovich Bogdanov, Dariya Kirillovna Shishkova, Anton Gennadievich Kutikhin

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

Aim of the study was to compare the distinct types of progressive hematoxylin stains and to optimize the protocols of hematoxylin and eosin staining of blood vessels, heart, liver and spleen. **Material and methods.** Heart (ventricles), abdominal aorta, liver (right lobe) and spleen (left part) of the Wistar rats were excised, fixed in 10% neutral phosphate buffered formalin for 24 h, washed in tap water for 2 h, dehydrated in ascending ethanol series (70 %, 80 %, and 95 %) and isopropanol, embedded into paraffin and then sectioned (5 μ m) using rotary microtome. Staining was performed using Mayer's, Gill's, or Carazzi's hematoxylin during 2, 5, or 15 minutes and 1 % alcoholic/aqueous eosin for 2 minutes without differentiative solution. Results were assessed by three independent histologists. **Results.** All examined progressive hematoxylin stains had their distinctive features. Mayer's hematoxylin demonstrated the most intensive nuclear staining; however, staining for 15 minutes could lead to the bluing of cytoplasm and extracellular matrix. In contrast, Gill's hematoxylin was characterized by less intensive nuclear staining and achieved clear blue-violet shade only after 15 minutes of staining. Carazzi's hematoxylin showed balanced coloration of nuclei and cytoplasm/extracellular matrix and did not change the red/pink shades of eosin, yet the intensity of nuclear staining was less as compared to Mayer's hematoxylin. Short-term (2 minutes) staining was insufficient to reach intensive nuclear staining. **Conclusion.** The optimal hematoxylin and eosin staining protocol is to use eosin for 2 minutes following staining by Carazzi's hematoxylin for 15 minutes (for aorta), Carazzi's or Gill's hematoxylin for 15 minutes or Mayer's hematoxylin for 5 minutes (for liver), Carazzi's or Gill's hematoxylin for 15 minutes (for heart), and Carazzi's hematoxylin for 5 minutes (for spleen).

Key words: hematoxylin, eosin, aorta, heart, liver, spleen.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Source of funding. This study was supported by the Complex Program of Basic Research of SB RAS within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 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».

Correspondence author: L.A. Bogdanov, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Citation: Bogdanov L.A., Shishkova D.K., Kutikhin A.G. Different progressive hematoxylin stains for histological examination of myocardium, blood vessels, liver and spleen. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 46–54. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190606

Наиболее распространенным видом окрашивания на протяжении всего времени развития гистологии является сочетанное окрашивание тканей основным красителем гематоксилином и кислым красителем эозином [4, 6, 7]. Кроме того, гематоксилин также используется для контрастирования ядер при сочетании с другими красителями [4, 8, 9]. Гематоксилин получают из сердцевины кампешевого дерева (семейство бобовые), произрастающего в Центральной и Южной Америке, Африке и Азии [4]. Сам по себе гематоксилин бесцветен, однако при окислении на воздухе в сочетании с протравой (как правило, алюминиевыми квасцами) он переходит в гематеин, имеющий красновато-коричневый цвет [4].

Все гематоксилины условно можно разделить на два типа: прогрессивные (постепенно окрашивающие ткань до определенного уровня) и регрессивные (преднамеренно переокрашивающие ткань с дальнейшим вымыванием излишнего окрашивания дифференцирующим раствором – как правило, 0,5%-м или 1%-м раствором соляной кислоты в 70%-м этаноле) [1–3, 10, 11]. Из регрессивных гематоксилинов наиболее широко применяется гематоксилин Harris, в то время как

из прогрессивных на российском рынке доступны гематоксилины Mayer, Gill и Carazzi. Время окрашивания гематоксилином, как правило, составляет от 5 до 15 мин, хотя некоторые источники указывают на возможность его уменьшения при использовании гематоксилина Carazzi [10].

Эозин (2,4,5,7-тетрабромфлуоресцеин) представляет собой синтетический краситель, окрашивающий цитоплазму и внеклеточные структуры ткани [1–3, 10, 11]. Выделяют спиртовой и водный растворы эозина, имеющие различный pH; достаточно часто применяется также их концентрированная смесь, доступная на российском рынке, которую в дальнейшем разбавляют бидистиллированной водой или 20–25%-м этанолом в зависимости от желаемого pH.

Результатом применения гематоксилина и эозина является окрашивание ядер в цвета от фиолетового до синего (отенок зависит от вида гематоксилина и длительности окрашивания), цитоплазмы и внеклеточного матрикса – в цвета от розового до красного (отенок зависит от pH эозина и также длительности окрашивания) [1–5, 7, 9–11]. Интенсивность окраски также может изменяться в зависимости от преобладания ба-

зофильных или ацидофильных структур в ткани [1–5, 7, 9–11]. Стоит отметить, что стандартные протоколы окрашивания гематоксилином и эозином предоставляются их производителями, однако они предназначены скорее для рутинной гистологической и патолого-анатомической работы, чем для научных публикаций, требующих окрашивания и микрофотографий максимального возможного качества. Данная проблема достаточно актуальна для практически всех видов тканей [4]; в последние годы предпринимаются попытки усовершенствовать протокол окрашивания гематоксилином и эозином для трехмерных тканей (без предварительной резки) [12], разработать алгоритмы для автоматизированного анализа воспалительных инфильтратов [13], а также оптимизировать окрашивание гематоксилином и эозином для цифрового анализа [14, 15]. Таким образом, проблема стандартизации получения высококачественных изображений при окрашивании гематоксилином и эозином представляется достаточно актуальной.

Ранее нами показано, что при сходном итоговом результате использование прогрессивных гематоксилинов позволяет добиться лучшего по сравнению с регрессивными гематоксилинами сохранения целостности ткани за счет отсутствия стадии дифференцировки кислотнo-спиртовым раствором и последующей отмывки в бидистиллированной воде, что также дает возможность сократить протокол окрашивания по времени. Цель данного исследования – сравнить различные типы прогрессивных гематоксилинов и оптимизировать протоколы окрашивания гематоксилином и эозином для кровеносных сосудов, миокарда, печени и селезенки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для эксперимента использовали биоптаты 6 самцов крыс линии Wistar (возраст 6 мес., масса тела 400–450 г): сердце (желудочки), аорта (брюшной отдел), печень (правая доля) и селезенка (левая часть). Крысы содержались в одной и той же устланной опилками полипропиленовой клетке при комнатной температуре, нормальной влажности воздуха и 12-часовом световом дне и имели неограниченный доступ к корму и воде. Мониторинг состояния животных проводился ежедневно. Из эксперимента крыс выводили, помещая в герметичную камеру с атмосферой, перенасыщенной углекислым газом. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 06235-ЛБ).

Органы фиксировали в 10%-м забуференном формалине («БиоВитрум», Россия) в течение 24 ч с одной сменой формалина через первые 4 ч. Далее вырезали необходимый сегмент образца, укладывали его в гистологические кассеты и промывали под проточной водой в течение 2 ч. Образцы затем обезживали в этаноле возрастающей концентрации (70 %, 80 %, 95 %) и 100%-м изопропанолем (1 ч на каждую смену), пропитывали (три смены по 1 ч) гранулированной парафиновой средой для гистологической проводки и заливки на основе высокоочищенного парафина и специально подобранных пластифицирующих добавок («Гистомикс Экстра», температура плавления 54–56 °С, «БиоВитрум») и далее заключали в другую гранулированную парафиновую среду для гистологической проводки и заливки на основе высокоочищенного парафина и специально подобранных пластифицирующих добавок («Мистер Вакс Экстра», температура плавления 56–58 °С, «БиоВитрум») на 1 ч при комнатной температуре. После этого образцы охлаждали при температуре +4 °С в течение ночи и далее при температуре –20 °С в течение суток для облегчения резки, которую производили на ротационном микротоме «Microm HM 325» США) равномерно по всей длине (аорта) или толщине (миокард, печень, селезенка) образца; толщина срезов составляла 5 мкм. Срезы расправляли на водяной бане при температуре +52 °С и переносили на предметные стекла с поли-L-лизинным покрытием («Thermo Fisher Scientific»). Было приготовлено три партии тканей (одна партия на крысу) по девять стекол (по три стекла на каждый вид гематоксилина, одно стекло на одно время окрашивания). На каждое стекло помещалось от 6 до 12 срезов в зависимости от размера органа (миокард – 6 срезов, печень и селезенка – по 10 срезов, аорта – 12 срезов). После сушки на нагревательной плитке при +50 °С образцы переносили в термостат для хранения при температуре +30 °С.

Для окрашивания использовали гематоксилины Carazzi, Mayer и Gill («БиоВитрум») и водно-спиртовой концентрированный эозин, разбавленный в 25%-м этиловом спирте («БиоВитрум»). Согласно информации производителя, состав гематоксилинов был следующим. Carazzi: алюмокалиевые квасцы – 1–6 %, гематоксалин – 0,1–0,3, калий йодноватистый – 0,01–0,03, глицерин – 30–32, тимол – 0,01–0,03, вода – 61–69 %; Mayer: алюмокалиевые квасцы – 1–6 %, гематоксалин – 0,1–0,3, калий йодноватистый – 0,01–0,03, глицерин – 14–16, тимол – 0,01–0,05, вода – 77–85 %; Gill: алюмокалиевые квасцы – 1–6 %, гематоксалин – 0,2–0,3, калий йодноватистый – 0,01–0,03, уксусная кислота – 2,0–3,0, этиленгликоль – 27,0–29,0, вода – 61–70 %.

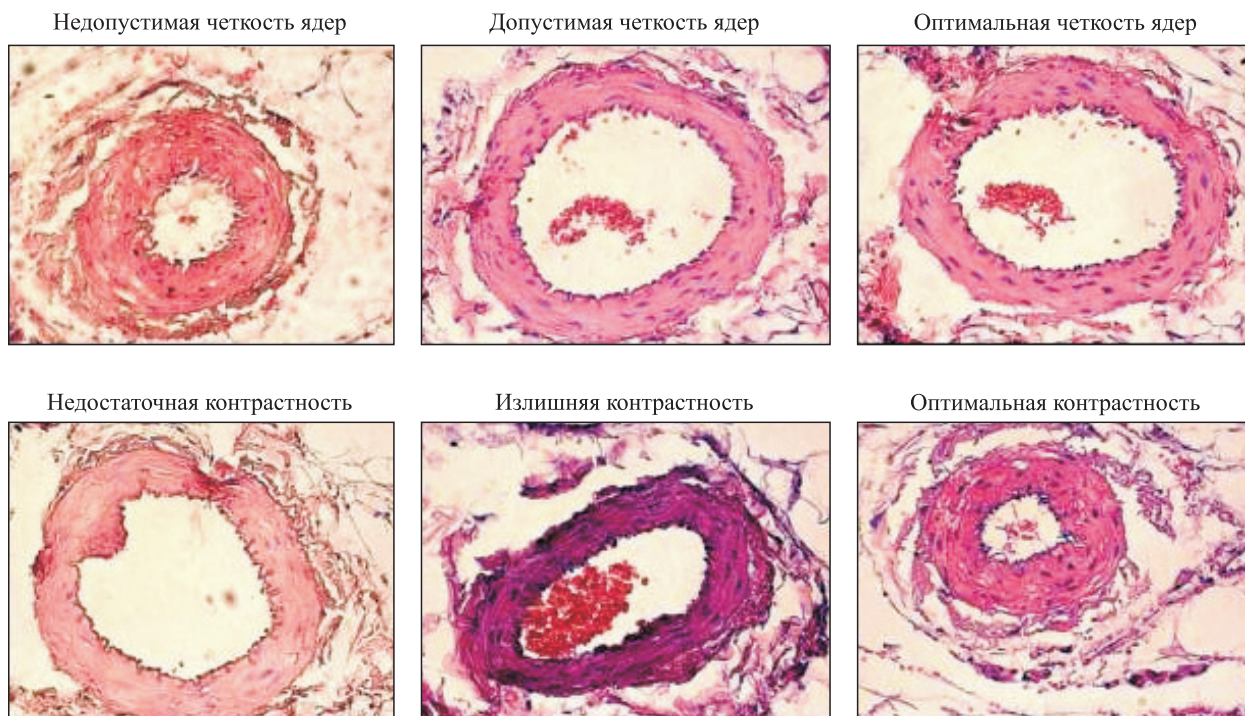


Рис. 1. Критерии контрастирования ядер клеток при окрашивании прогрессивными гематоксилинами (Mayer, Gill и Carazzi). Увеличение $\times 400$

Fig. 1. Criteria of nuclear counterstaining using progressive hematoxylin (Mayer, Gill, and Carazzi). Magnification $\times 400$

Окрашивание производили по следующему протоколу:

1. Депарафинизация в ксилоле, 3 раза по 5 мин.
2. Отмывка в 95%-м этаноле, 3 раза по 5 мин.
3. Быстрая промывка в бидистиллированной воде.
4. Окрашивание гематоксилинами Carazzi, Mayer или Gill (2, 5 или 15 мин).
5. Быстрая промывка в бидистиллированной воде.
6. Подсинение в водопроводной воде в течение 5 мин.
7. Быстрая промывка в бидистиллированной воде.
8. Окрашивание 1%-м водно-спиртовым эозином, 2 мин.
9. Быстрая промывка в бидистиллированной воде.
10. Обезвоживание в этаноле (70 %, 95 %, 95 %) по 10 с.
11. Просветление в ксилоле, 3 мин.
12. Заключение в монтирующую среду («Витрогель», «БиоВитрум») под покровное стекло («БиоВитрум»).

Готовые микропрепараты анализировали при помощи светового микроскопа «Axio Imager A1» («Carl Zeiss», Германия) и объектива «EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27» («Carl Zeiss») на увеличе-

нии $\times 200$. Результаты оценивали трое гистологов независимо друг от друга и в разное время. Критериями контрастирования ядер клеток являлись их различимость в сравнении с окружающей тканью и четкость (очерченность) контура. Оптимальным результатом окрашивания гематоксилином считалось сочетание очерченности и высокой контрастности ядер при отсутствии фонового окрашивания окружающей ткани. Примеры неоптимального, субоптимального и оптимального контрастирования ядер приведены на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Каждый из изученных видов тканей характеризовался различным паттерном окрашивания гематоксилином и эозином. Так, вследствие упорядоченного расположения гепатоцитов, кардиомиоцитов и сосудистых гладкомышечных клеток, особенностью печени, миокарда и аорты являлась необходимость максимальной степени окрашивания находящихся на определенном расстоянии друг от друга ядер клеток гематоксилином для надлежащего контрастирования с эозином. Селезенка, напротив, характеризовалась скоплениями большого количества ядер иммунных клеток с меньшей выраженностью цитоплазмы и внеклеточного матрикса в фолликулах и поэтому

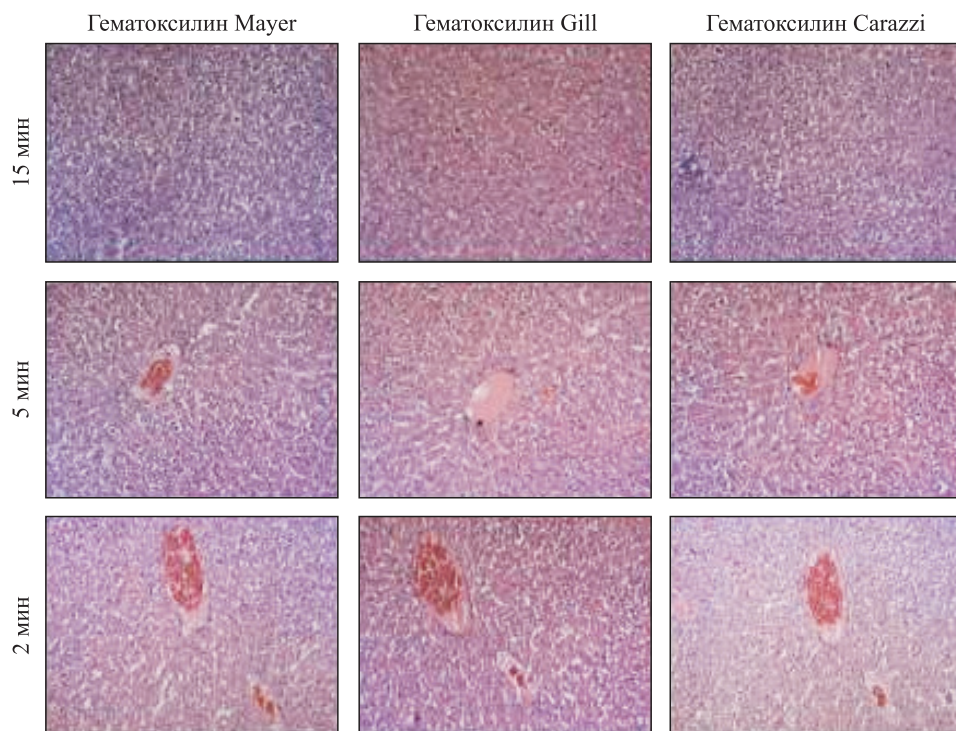


Рис. 2. Окрашивание печени крысы прогрессивными гематоксилинами (Mayer, Gill и Carazzi) в течение 5, 15 и 2 мин для общей оценки особенностей различных гематоксилинов. Увеличение $\times 200$

Fig. 2. Staining of the rat liver using progressive hematoxylin (Mayer, Gill, and Carazzi) during 2, 5, and 15 minutes for the comparison of their staining pattern. Magnification $\times 200$

требовала умеренного прокрашивания ядер для предотвращения эффекта их слияния.

Все три типа прогрессивных гематоксилинов имели определенные особенности. Гематоксилин Mayer более выраженно окрашивал ядра в сравнении с другими, однако также придавал цитоплазме и внеклеточному матриксу фиолетово-синеватый оттенок при окрашивании в течение 15 мин. Гематоксилин Gill, напротив, прокрашивал ядра слабее остальных и позволял достичь четкого сине-фиолетового оттенка лишь после 15 мин окрашивания. В свою очередь, гематоксилин Carazzi позволял добиться сбалансированного контрастирования ядер и цитоплазмы/внеклеточного матрикса, не меняя розовато-красный оттенок эозина, однако окрашивал ядра слабее, чем гематоксилин Mayer. Несмотря на определенные литературные предпосылки [9], окрашивания всеми видами гематоксилинов всех типов тканей в течение 2 мин было недостаточным для качественного контрастирования ядер клеток (рис. 2).

Максимальное контрастирование ядер клеток аорты достигалось при продолжительном окрашивании (15 мин), существенных различий при использовании различных прогрессивных гема-

токсилинов не выявлено. Стоит отметить, что, в отличие от паренхиматозных тканей, целостность аорты не зависит от применения прогрессивного или регрессивного гематоксилина; таким образом, любой из доступных на российском рынке гематоксилинов (Harris, Mayer, Gill, Carazzi) равнозначно подходит для окрашивания аорты. Для максимального исключения связанных с изменением оттенка эозина артефактов и ускорения протокола окрашивания авторы рекомендуют использовать гематоксилин Carazzi (15 мин) в сочетании с окрашиванием эозином в течение 2 мин (рис. 3).

В случае с окрашиванием печени максимальное контрастирование ядер достигалось при применении гематоксилинов Carazzi и Gill в течение 15 мин, а гематоксилина Mayer – в течение 5 мин. Окрашивание гематоксилином Mayer в течение 15 мин приводило к потере контрастирования ядер за счет придания цитоплазме и внеклеточному матриксу гематоксилинового оттенка. Окрашивание же гематоксилинами Carazzi и Gill в течение 5 мин сопровождалось некоторой потерей контрастирования ядер за счет недостаточного их прокрашивания; данная проблема была более

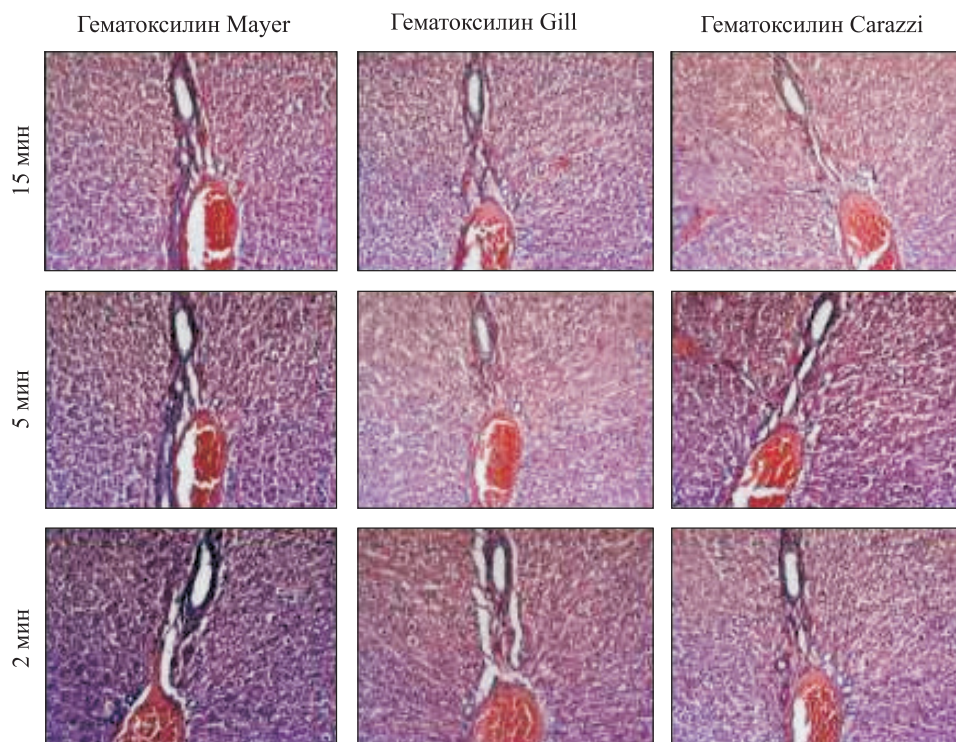


Рис. 3. Сравнительное окрашивание печени крысы прогрессивными гематоксилинами (Mayer, Gill и Carazzi) в течение 2, 5 и 15 мин для оптимизации протокола окрашивания. Увеличение $\times 200$

Fig. 3. Staining of the rat liver using progressive hematoxylin (Mayer, Gill, and Carazzi) during 2, 5, and 15 minutes for the optimisation of the staining protocol. Magnification $\times 200$

характерна для гематоксилина Gill. Регрессивное применение гематоксилина может отрицательно влиять на целостность печени за счет воздействия дифференцирующего раствора. Таким образом, для окрашивания печени оптимальным является воздействие гематоксилином Carazzi или Gill в течение 15 мин либо гематоксилином Mayer в течение 5 мин с последующим окрашиванием эозином в течение 2 мин (рис. 4).

Окрашивание миокарда различными видами гематоксилинов в целом было сходно с окрашиванием печени, однако при применении всех трех гематоксилинов (Mayer, Carazzi и Gill) максимальное контрастирование наблюдалось через 15 мин. При этом гематоксилин Mayer также несколько менял оттенок цитоплазмы и внеклеточного матрикса. Использование гематоксилина по регрессивному протоколу отчасти снижало целостность ткани, что в сочетании с высокой сложностью получения целостных срезов миокарда затрудняет получение высококачественных изображений. Поэтому для окрашивания миокарда авторы рекомендуют использовать гематоксилин Carazzi или Gill в течение 15 мин в сочетании с окрашиванием эозином в течение 2 мин (рис. 5).

В свою очередь паттерн окрашивания селезенки существенно отличался от такового для других видов тканей. Для сохранения баланса между окрашиванием обильно присутствующих в фолликулах ядер клеток и относительно небольшого количества цитоплазмы и внеклеточного матрикса (в сравнении с другими изученными тканями) оптимальным было применение гематоксилинов Carazzi и Mayer в течение 5 мин либо гематоксилина Gill в течение 15 мин. Увеличение времени воздействия гематоксилинами Carazzi и Mayer до 15 мин в ряде случаев вело к эффекту слияния ядер клеток за счет излишнего их окрашивания, а гематоксилин Gill при использовании в течение 5 мин не позволял достичь достаточной степени контрастирования ядер. Применение регрессивного протокола окрашивания гематоксилином несколько снижало целостность селезенки за счет использования дифференцирующего раствора. С целью максимального предотвращения различных артефактов в отношении изменения эозинового оттенка или слияния ядер клеток авторы рекомендуют использовать для окрашивания селезенки гематоксилин Carazzi в течение 5 мин в сочетании с окрашиванием эозином в тече-

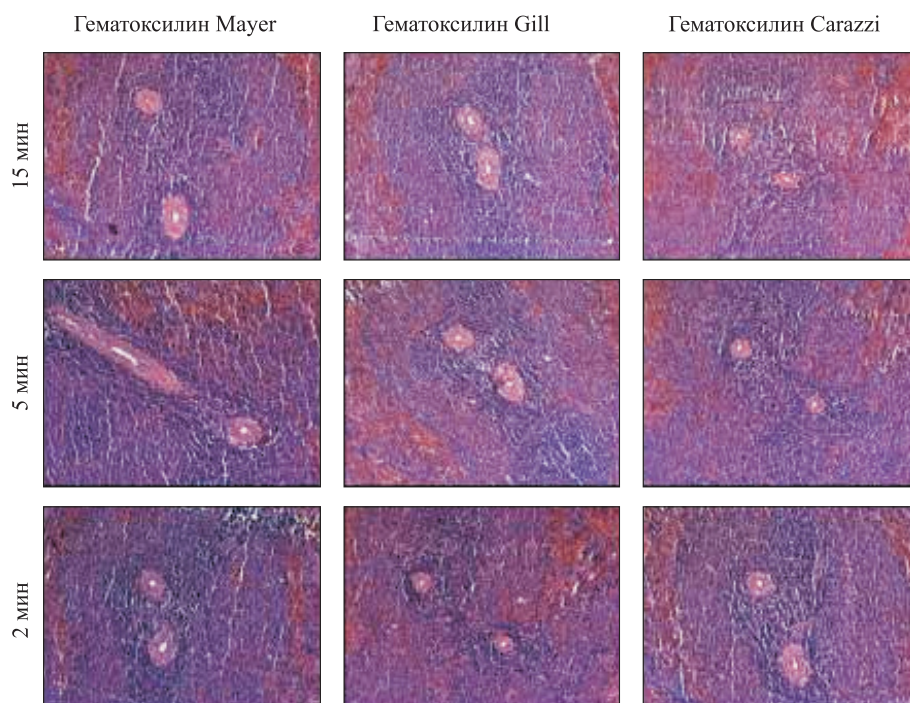


Рис. 4. Сравнительное окрашивание селезенки крысы прогрессивными гематоксилинами (Mayer, Gill и Carazzi) в течение 2, 5 и 15 мин для оптимизации протокола окрашивания. Увеличение $\times 200$

Fig. 4. Staining of the rat spleen using progressive hematoxylin (Mayer, Gill, and Carazzi) during 2, 5, and 15 minutes for the optimisation of the staining protocol. Magnification $\times 200$

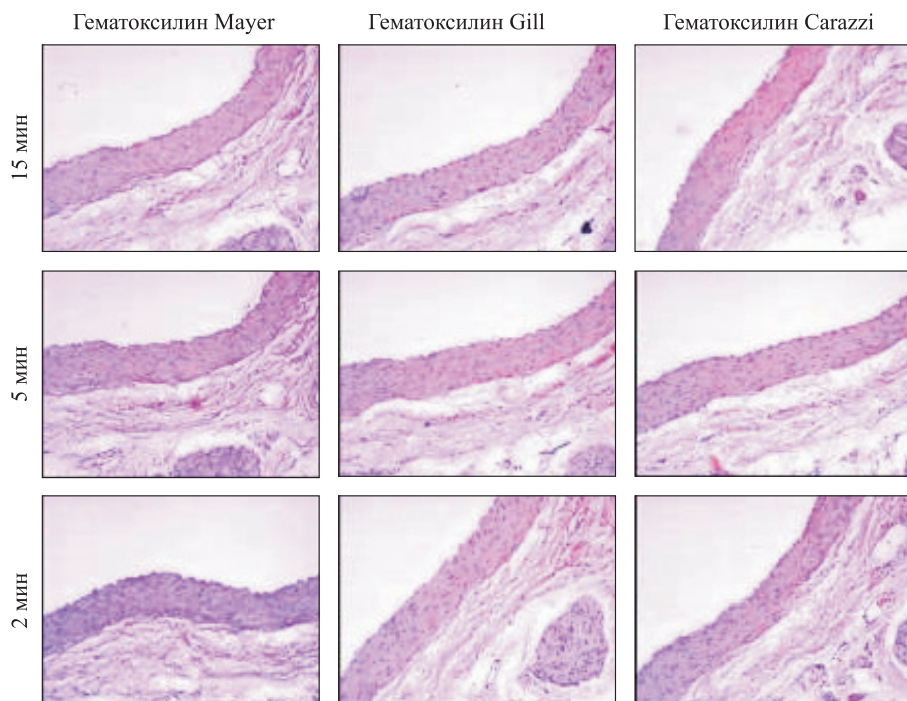


Рис. 5. Сравнительное окрашивание аорты крысы прогрессивными гематоксилинами (Mayer, Gill и Carazzi) в течение 2, 5 и 15 мин для оптимизации протокола окрашивания. Увеличение $\times 200$

Fig. 5. Staining of the rat aorta using progressive hematoxylin (Mayer, Gill, and Carazzi) during 2, 5, and 15 minutes for the optimisation of the staining protocol. Magnification $\times 200$

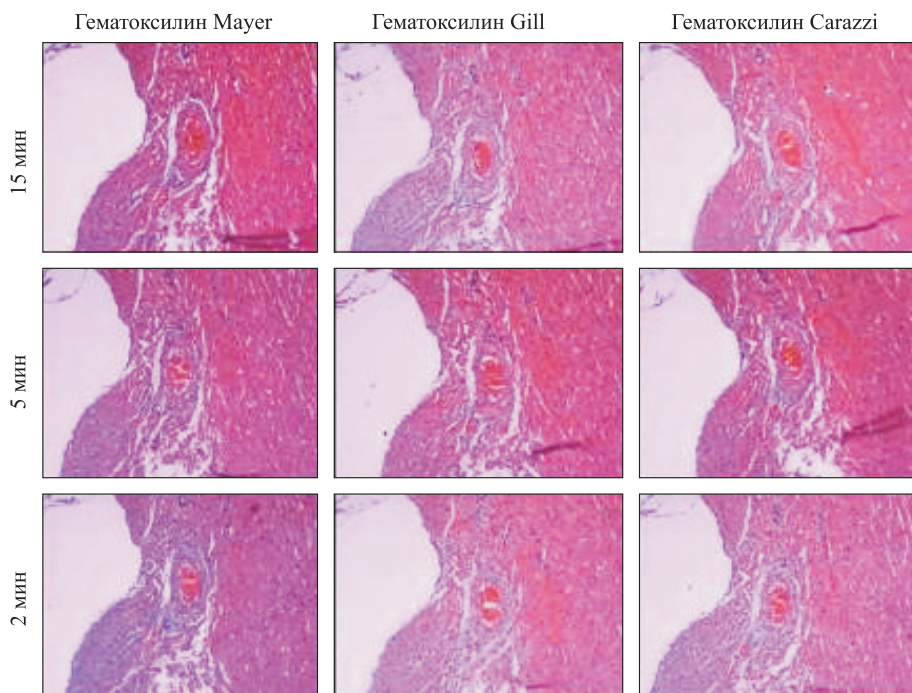


Рис. 6. Сравнительное окрашивание миокарда крысы прогрессивными гематоксилинами (Mayer, Gill и Carazzi) в течение 2, 5 и 15 мин для оптимизации протокола окрашивания. Увеличение $\times 200$

Fig. 6. Staining of the rat myocardium using progressive hematoxylin (Mayer, Gill, and Carazzi) during 2, 5, and 15 minutes for the optimisation of the staining protocol. Magnification $\times 200$

ние 2 мин (рис. 6). Важно отметить, что именно в отношении окрашивания селезенки принципиально именно 2-минутное (а не 1-минутное) воздействие эозина для максимального окрашивания слабовыраженных относительно других тканей цитоплазмы и внеклеточного матрикса (для аорты, печени и миокарда это менее актуально, хотя и позволяет максимально исключить артефакты, по мнению авторов).

Еще одним важным моментом в оптимизации протокола окрашивания тканей гематоксилином и эозином является модель камеры для микрофото съемки. Некоторые из них увеличивают контраст при слабовыраженном окрашивании, однако это приводит к избыточному контрастированию (нарушению цветовой гаммы и возникновению эффекта «слияния ядер») при изначально качественном окрашивании, и видимые исследователем в микроскоп и на экране монитора гистологические картины существенно различаются. Это также необходимо учитывать при оптимизации протокола окрашивания в каждой конкретной лаборатории. Кроме того, оценка качества окрашивания гематоксилином и эозином (в особенности при сравнении различных видов прогрессивных гематоксилинов) сугубо качественная и поэтому в значительной степени зависит от цветовосприятия гистолога.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимальным способом окрашивания аорты гематоксилином в сочетании с 2-минутным окрашиванием эозином является использование гематоксилина Carazzi в течение 15 мин, для окрашивания печени рекомендуется применять гематоксилин Carazzi или Gill в течение 15 мин либо гематоксилин Mayer в течение 5 мин, окрашивание миокарда оптимально при использовании гематоксилина Carazzi или Gill в течение 15 мин, а для окрашивания селезенки следует использовать гематоксилин Carazzi в течение 5 мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. 5-е изд., испр. и доп. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
Merkulov G.A. A Textbook of pathohistological techniques. 5th ed. Leningrad: Meditsina, 1969. 423 p. [In Russian].
2. Коржевский Д.Э. Применение гематоксилина в гистологической технике. *Морфология*. 2007; 132 (6): 77–81.
Korzhevskiy D.E. Application of hematoxylin in histological technique. *Morfologiya = Morphology*. 2007; 132 (6): 77–81. [In Russian].

3. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Григорьев И.П. Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии. СПб.: СпецЛит, 2013. С. 47–58.

Korzhevskiy D.E., Gilerovich E.G., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Grigoriev I.P. Morphological diagnostics: preparation of material for morphological research and electron microscopy. Saint-Petersburg: SpetsLit, 2013. 47–58. [In Russian].

4. Прокопьев Ю.А., Фоменко Д.В., Кизиченко Н.В., Кудрявцева Ю.А., Борисов В.В., Попова А.П., Михайлова Н.Н. Методические подходы к изучению антракосиликоза как фактора риска морфологических нарушений сосудов. *Комплекс. пробл. серд.-сосуд. заболеваний*. 2015; 4 (3): 23–27.

Prokopyev Yu.A., Fomenko D.V., Kizichenko N.V., Kudryavtseva Yu.A., Borisov V.V., Popova A.P., Mikhaylova N.N. Methodical approaches to study of the anthracosilicosis as a factor of risk to morphological diseases of blood vessels. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2015; 4 (3): 23–27. [In Russian].

5. Avwioro G. Histochemical uses of haematoxylin. *JPCS*. 2011; 1 (5): 24–34.

6. Bancroft J.D., Layton C. The hematoxylin and eosin. In: *Bancroft's theory and practice of histological techniques, 8th ed.* Eds. K. Suvarna, C. Layton, J. Bancroft. Elsevier, 2019: 126–139.

7. Chan J.K. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int. J. Surg. Pathol.* 2014; 22 (1): 12–32. doi: 10.1177/1066896913517939

8. Feldman A.T., Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1180: 31–43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3

9. Fischer A.H., Jacobson K.A., Rose J., Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* 2008; 2008: pdb.prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot4986

10. Li Y., Li N., Yu X., Huang K., Zheng T., Cheng X., Zeng S., Li X. Hematoxylin and eosin staining of intact tissues via delipidation and ultrasound. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 12259. doi: 10.1038/s41598-018-30755-5

11. Martina J.D., Simmons C., Jukic D.M. High-definition hematoxylin and eosin staining in a transition to digital pathology. *J. Pathol. Inform.* 2011; 2: 45. doi: 10.4103/2153-3539.86284

12. Senturk G.E., Canillioğlu Y.E. Which histochemical staining technique should I choose for biological specimens. In: *Microscopy: advances in scientific research and education*. Ed. A. Mendez-Vilas. Formatex Research Center, 2014: 769–775.

13. Titford M. The long history of hematoxylin. *Biotech. Histochem.* 2005; 80 (2): 73–78. doi: 10.1080/10520290500138372

14. Turkki R., Linder N., Kovanen P., Pellinen T., Lundin J. Identification of immune cell infiltration in hematoxylin-eosin stained breast cancer samples: texture-based classification of tissue morphologies. *Proc. SPIE*. 2016; 9791: 979110. doi: 10.1117/12.2217040

15. Zarella M.D., Yeoh C., Breen D.E., Garcia F.U. An alternative reference space for H&E color normalization. *PLoS One*. 2017; 12 (3): e0174489. doi: 10.1371/journal.pone.0174489

Сведения об авторах:

Богданов Л.А., ORCID: 0000-0003-4124-2316, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Шишкова Д.К., ORCID: 0000-0002-1518-3888, e-mail: shishkovadk@gmail.com

Кутихин А.Г., к.м.н., ORCID: 0000-0001-8679-4857, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Information about authors:

Bogdanov L.A., ORCID: 0000-0003-4124-2316, e-mail: bogdanovleone@gmail.com

Shishkova D.K., ORCID: 0000-0002-1518-3888, e-mail: shishkovadk@gmail.com

Kutikhin A.G., candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-8679-4857, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

ГАПЛОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ *CAT*, *TLR4* И *IL10* У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Елена Юрьевна БРАГИНА¹, Ирина Александровна ГОНЧАРОВА¹,
Максим Борисович ФРЕЙДИН¹, Ирина Жаргаловна ЖАЛСАНОВА¹,
Дэнсэма Евгеньевна ГОМБОЕВА¹, Евгений Владимирович НЕМЕРОВ²,
Валерий Павлович ПУЗЫРЕВ^{1,2}

¹ *НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского
медицинского центра РАН*
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

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

Среди пациентов с бронхиальной астмой значительно распространены сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания. Предполагается, что генетические факторы могут оказывать значительное влияние на развитие артериальной гипертензии у пациентов с астмой. Цель исследования – изучить ассоциации полиморфных вариантов, затрагивающих количественные изменения профиля экспрессии (Expression Quantitative Trait Loci (eQTL)) генов *CAT*, *TLR4* и *IL10*, с развитием бронхиальной астмы в сочетании с артериальной гипертензией. **Материал и методы.** Генотипирование 48 eQTL вариантов генов *CAT*, *TLR4* и *IL10* выполнено с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF у пациентов с «изолированными» астмой ($n = 145$) и артериальной гипертензией ($n = 144$) и их сочетанием ($n = 146$), а также в контрольной группе здоровых индивидов ($n = 152$). С помощью логистической регрессии проведен анализ ассоциаций гаплотипов с исследуемыми болезнями. **Результаты.** Развитие бронхиальной астмы в сочетании с артериальной гипертензией ассоциировано с гаплотипами, образованными eQTL полиморфизмами генов *CAT* и *TLR4*. «Изолированная» астма и коморбидная форма патологии различаются по спектру гаплотипов, ассоциированных с изученными заболеваниями. **Заключение.** Полученные результаты демонстрируют, что молекулярные связи астмы и гипертензии могут быть опосредованы вариантами, контролирующими экспрессию генов *TLR4* и *CAT*.

Ключевые слова: бронхиальная астма, артериальная гипертензия, коморбидность, полиморфизм генов, гаплотип, *CAT*, *TLR4*, *IL10*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке фонда Volkswagen Stiftung (# 90335) и Комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН (№ 0550-2018-0003).

Автор для переписки: Брагина Е.Ю., e-mail: elena.bragina72@gmail.com

Для цитирования: Брагина Е.Ю., Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Жалсанова И.Ж., Гомбоева Д.Е., Немеров Е.В., Пузырев В.П. Гаплотипический анализ генов *CAT*, *TLR4* и *IL10* у больных бронхиальной астмой с сопутствующей артериальной гипертензией. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 55–64. doi: 10.15372/SSMJ20190607

ANALYSIS OF HAPLOTYPES OF *CAT*, *TLR4*, AND *IL10* GENES IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS COMORBID WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Elena Yurjevna BRAGINA¹, Irina Alexandrovna GONCHAROVA¹,
Maxim Borisovich FREIDIN¹, Irina Zhargalovna ZHALSANOVA¹,
Densema Evgenjevna GOMBOEVA¹, Evgeniy Vladimirovich NEMEROV²,
Valeriy Pavlovich PUZYREV^{1,2}

¹ *Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center of RAS*
634050, Tomsk, Naberezhnaya reki Ushayky str., 10

² *Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia*
634050, Tomsk, Moskovsky path, 2

Co-occurrence of cardiovascular diseases is significantly common among patients with bronchial asthma. Genetic factors can have a significant effect on the development of hypertension in patients with asthma. Objective of the study was to investigate the associations of polymorphic variants relating to quantitative changes in the expression profile (eQTL) of the *CAT*, *TLR4*, and *IL10* genes with the development of bronchial asthma co-morbid with arterial hypertension. **Material and methods.** Genotyping of 48 eQTL SNPs of the *CAT*, *TLR4*, and *IL10* genes was performed using MALDI-TOF mass spectrometry in patients with «isolated» asthma ($n = 145$) and arterial hypertension ($n = 144$) and their combination ($n = 146$), as well as in the control group of healthy individuals ($n = 152$). Using logistic regression, an analysis of the associations of haplotypes with the studied diseases was carried out. **Results.** An association of bronchial asthma in combination with arterial hypertension with haplotypes formed by eQTL SNPs of the *CAT* and *TLR4* genes was established. The spectrum of haplotypes associated with comorbidity of asthma and hypertension differs from the haplotypes associated with “isolated” asthma. **Conclusion.** The molecular base of asthma and hypertension comorbidity can be associated with variants that control the expression of *TLR4* and *CAT* genes.

Key words: bronchial asthma, hypertension, comorbidity, polymorphism of genes, haplotype, *CAT*, *TLR4*, *IL10*.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. This study was supported by the Volkswagen Stiftung (# 90335) and project of the integrated basic research program of the SB RAS (# 0550-2018-0003).

Correspondence author: Bragina E.Yu., e-mail: elena.bragina72@gmail.com

Citation: Bragina E.Yu., Goncharova I.A., Freidin M.B., Zhalsanova I.Zh., Gomboeva D.E., Nemerov E.V., Puzyrev V.P. Analysis of haplotypes of *CAT*, *TLR4*, and *IL10* genes in bronchial asthma patients comorbid with arterial hypertension. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 55–64. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190607

Бронхиальная астма (БА) – широко распространенное хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, затрагивающее более 315 миллионов человек во всем мире, ассоциируется с высокой заболеваемостью, смертностью и потерей качества жизни [14]. Термин «астма» подобно артриту объединяет многие клинические особенности, что делает БА фенотипически гетерогенным заболеванием [40]. Клиническая гетерогенность БА может быть связана с наличием сопутствующей патологии, которая в значительной степени модифицирует течение и прогноз основного заболевания. Более половины пациентов с астмой (62,6 %) имеют как минимум одно сопутствующее заболевание, а у 16 % больных регистрируют наличие четырех сопутствующих заболеваний [39], наиболее изученными из которых являются аллергический ринит, дерматит и пищевая аллергия. У 60 % пациентов с БА отмечается манифестация симптомов атопического дерматита, 30–40 % больных с аллергическим ринитом имеют БА, а у детей с пищевой аллергией вероятность клинического проявления БА повышается в 4 раза [3, 10]. В основе совместного развития вышеперечисленных коморбидностей БА лежат системные механизмы формирования хронического аллергического воспаления.

Кроме того, у больных с БА наблюдается высокий риск развития сопутствующих заболеваний неаллергической природы, включая артериальную гипертензию, ожирение, сахарный диабет

2 типа и другие метаболические и эндокринные нарушения [37]. Механизмы, лежащие в основе данных распространенных коморбидностей, не связанных с аллергической природой заболевания, недостаточно изучены. Коморбидность БА с сердечно-сосудистыми заболеваниями обусловлена различными факторами, например, системное воспаление, нарушение регуляции тонуса гладкой мускулатуры, патологические изменения в работе иммунной системы, васкулярное ремоделирование, а также лекарственная терапия и генетические факторы [11, 12]. Пациенты с БА, имеющие сопутствующую артериальную гипертензию, как правило, обладают рядом фенотипических особенностей, включая пожилой возраст, позднее начало БА, высокий индекс массы тела, и характеризуются низким Th2-воспалительным ответом [22, 23].

Для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе коморбидности, используются различные подходы, в том числе сетевой анализ на уровне белков, генов, метаболитов и т.д., а также разнообразные статистические алгоритмы [29]. С помощью анализа структуры ассоциативной геномной сети и методов приоритизации ранее нами были выбраны наиболее приоритетные для исследования коморбидности БА и гипертензии гены интерлейкина-10 (*IL10*), Toll-подобного рецептора-4 (*TLR4*) и каталазы (*CAT*), которые играют важную роль в иммунном ответе [30]. В результате дальнейшего исследования выяв-

ленных приоритетных генов установлены ассоциации eQTL однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) генов *CAT* (rs2022318) и *TLR4* (rs7038716, rs7026297, rs7025144) с коморбидностью БА и гипертензии [9].

Целью настоящего исследования является оценка ассоциаций гаплотипов, образованных полиморфными вариантами генов *IL10*, *TLR4* и *CAT*, с развитием «изолированной» БА и БА в сочетании с артериальной гипертензией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе изучены полиморфные варианты, оказывающие влияние на экспрессию генов *CAT*, *TLR4* и *IL10*, для поиска которых использовался ресурс GTEx (The Genotype-Tissue Expression, <https://gtexportal.org/>), содержащий данные экспериментов секвенирования мРНК в различных тканях. В исследование были включены SNPs с частотой редкого аллеля больше 5 % у европеоидов. Для функциональной аннотации выбранных SNPs использовали ресурс RegulomeDB (<http://regulomedb.org>), который представляет собой систему оценки регуляторного потенциала с категориями от 1 до 6, присвоенными на основании экспериментальных и теоретических данных о регуляторных функциях рассматриваемого варианта. Минимальный балл RegulomeDB предпола-

гает высокую вероятность влияния полиморфизма на изменение экспрессии соответствующего гена/белка.

Выявленные с помощью подходов биоинформатики SNPs изучены в трех группах пациентов: с БА, с БА в сочетании с артериальной гипертензией и с артериальной гипертензией без БА в анамнезе. Контрольная группа включала индивидов с нормальным артериальным давлением и отсутствием признаков БА. Характеристика обследованных представлена в табл. 1. Диагноз «бронхиальная астма» и «артериальная гипертензия» установлен на основании клинического обследования пациентов согласно общепринятым критериям. По этническому составу все включенные в исследование лица принадлежат к восточным европейцам (преимущественно русские). Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ медицинской генетики (протокол № 2 от 30.05.2016). От всех участников получены информированные согласия.

Геномная ДНК выделена из образцов периферической крови с помощью фенол-хлороформной экстракции. Для исследования выбраны 25 *cis*-eQTL вариантов гена *CAT*, 20 *cis*-eQTL гена *TLR4* и 3 *cis*-eQTL гена *IL10* [30]. Мультиплексное генотипирование полиморфизмов (табл. 2) выполнено с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с применением платформы Sequenom MassARRAY

Таблица 1. Характеристика обследованных

Table 1. Characteristics of the surveyed patients

| Группа | Среднее значение ± SD или численность в группе (%) | <i>p</i> |
|--|---|-----------|
| Гипертензия, <i>n</i> = 144 | | |
| Возраст, лет | 51,27 ± 6,05 | 0,0003 |
| Количество мужчин, <i>n</i> (%) | 47 (32,6) | < 0,00001 |
| Количество женщин, <i>n</i> (%) | 97 (67,4) | |
| Астма, <i>n</i> = 145 | | |
| Возраст, лет | 44,89 ± 8,86 | 0,0099 |
| Количество мужчин, <i>n</i> (%) | 106 (73,1) | 0,9099 |
| Количество женщин, <i>n</i> (%) | 39 (26,9) | |
| Астма в сочетании с гипертензией, <i>n</i> = 146 | | |
| Возраст, лет | 56,32 ± 10,47 | < 0,00001 |
| Количество мужчин, <i>n</i> (%) | 106 (72,6) | 0,8332 |
| Количество женщин, <i>n</i> (%) | 40 (27,4) | |
| Здоровые, <i>n</i> = 152 | | |
| Возраст, лет | 47,75 ± 9,92 | |
| Количество мужчин, <i>n</i> (%) | 112 (73,7) | |
| Количество женщин, <i>n</i> (%) | 40 (26,3) | |

Примечание. SD – стандартное отклонение; *p* – уровень значимости отличия от величины соответствующего показателя здоровых людей, для непрерывных переменных использовали *t*-критерий Стьюдента, для номинальных – критерий χ^2 .

Таблица 2. Основная информация об изученных полиморфных вариантах генов IL10, TLR4 и CAT
 Table 2. Basic characteristics of the studied SNPs of IL10, TLR4 and CAT genes

| Хромосомная локализация [#] | SNP ID | Regulome DB-балл | Минорный/мажорный аллели | MAF | χ^2 (df = 2) | p |
|--------------------------------------|------------|------------------|--------------------------|-------|-------------------|--------|
| eQTL гена CAT | | | | | | |
| chr11:34452373 | rs10836230 | 5 | T/C | 0,361 | 0,35 | 0,8394 |
| chr11:34425326 | rs11032655 | 6 | G/A | 0,113 | 0,01 | 0,9950 |
| chr11:34447585 | rs11032695 | 1 | G/T | 0,364 | 0,30 | 0,8607 |
| chr11:34461567 | rs11032699 | 1 | T/G | 0,339 | 1,30 | 0,5220 |
| chr11:34461702 | rs11032700 | 1 | C/A | 0,328 | 0,35 | 0,8395 |
| chr11:34508850 | rs11032723 | 1 | C/G | 0,432 | 0,02 | 0,9901 |
| chr11:34509642 | rs12797274 | – | C/A | 0,368 | 0,14 | 0,9324 |
| chr11:34438407 | rs12806377 | 4 | G/A | 0,366 | 0,12 | 0,9418 |
| chr11:34500078 | rs1535721 | 6 | A/G | 0,214 | 1,21 | 0,5461 |
| chr11:34511045 | rs17269847 | 5 | C/T | 0,064 | 0,29 | 0,8650 |
| chr11:34429643 | rs2022318 | 6 | C/G | 0,392 | 0,36 | 0,8353 |
| chr11:34514270 | rs2420386 | 2 | G/C | 0,440 | 0,26 | 0,8781 |
| chr11:34467645 | rs480575 | 4 | G/A | 0,272 | 0,27 | 0,8737 |
| chr11:34467271 | rs484214 | 4 | G/A | 0,277 | 0,10 | 0,9512 |
| chr11:34487728 | rs511895 | 5 | T/C | 0,454 | 0,01 | 0,9950 |
| chr11:34519223 | rs7126243 | – | T/C | 0,114 | 0,04 | 0,9802 |
| chr11:34520161 | rs7130331 | 4 | T/C | 0,110 | 0,04 | 0,9802 |
| chr11:34520228 | rs7130345 | 2 | G/A | 0,101 | 0,19 | 0,9094 |
| chr11:34459716 | rs769214 | 1 | G/A | 0,334 | 0,89 | 0,6408 |
| chr11:34431653 | rs7934463 | 6 | T/C | 0,366 | 0,05 | 0,9753 |
| chr11:34527636 | rs7938373 | 2 | C/T | 0,097 | 0,38 | 0,8270 |
| chr11:34502041 | rs7949972 | 1 | T/C | 0,357 | 0,11 | 0,9465 |
| eQTL гена TLR4 | | | | | | |
| chr9:117735680 | rs10465133 | – | G/T | 0,353 | 0,62 | 0,7334 |
| chr9:117661425 | rs1329068 | 5 | G/A | 0,420 | 0,04 | 0,9801 |
| chr9:117734109 | rs7025144 | 4 | G/C | 0,217 | 0,01 | 0,9950 |
| chr9:117757872 | rs7026297 | – | T/C | 0,213 | 0,01 | 0,9950 |
| chr9:117656481 | rs745507 | 5 | C/A | 0,048 | 1,45 | 0,4843 |
| chr9:117741230 | rs7860332 | 5 | T/G | 0,461 | 0,17 | 0,9185 |
| chr9:117671123 | rs10818066 | 6 | C/T | 0,151 | 0,15 | 0,9277 |
| chr9:117680977 | rs1928297 | 6 | T/C | 0,207 | 0,16 | 0,9231 |
| chr9:117684548 | rs1928298 | 6 | C/T | 0,290 | 0,11 | 0,9465 |
| chr9:117700861 | rs2770150 | – | G/A | 0,299 | 0,11 | 0,9465 |
| chr9:117760334 | rs7038716 | – | T/A | 0,204 | 0,20 | 0,9048 |
| chr9:117699343 | rs10759930 | – | T/C | 0,421 | 0,93 | 0,6281 |
| chr9:117606458 | rs10983712 | 6 | C/T | 0,408 | 2,59 | 0,2738 |
| chr9:117772388 | rs10983783 | 6 | G/T | 0,398 | 0,06 | 0,9704 |
| chr9:117643731 | rs12001662 | 5 | T/C | 0,479 | 0,42 | 0,7985 |
| chr9:117654842 | rs1887905 | 5 | C/G | 0,423 | 0,05 | 0,9753 |
| chr9:117702447 | rs1927914 | 6 | G/A | 0,291 | 0,43 | 0,8065 |
| chr9:117764054 | rs4837505 | 5 | A/G | 0,182 | 0,35 | 0,8394 |
| eQTL гена IL10 | | | | | | |
| chr1:206946633 | rs1800871 | 3 | A/G | 0,253 | 0,41 | 0,8065 |
| chr1:206945310 | rs3024490 | 6 | A/C | 0,259 | 0,47 | 0,7905 |
| chr1:206944111 | rs3024492 | 4 | A/T | 0,185 | 0,30 | 0,8607 |

Примечание. # – хромосомная локализация, представленная в NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov (GRCh38.p12); SNP ID – идентификационный номер полиморфизма; RegulomeDB-балл – балл от 1 до 6, присваиваемый на основании функциональных свойств полиморфизма согласно ресурсу RegulomeDB («–» – данные отсутствуют); MAF – частота минорного аллеля в контрольной группе; p – уровень значимости при тестировании PХВ.

iPLEX (США). Автоматический анализ данных проведен с помощью программного обеспечения MassARRAY Type 4.

Тестирование на соответствие равновесию Харди – Вайнберга (РХВ) в контрольной группе осуществляли с помощью теста χ^2 (см. табл. 2). Для оценки структуры неравновесия по сцеплению (LD) использовали программу Haploview version 4.2 [7]. Паттерны LD между SNPs оценивали с помощью параметров D' и r^2 . Блочная структура гаплотипов определена с использованием алгоритма, предложенного N. Wang с соавт. [38]. Ассоциацию гаплотипов с развитием заболеваний анализировали с помощью логистической регрессии с поправкой на пол и возраст. Анализ проведен с помощью пакета haplo.stats для программной среды R [35]. Статистически значимыми считали ассоциации с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании выполнен анализ ассоциаций гаплотипов генов *IL10*, *TLR4* и *CAT* с «изолированной» БА, артериальной гипертензией и БА, коморбидной с гипертензией, образованных SNPs, которые являются eQTL и меняют экспрессию данных генов в различных тканях. Согласно оценке регуляторного потенциала с помощью RegulomeDB, выбранные SNPs затрагивают гиперчувствительные сайты связывания ДНКазы и/или транскрипционных факторов и с наибольшей вероятностью влияют на транскрипционную активность генов. Максимальным регуляторным потенциалом обладают 10 SNPs, которые имеют балл от 1 до 3, для 7 SNP сведения о регуляторной функции в RegulomeDB не представлены (см. табл. 2). Тем не менее экспериментальные данные ресурса GTEx относят все исследуемые SNPs к функционально значимым eQTL, обладающим выраженным влиянием на изменение экспрессии генов *IL10*, *TLR4* и *CAT*.

Из 25 вариантов гена *CAT*, выбранных для анализа, были исключены два, для которых доля непрогенотипированных образцов составила более 20 % (rs17350806 и rs2284368), а также вариант с отклонением от РХВ (rs10836234). Для двух из 20 изученных полиморфных вариантов гена *TLR4* (rs1928296; rs7873159) также отмечено отклонение от РХВ, поэтому данные варианты были исключены из дальнейшего анализа ассоциаций гаплотипов с заболеваниями. Изученные варианты (rs1800871; rs3024490; rs3024492) гена *IL10* образуют один гаплотипический блок, для которого не обнаружено ассоциаций с развитием БА, гипертензии и их сочетания. Полиморфизмы гена *CAT* образуют четыре гаплотипических

блока. Блок 1 включает пять гаплотипов, встречающихся с частотой более 2 % у здоровых индивидов. Блок 2 состоит из двух близко расположенных вариантов (rs11032699 и rs11032700), расстояние между которыми составляет 135 пар нуклеотидов; гаплотипический блок 3 также составляют 2 SNP (rs484214, rs480575), между которыми 374 пар нуклеотидов. Блок 4 образован максимальным количеством SNP и состоит из 5 наиболее распространенных в изученной выборке гаплотипов, которые выявляются во всех изученных группах.

Установлены ассоциации гаплотипов блоков 1, 2 и 4 с БА на фоне гипертензии, а также гаплотипов блока 4 с «изолированной» БА (табл. 3). Причем развитие «изолированной» БА и БА в сочетании с артериальной гипертензией ассоциируется с разными гаплотипами блока 4. Варианты гена *TLR4* образуют 5 гаплотипических блоков, за исключением полиморфного варианта rs10983783, который не вошел ни в один блок. Единственный гаплотип, образованный вариантами rs10465133, rs7025144, rs7860332 (ТСТ), ассоциирован с коморбидностью БА и артериальной гипертензией (табл. 4). Частота данного гаплотипа у здоровых индивидов выше (10,4 %), чем у больных БА в сочетании с артериальной гипертензией (4,1 %) ($p = 0,004$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния генетической вариабельности на развитие многофакторных заболеваний – достаточно трудная задача. Это связано со многими причинами, обусловленными сложностью на пути реализации генетической изменчивости в определенные фенотипы. Наличие коморбидности затрудняет ассоциативный анализ генов с отдельными заболеваниями без учета сопутствующей патологии. Исходя из этого, в своей работе мы проанализировали ассоциации БА с учетом коморбидности с сердечно-сосудистой патологией и установили различия в распространенности гаплотипов генов *CAT* и *TLR4* у больных «изолированной» БА и БА в сочетании с гипертензией.

Ранее уже сообщалось об ассоциациях полиморфных вариантов гена *CAT*, связанных с измененной функциональной активностью фермента, с метаболическими нарушениями и коморбидными с ними заболеваниями, включая артериальную гипертензию, ишемическую болезнь сердца, остеопороз и другие [1, 5, 16, 17, 28]. Каталаза экспрессируется повсеместно, является необходимым компонентом различных процессов жизнедеятельности организма и характеризуется выраженным плейотропным эффектом, что отра-

Таблица 3. Частоты гаплотипов, образованных eQTL SNPs гена CAT, у больных и здоровых людей

Table 3. Haplotype frequencies generated for eQTL SNPs of the CAT gene in patients and healthy individuals

| Гаплотипический блок | Гаплотип | Группа | | | |
|---|--------------------------------|----------|-------------------------------|----------------------------------|-------------|
| | | Здоровые | Астма | Астма в сочетании с гипертензией | Гипертензия |
| Блок 1: rs11032655, rs2022318, rs7934463, rs12806377, rs11032695, rs10836230 | ACCATC | 0,037 | 0,031 | 0,057 | 0,021 |
| | ACTATC ^{Референс} | 0,347 | 0,382 | 0,428 | 0,360 |
| | AGCATC | 0,238 | 0,214 | 0,132 ^{0,005} | 0,219 |
| | AGCGGT | 0,238 | 0,205 | 0,242 | 0,246 |
| | GGCGGT | 0,107 | 0,139 | 0,124 | 0,135 |
| Блок 2: rs11032699, rs11032700 | GA ^{Референс} | 0,653 | 0,632 | 0,568 | 0,657 |
| | TC | 0,315 | 0,368 | 0,425 ^{0,046} | 0,339 |
| Блок 3: rs484214, rs480575 | AA ^{Референс} | 0,709 | 0,672 | 0,627 | 0,729 |
| | GG | 0,259 | 0,324 | 0,366 | 0,271 |
| Блок 4: rs1535721, rs7949972, rs11032723, rs12797274, rs17269847, rs2420386, rs7126243, rs7130331, rs7130345, rs7938373 | ACGATCCCAT | 0,206 | 0,209 | 0,293 | 0,180 |
| | GCCACGCCAT | 0,063 | 0,103 ^{0,039} | 0,054 | 0,083 |
| | GCCCTGCCAT ^{Референс} | 0,357 | 0,299 | 0,362 | 0,378 |
| | GTGATCCCAT | 0,249 | 0,190 | 0,131 ^{0,016} | 0,208 |
| | GTGATCTTGC | 0,086 | 0,134 ^{0,031} | 0,122 | 0,125 |

Примечание. Здесь и в табл. 4 статистически значимый уровень различий (p) при сравнении случаев с контролем (здоровые лица) приведен в верхнем индексе; сравнения проводились с помощью логистической регрессии с использованием наиболее распространенного гаплотипа в качестве референса (выделен надстрочным индексом) и с учетом возраста и пола. Представлены гаплотипы с частотой более 2 %.

Таблица 4. Частоты гаплотипов, образованных eQTL SNPs гена TLR4, у больных и здоровых людей

Table 4. Haplotype frequencies generated for eQTL SNPs of the TLR4 gene in patients and healthy individuals

| Гаплотипический блок | Гаплотип | Группа | | | |
|--|---------------------------|----------|-------|----------------------------------|-------------|
| | | Здоровые | Астма | Астма в сочетании с гипертензией | Гипертензия |
| Блок 1: rs10983712, rs12001662 | CT | 0,405 | 0,451 | 0,392 | 0,439 |
| | TC ^{Референс} | 0,511 | 0,450 | 0,562 | 0,481 |
| | TT | 0,080 | 0,099 | 0,042 | 0,071 |
| Блок 2: rs1329068, rs745507, rs10818066, rs1887905 | AATG ^{Референс} | 0,526 | 0,510 | 0,557 | 0,522 |
| | ACTG | 0,048 | 0,056 | 0,042 | 0,038 |
| | GACC | 0,153 | 0,126 | 0,187 | 0,147 |
| | GATC | 0,267 | 0,301 | 0,207 | 0,284 |
| Блок 3: rs1928297, rs1928298, rs2770150, rs10759930, rs1927914 | CCACG | 0,076 | 0,096 | 0,041 | 0,085 |
| | CTATA ^{Референс} | 0,414 | 0,368 | 0,406 | 0,396 |
| | CTGCA | 0,288 | 0,265 | 0,317 | 0,267 |
| | TCACG | 0,205 | 0,245 | 0,231 | 0,234 |
| Блок 4: rs10465133, rs7025144, rs7860332 | GCT | 0,141 | 0,140 | 0,130 | 0,141 |
| | GTT | 0,212 | 0,215 | 0,279 | 0,211 |
| | TCG ^{Референс} | 0,535 | 0,550 | 0,546 | 0,536 |
| | TCT | 0,108 | 0,095 | 0,041 ^{0,004} | 0,107 |
| Блок 5: rs7026297, rs7038716, rs4837505 | CAG ^{Референс} | 0,776 | 0,780 | 0,715 | 0,777 |
| | TTA | 0,170 | 0,155 | 0,233 | 0,176 |
| | TTG | 0,030 | 0,034 | 0,045 | 0,039 |

жается в наблюдаемых ассоциациях со многими заболеваниями. У людей акаталеземия (OMIM: # 614097) является сравнительно распространенным аутосомно-рецессивным заболеванием, обусловленным почти полным отсутствием каталазы, которое обычно считается бессимптомным. Тем не менее последствием низкой активности этого фермента может быть развитие ряда заболеваний, связанных с окислительным стрессом и воспалением, в том числе БА и артериальной гипертензии. Предполагается, что роль каталазы в многоклеточных организмах заключается не в защите клеток от H_2O_2 , а преимущественно в регуляции апоптоза путем контроля клеточных уровней H_2O_2 [25]. Недостаточная индукция апоптоза способствует накоплению клеток воспаления, поддерживая течение воспалительного процесса, что, вероятно, является одним из возможных патогенетических механизмов развития коморбидности БА и гипертензии.

Наряду с транскрипционным ядерным фактором NF- κ B активация *TLR4* играет решающую роль в воспалении и инициации врожденных иммунных реакций. *TLR4* экспрессируется конститутивно и постоянно находится в составе клеточной мембраны лейкоцитов, готовый к встрече и распознаванию патогенов. Изменение иммунореактивности и экспрессии Toll-подобных рецепторов может приводить к нарушению иммунного ответа [18]. Активация гена *TLR4* наблюдается после инфаркта миокарда в сердце мышей [13], а также связана с началом и прогрессией атеросклероза [27]. Гипертензивные крысы по сравнению с нормотензивными животными характеризуются существенным увеличением экспрессии *TLR4* в кардиомиоцитах, который наряду с другими воспалительными маркерами снижается при обработке антителами к *TLR4*, что свидетельствует об участии рецептора в ассоциированном с гипертензией повреждении конечного органа [8].

Один из механизмов воспаления в сосудистой стенке при артериальной гипертензии связан с долгосрочной активацией *TLR4* эндогенными лигандами, такими как С-реактивный белок, белки теплового шока (HSP60 и HSP70), повышение содержания которых запускает каскад экспрессии ряда провоспалительных цитокинов [6, 15, 20, 26]. В свою очередь провоспалительные цитокины, регулирующие экспрессию и функцию многих белков, включая молекулы адгезии, MAP-киназы, компоненты внеклеточного матрикса и факторы роста, влияющие на эндотелиальную дисфункцию, сосудистую реактивность, структурные изменения сосудистой стенки, могут выступать в качестве неблагоприятного фактора в

развитии артериальной гипертензии [36]. У больных БА с нейтрофильным воспалением также отмечается выраженная активация именно *TLR4* [34], а также регистрируется увеличение экспрессии гена *TLR4* в клетках слизистой оболочки носа у детей с БА [2].

В нескольких исследованиях установлена связь функционального полиморфизма генов семейства TLR с характером иммунных реакций и предрасположенностью различным фенотипам БА [19, 41], а также ассоциации полиморфизма гена *TLR4* с развитием гипертензии у пациентов с ожирением и ишемической болезнью сердца [32, 33]. Ни один из трех изученных в настоящей работе eQTL вариантов гена *TLR4*, образующих ассоциированный гаплотип, ранее не исследовался в отношении развития БА и гипертензии. Полиморфный вариант rs10465133, входящий в состав ассоциированного с коморбидностью БА и артериальной гипертензией гаплотипа, связан с развитием невротизма [24]. Два других SNPs (rs7025144, rs7860332) гаплотипа TCT были изучены у больных атеросклерозом, однако ассоциаций с развитием заболевания не было обнаружено [11].

Основываясь на полученных данных об ассоциации гаплотипов генов *CAT* и *TLR4*, можно полагать, что нарушения в контроле процессов окислительного стресса, иммунных реакций и воспаления являются важной патогенетической составляющей развития коморбидности БА и артериальной гипертензии. Стоит отметить, что разные паттерны SNPs ассоциированы с развитием «изолированной» БА и БА, коморбидной с гипертензией. Наши данные о специфичности ассоциаций для коморбидных и изолированных фенотипов подтверждаются данными других исследований [4, 21]. Наиболее вероятным объяснением этому могут быть две причины. Во-первых, модифицирующее действие оказывают средовые факторы [31], в том числе лекарственная терапия, которая различается при изолированных и коморбидных формах заболеваний, что не было учтено в нашем анализе. Во-вторых, SNPs могут влиять на экспрессию не только того гена, в пределах нуклеотидной последовательности которого они располагаются, но и других генов, играющих важную роль в тканевых процессах, патогенетически связанных с развитием различных заболеваний. Например, полиморфизм rs7938373, входящий в состав гаплотипа, ассоциированного в нашем исследовании с изолированной БА и с коморбидной формой, является eQTL гена *CAT* в периферической крови ($p = 0,000000095$ согласно данным GTEx), а также eQTL гена *ELF5* в легочной ткани ($p = 0,00000038$ согласно данным GTEx).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ассоциации гаплотипов функциональных вариантов генов *CAT* и *TLR* с БА, сочетанной с артериальной гипертензией. В основе полученных ассоциаций, вероятнее всего, лежат изменения в уровне генной экспрессии, поскольку все гаплотипы, связанные в проведенном исследовании с заболеваниями, образованы *cis*-eQTL вариантами генов *CAT* и *TLR4*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бушуева О.Ю., Иванов В.П., Рыжаева В.Н., Пономаренко И.В., Чурносов М.И., Полоников А.В. Ассоциация полиморфизма -844G>A гена каталазы с повышенным риском развития артериальной гипертензии у курильщиков. *Терапевт. арх.* 2016; 88 (9): 50–54. doi: 10.17116/terarkh201688950-54
2. Bushueva O.Yu., Ivanov V.P., Ryzhaeva V.N., Ponomarenko I.V., Churnosov M.I., Polonikov A.V. Association of the -844G>A polymorphism in the catalase gene with the increased risk of essential hypertension in smokers. *Терапевтический архив = Therapeutic archive.* 2016; 88 (9): 50–54. [In Russian]. doi: 10.17116/terarkh201688950-54
3. Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Хорева М.В., Брагвадзе Б.Г., Огурцова А.Д., Алексеева А.А., Ганковский В.А., Свитич О.А. Особенности экспрессии toll-подобного рецептора 2 и toll-подобного рецептора 4 у детей с бронхиальной астмой. *Мед. иммунология.* 2017; 19 (4): 431–440. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440
4. Gankovskaya L.V., Namazova-Baranova L.S., Khoreva M.V., Bragvadze B.G., Ogurtsova A.D., Alekseeva A.A., Gankovskii V.A., Svitich O.A. Expression features of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in children with asthma. *Медицинская иммунология = Medical Immunology.* 2017; 19 (4): 431–440. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-44
5. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-макет, 2017. 160 с.
6. National program «Bronchial asthma in children. Strategy of treatment and prevention. 5th ed., revised and supplemented. Moscow: Original-maket, 2017. 160 p. [In Russian].
7. Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Салтыкова И.В., Деева Е.В., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Влияние дополнительной болезни (коморбидности) на ассоциацию аллергического ринита с вариантом rs12621643 гена *KCNE4*. *Генетика.* 2013; 49 (4): 541–544. doi: 10.7868/S001667581304005X
8. Freidin M.B., Bragina E.Yu., Saltykova I.V., Deeva E.V., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. Effect of additional disease (comorbidity) on association of allergic rhinitis with *KCNE4* gene rs12621643 variant. *Russ. J. Genet.* 2013; 4 (4): 473–475. [In Russian].
9. Чистяков Д.А., Туракулов Р.И., Щербачева Л.Н., Мамаева Г.Г., Балаболкин М.И., Носиков В.В. Анализ полиморфизма локуса D11S2008 рядом с геном каталазы у больных гипертензией и ишемической болезнью сердца при инсулиннезависимом сахарном диабете в Московской популяции. *Генетика.* 2000; 36 (3): 423–426.
10. Chistyakov D.A., Turakulov R.I., Shcherbacheva L.N., Mamaeva G.G., Balabolkin M.I., Nosikov V.V. Analysis of polymorphism of the D11S2008 locus of the catalase gene in patients with hypertension and ischemic heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Muscovite population. *Russ. J. Genet.* 2000; 36 (3): 340–342. [In Russian].
11. Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (17): 15028–15034. doi: 10.1074/jbc.M200497200
12. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005; 21 (2): 263–265.
13. Bomfim G.F., Dos Santos R.A., Oliveira M.A., Giachini F.R., Akamine E.H., Tostes R.C., Fortes Z.B., Webb R.C., Carvalho M.H. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond).* 2012; 122 (11): 535–543. doi: 10.1042/CS20110523
14. Bragina E.Y., Goncharova I.A., Garaeva A.F., Nemerov E.V., Babovskaya A.A., Karpov A.B., Semenova Y.V., Zhalsanova I.Z., Gomboeva D.E., Saik O.V., Zolotareva O.I., Ivanisenko V.A., Dosenko V.E., Hofstaedt R., Freidin M.B. Molecular relationships between bronchial asthma and hypertension as comorbid diseases. *J. Integr. Bioinform.* 2018; 15 (4). doi: 10.1515/jib-2018-0052
15. Branum A.M., Lukacs S.L. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics.* 2009; 124 (6): 1549–1555. doi: 10.1542/peds.2009-1210
16. Christiansen S.C., Zuraw B.L. Treatment of hypertension in patients with asthma. *N. Engl. J. Med.* 2019; 381 (11): 1046–1057. doi: 10.1056/NEJMr1800345
17. Ferguson S., Teodorescu M.C., Gangnon R.E., Peterson A.G., Consens F.B., Chervin R.D., Teodorescu M. Factors associated with systemic hypertension in asthma. *Lung.* 2014; 192 (5): 675–683. doi: 10.1007/s00408-014-9600-y
18. Frantz S., Kobzik L., Kim Y.D., Fukazawa R., Medzhitov R., Lee R.T., Kelly R.A. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* 1999; 104 (3): 271–280.

14. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390 (10100): 1211–1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2
15. Ji Y., Liu J., Wang Z., Liu N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol. Biochem*. 2009; 23 (4-6): 265–276. doi: 10.1159/000218173
16. Jiang Z., Akey J.M., Shi J., Xiong M., Wang Y., Shen Y., Xu X., Chen H., Wu H., Xiao J., Lu D., Huang W., Jin L. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Hum. Genet*. 2001; 109 (1): 95–98. doi: 10.1007/s004390100553
17. Kodydková J., Vávrová L., Kocík M., Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol. (Praha)*. 2014; 60 (4): 153–167.
18. Lafferty E.I., Qureshi S.T., Schnare M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. *J. Inflamm. (Lond.)*. 2010; 7: 57. doi: 10.1186/1476-9255-7-57
19. Lau M.Y., Dharmage S.C., Burgess J.A., Win A.K., Lowe A.J., Lodge C., Perret J., Hui J., Thomas P.S., Morrison S., Giles G.G., Hopper J., Abramson M.J., Walters E.H., Matheson M.C. The interaction between farming/rural environment and TLR2, TLR4, TLR6 and CD14 genetic polymorphisms in relation to early- and late-onset asthma. *Sci. Rep*. 2017; 7: 43681. doi: 10.1038/srep43681
20. Liu N., Liu J.T., Ji Y.Y., Lu P.P. C-reactive protein triggers inflammatory responses partly via TLR4/IRF3/NF- κ B signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2010; 87 (11-12): 367–374. doi: 10.1016/j.lfs.2010.07.012
21. Makeeva O.A., Sleptsov A.A., Kulish E.V., Barbarash O.L., Mazur A.M., Prokhorchuk E.B., Chekanov N.N., Stepanov V.A., Puzyrev V.P. Genomic study of cardiovascular continuum comorbidity. *Acta Naturae*. 2015; 7 (3): 89–99.
22. Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li H., Busse W.W., Jarjour N.N., Wenzel S.E., Peters S.P., Meyers D.A., Bleeker E.R. National Heart, Lung, and Blood Institute’s Severe Asthma Research Program. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2014; 133 (6): 1557–1563.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011
23. Moore W.C., Meyers D.A., Wenzel S.E., Teague W.G., Li H., Li X., D’Agostino R., Jr., Castro M., Curran-Everett D., Fitzpatrick A.M., Gaston B., Jarjour N.N., Sorkness R., Calhoun W.J., Chung K.F., Comhair S.A., Dweik R.A., Israel E., Peters S.P., Busse W.W., Erzurum S.C., Bleeker E.R. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2010; 181 (4): 315–323. doi: 10.1164/rccm.200906-0896OC
24. Nagel M., Jansen P.R., Stringer S., Watanabe K., de Leeuw C.A., Bryois J., Savage J.E., Hammerschlag A.R., Skene N.G., Munoz-Manchado A.B., White T., Tiemeier H., Linnarsson S., Hjerling-Lefler J., Polderman T.J.C., Sullivan P.F., van der Sluis S., Posthuma D. Meta-analysis of genome-wide association studies for neuroticism in 449,484 individuals identifies novel genetic loci and pathways. *Nat. Genet*. 2018; 50 (7): 920–927. doi: 10.1038/s41588-018-0151-7
25. Neno M., Ichimura S., Mita K., Yukawa O., Cartwright I.L. Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Res*. 2001; 61 (15): 5885–5894.
26. Ohashi K., Burkart V., Flohé S., Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol*. 2000; 164 (2): 558–561. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.558
27. Pasterkamp G., van Keulen J.K., de Kleijn D.P. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur. J. Clin. Invest*. 2004; 34 (5): 328–334. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01338.x
28. Polonikov A.V., Ivanov V.P., Bogomazov A.D., Freidin M.B., Illig T., Solodilova M.A. Antioxidant defense enzyme genes and asthma susceptibility: gender-specific effects and heterogeneity in gene-gene interactions between pathogenetic variants of the disease. *Biomed. Res. Int*. 2014; 2014: 708903. doi: 10.1155/2014/708903
29. Pouladi N., Achour I., Li H., Berghout J., Kenost C., Gonzalez-Garay M.L., Lussier Y.A. Bio-mechanisms of Comorbidity: Reviewing Integrative Analyses of Multi-omics Datasets and Electronic Health Records. *Yearb Med Inform*. 2016; (1): 194–206.
30. Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofstaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I., Ivanisenko V.A. Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks. *BMC Med. Genomics*. 2018; 11 (Suppl. 1): 15. doi: 10.1186/s12920-018-0331-4
31. Saltykova I.V., Ogorodova L.M., Bragina E.Y., Puzyrev V.P., Freidin M.B. *Opisthorchis felinus* liver fluke invasion is an environmental factor modifying genetic risk of atopic bronchial asthma. *Acta Trop*. 2014; 139: 53–56. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.07.004
32. Schneider S., Hoppmann P., Koch W., Kemmner S., Schmaderer C., Renders L., Kastrati A., Laugwitz K.L., Heemann U., Baumann M. Obesity-associated hypertension is ameliorated in patients with TLR4 single nucleotide polymorphism (SNP) rs4986790.

J. Inflamm. (Lond). 2015; 12: 57. doi: 10.1186/s12950-015-0100-5

33. Schneider S., Koch W., Hoppmann P., Ubrich R., Kemmner S., Steinlechner E., Heemann U., Laugwitz K.L., Kastrati A., Baumann M. Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with age-dependent systolic blood pressure increase in patients with coronary artery disease. *Immun. Ageing*. 2015; 12: 4. doi: 10.1186/s12979-015-0031-2

34. Simpson J.L., Grissell T.V., Douwes J., Scott R.J., Boyle M.J., Gibson P.G. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax*. 2007; 62 (3): 211–218. doi: 10.1136/thx.2006.061358

35. Sinnwell J.P., Schaid D.J. Haplo.stats: Statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous. R package version 1.7.9. 2018; <https://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>.

36. Sprague A.H., Khalil R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 78 (6): 539–552. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029

37. Su X., Ren Y., Li M., Zhao X., Kong L., Kang J. Prevalence of comorbidities in asthma and nonasthma patients: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95 (22): e3459. doi: 10.1097/MD.0000000000003459

38. Wang N., Akey J.M., Zhang K., Chakraborty R., Jin L. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71 (5): 1227–1234. doi: 10.1086/344398

39. Weatherburn C.J., Guthrie B., Mercer S.W., Morales D.R. Comorbidities in adults with asthma: Population-based cross-sectional analysis of 1.4 million adults in Scotland. *Clin. Exp. Allergy*. 2017; 47 (10): 1246–1252. doi: 10.1111/cea.12971

40. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 2012; 18 (5): 716–725. doi: 10.1038/nm.2678

41. Zhang Q., Qian F.H., Zhou L.F., Wei G.Z., Jin G.F., Bai J.L., Yin K.S. Polymorphisms in toll-like receptor 4 gene are associated with asthma severity but not susceptibility in a Chinese Han population. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2011; 21 (5): 370–377.

Сведения об авторах:

Брагина Е.Ю., к.б.н., ORCID: 0000-0002-1103-3073, e-mail: elena.bragina72@gmail.com

Гончарова И.А., к.б.н., ORCID: 0000-0002-9527-7015, e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Фрейдин М.Б., д.б.н., ORCID: 0000-0002-1439-6259, e-mail: mfreidin@medgenetics.ru

Жалсанова И.Ж., ORCID: 0000-0001-6848-7749, e-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Гомбоева Д.Е., ORCID: 0000-0002-7882-2093, e-mail: gomboeva.densema@medgenetics.ru

Немеров Е.В., к.м.н., e-mail: nemerevg@mail.ru

Пузырев В.П., академик РАН, проф., ORCID: 0000-0002-2113-4556, e-mail: p.valery@medgenetics.ru

Information about authors:

Bragina E.Yu., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1103-3073,

e-mail: elena.bragina72@gmail.com

Goncharova I.A., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-9527-7015,

e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Freidin M.B., doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1439-6259, e-mail: mfreidin@medgenetics.ru

Zhalsanova I.Zh., ORCID: 0000-0001-6848-7749, e-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Gomboeva D.E., ORCID: 0000-0002-7882-2093, e-mail: gomboeva.densema@medgenetics.ru

Nemerov E.V., candidate of medical sciences, e-mail: nemerevg@mail.ru

Puzyrev V.P., academician of RAS, professor, ORCID: 0000-0002-2113-4556, e-mail: p.valery@medgenetics.ru

РЕЧЕВАЯ РЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ОРГАНОВ ПОЛОСТИ РТА И РОТОГЛОТКИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Елена Александровна КРАСАВИНА, Лидия Николаевна БАЛАЦКАЯ,
Евгений Лхаматсыренович ЧОЙНЗОНОВ, Денис Евгеньевич КУЛЬБАКИН

*НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5*

Целью нашего исследования является улучшение качества жизни больных после хирургического этапа комбинированного лечения рака органов полости рта и ротоглотки. **Материал и методы.** Изучены результаты речевой реабилитации 50 больных раком органов полости рта и ротоглотки II–III стадии опухолевого процесса, которым выполнено хирургическое вмешательство в объеме резекции ½ языка. Возраст пациентов варьировал от 33 до 70 лет, из них 37 человек (74 %) – наиболее трудоспособного возраста до 60 лет. Все больные получали комбинированное лечение и послеоперационную речевую реабилитацию в НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Реабилитационные мероприятия проводились по методике, разработанной в отделении опухолей головы и шеи НИИ онкологии. Выполнялись дыхательные упражнения, артикуляционная гимнастика для мышц щек, губ, языка, нижней челюсти и коррекция нарушений звукопроизношения. Состояние речевой функции оценивалось до и после реабилитации с использованием речевого материала, который содержал текст со смысловой нагрузкой, отдельные слова, слоги и бессмысленный набор звуков. **Результаты и их обсуждение.** В послеоперационном периоде у всех пациентов наблюдалось резкое ограничение подвижности культи языка, очень низкая разборчивость речи, отмечалось нарушение произношения звуков, полное или частичное отсутствие интонационного рисунка, замедление темпа речи. Проведение послеоперационной речевой реабилитации, основанной на увеличении подвижности культи языка и коррекции звукопроизношения, позволило в срок от 5 до 30 (медиана 22,1) дней улучшить состояние речевой функции путем восстановления произношения: заднеязычных звуков [К; Кь; Г; Гь] – в 78–94 %, переднеязычных [Т; Ть; Д; Дь] – в 74–80 %, свистящих [С, Сь] – в 56 % случаев. На основе проведенного исследования авторы делают вывод, о том, что всем больным раком органов полости рта и ротоглотки после хирургического этапа лечения для улучшения состояния речевой функции необходимо проведение речевой реабилитации с учетом объема операции, возникших нарушений и индивидуальных особенностей пациента.

Ключевые слова: рак органов полости рта и ротоглотки, нарушения речевой функции, речевая реабилитация, качество жизни.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Красавина Е.А., e-mail: krasavinaea@mail2000.ru

Для цитирования: Красавина Е.А., Балацкая Л.Н., Чойнзонов Е.Л., Кульбакин Д.Е. Речевая реабилитация больных раком органов полости рта и ротоглотки после хирургического лечения. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39 (6): 65–69. doi: 10.15372/SSMJ20190608

VOICE REHABILITATION AFTER SURGERY FOR ORAL AND OROPHARYNGEAL CANCER

Elena Aleksandrovna KRASAVINA, Lidiya Nikolaevna BALATSKAYA,
Evgeniy Lkhamatsyrenovich CHOYNZONOV, Denis Evgenievich KULBAKIN

*Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of RAS
634009, Tomsk, 5, Kooperativny ln., 5*

The purpose of our study was to improve the quality of life of patients after surgery for oral and oropharyngeal cancer. **Material and methods.** Voice rehabilitation outcomes in 50 patients with stage II-III oral and oropharyngeal cancer were studied. All patients underwent resection of ½ of the tongue. The patients were aged between 33 and 70 years, 70 % of them were up to 60 years. All patients received combined modality treatment and postoperative voice rehabilitation in Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of RAS. The technique of voice rehabilitation included breathing exercises, articulation gymnastics for the muscles of the cheeks, lips, tongue, lower jaw and correction

of disturbances in sound pronunciation. A speech function was assessed before and after rehabilitation using speech material that contained a text with semantic load, individual words, syllables and a meaningless set of sounds. **Results and discussion.** In the postoperative period, all patients experienced a sharp restriction of the mobility of the stump of the tongue, very low speech intelligibility, violation of the pronunciation of sounds, complete or partial absence of intonation pattern, and slowdown in the rate of speech. Postoperative voice rehabilitation aimed at increasing the mobility of tongue stump and correcting sound pronunciation made it possible to improve speech function in the period from 5 to 30 days (median 22.1) by restoring the pronunciation of the velar sounds [K, G] in 78–94 % of cases, alveolar sounds [T, D] in 74–80 %, and whistling sound [C] in 56 % of cases. Based on the study, the authors conclude that speech rehabilitation is required for all patients, who underwent surgery for oral and oropharyngeal cancer, taking into account the extent of surgery and individual characteristics of the patients.

Key words: oral and oropharyngeal cancer, impaired speech function, voice rehabilitation, quality of life.

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

Correspondence author: Krasavina E.A., e-mail: krasavinaea@mail2000.ru

Citation: Krasavina E.A., Balatskaya L.N., Choznzonov E.L., Kulbakin D.E. Voice rehabilitation after surgery for oral and oropharyngeal cancer. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 65–69. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190608

За десятилетие, с 2006 по 2016 г., увеличение заболеваемости злокачественными новообразованиями полости рта и ротоглотки составило 35,08 % [2]. До 70 % больных с данной патологией обращаются за специализированным лечением с местно-распространенным процессом, когда им показано комбинированное лечение с хирургическим компонентом [1, 3, 7, 8]. При оперативных вмешательствах на полости рта и ротоглотки удаляются значительные объемы тканей, что сопровождается повреждениями анатомических структур с последующим нарушением речевой функции, актов жевания и глотания пищи. Деформация периферического речевого аппарата приводит к послеоперационной дизартрии, которая проявляется в нарушении звукопроизношения и изменении акустики звучной речи. При этом страдают такие качественные характеристики речи, как темп, выразительность, плавность, модуляция [3–5, 7, 10].

Качество жизни больных данной категории во многом зависит от того, насколько успешно прошел процесс восстановления нарушенных функций. Пациент может считать себя здоровым в том случае, если после проведенного комбинированного лечения он остается способным к нормальной жизни и трудовой деятельности, что особенно актуально для больных раком полости рта и ротоглотки, учитывая значение речевого общения в жизни человека. Речевая реабилитация дает человеку возможность свободно общаться, вернуться к прежнему социальному статусу и продолжить трудовую деятельность [6, 9, 11, 12].

Цель исследования – улучшение качества жизни больных после хирургического этапа комбинированного лечения рака органов полости рта и ротоглотки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 50 больных после органосохраняющих операций органов полости рта и ротоглотки, проходившие комбинированное лечение в НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. По локализации опухолевого процесса больные распределились следующим образом: рак языка – 29 (58 %), рак слизистой оболочки дна полости рта – 21 (42 %), II–III стадии опухолевого процесса. Мужчин было 26 (52 %), женщин – 24 (48 %), возраст варьировал от 33 до 70 лет, 74 % составили пациенты до 60 лет.

Выполнен следующий объем хирургического лечения: резекция 1/2 языка – 24 (48 %) пациентам; резекция 1/2 языка, мышц дна полости рта с резекцией тела и ветви нижней челюсти с сохранением ее непрерывности – 26 (52 %) пациентам. Всем больным одновременно с операцией на полости рта выполнялась лимфодиссекция шеи с одной или двух сторон.

В отделении опухолей головы и шеи НИИ онкологии для восстановления речевой функции пациентов после органосохраняющих операций органов полости рта и ротоглотки применяется методика, основанная на использовании стереотипа звукообразования, который существовал до операции. Для активизации движений сохранившихся мышц опираются на фантомные ощущения оставшейся части языка. Методика включает в себя четыре этапа:

- 1-й этап – рациональная психотерапия;
- 2-й этап – дыхательные упражнения;
- 3-й этап – артикуляционная гимнастика для мышц щек, губ, языка и нижней челюсти;
- 4-й этап – коррекция нарушений звукопроизношения.

Оценка качества речи выполнялась на основе субъективного метода восприятия устной речи (оценка логопеда). Речевой материал включал все фонемы русского языка, стоящие в различных позициях, большое количество сонорных звуков для оценки назальности речи и содержал как текст со смысловой нагрузкой, так и отдельные слова, слоги и бессмысленный набор звуков. Тестирование проводилось в начале и после окончания речевой реабилитации.

Абсолютными противопоказаниями для проведения речевой реабилитации являлись признаки прогрессирования опухолевого процесса (метастазирование в регионарные лимфатические узлы шеи, продолженный рост опухоли), орофарингостома, фарингосвищи, диастаз швов, некроз культи языка, остеомиелит, психические заболевания с расстройствами поведения. Относительными противопоказаниями служили наличие трахеостомы, инсульт и/или инфаркт миокарда в анамнезе менее 6 мес., снижение слуха.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Логовосстановительную терапию начинали в ранний послеоперационный период на 10–12-е сутки после операции, после снятия швов и удаления носо-пищеводного зонда. Возможность ее начала обсуждалась совместно хирургом-онкологом и логопедом, при необходимости назначалась консультация психолога или психотерапевта.

Для оценки возникших в результате хирургического лечения нарушений речевой функции и планирования тактики логопедических занятий на первом занятии обследовалось качество речи пациента. Индивидуально для каждого больного составлялся план проведения реабилитационных мероприятий в зависимости от общего состояния, объема оперативного вмешательства, возраста, нервно-психического состояния. Соблюдались основные принципы реабилитации: раннее начало логовосстановительной терапии, непрерывность, преемственность, этапность, комплексный характер, переход от простого к сложному.

На первом этапе логовосстановительной терапии логопед проводил беседу с больным о возможности восстановления речевой функции, объяснял в доступной форме возможности коррекции возникших нарушений, принципы, правильность выполнения упражнений и порядок их проведения, настраивал пациента на сотрудничество и взаимную заинтересованность в эффективности терапии (занятия должны быть осознанными). Психотерапевтическая направленность осуществлялась на протяжении всего периода восстановления речевой функции. На втором

этапе предлагалось выполнять несложные дыхательные упражнения для овладения ротовым выдохом с правильно направленной воздушной струей, выработка которой является одним из необходимых и значимых условий коррекции звукопроизношения.

После этого приступали к упражнениям, активизирующим мимические и артикуляционные мышцы: движения губ, культи языка и нижней челюсти. Занятия проводили только перед большим зеркалом, чтобы пациент видел и себя, и логопеда. Начинали с выполнения 3–4 упражнений на каждую группу мышц, ежедневно проверяли правильность выполнения и добавляли следующие упражнения, при необходимости корректировали нагрузку. У каждого пациента подбирали индивидуальный набор упражнений, основанный на возникших нарушениях, общем состоянии, объеме оперативного вмешательства и возможности выполнения упражнений.

Недостаточно отработать целесообразные движения, нужно научить больного правильно и качественно применять соответствующие упражнения. Необходимо выработать следующие качества: точность движений, плавность, темп, силу, постепенность перехода от одного движения к другому. Точность оценивают конечным местоположением и формой органа. Плавность предполагает движения без толчков, подергиваний, дрожания органа. Темп – вначале движение производится несколько замедленно, логопед регулирует темп при помощи счета вслух. Переход от одного движения к другому должен быть плавным, но достаточно быстрым.

После того как отмечалось улучшение подвижности и координация мимической мускулатуры и органов артикуляции, приступали к этапу коррекции звукопроизношения. Последовательность коррекции звуков определялась индивидуально для каждого больного и осуществлялась согласно принятым в логопедии нормам: постановка изолированного звука; автоматизация в слогах, словах, предложениях; ввод звука в повседневную речь. Пациент занимался ежедневно: 1 раз в день с логопедом и 2–3 раза самостоятельно по 7–10 мин. В последующем, когда очищалась послеоперационная рана и уменьшался отек культи языка, время занятий увеличивали до 10–12 мин, они носили более интенсивный характер, но при этом учитывали общее состояние пациента. Каждое упражнение выполняли 5–7 раз подряд, удерживая заданное положение на счет до пяти. При переходе к этапу коррекции звукопроизношения длительность занятия увеличивалась до 25–30 мин.

В результате логовосстановительной терапии у всех пациентов (100 %) отмечалось увеличение объема подвижности культи языка, улучшение координации движений губ, щек и нижней челюсти. При оценке логопедом: речь стала более внятной, интонированной, разборчивой на слух. Поставлены, автоматизированы и вошли в речь звуки: [К] у 46 больных (92 %), [Кь] – у 42 (84 %), [Г] – у 47 (94 %), [Гь] – у 39 (78 %), [Т] – у 37 (74 %), [Ть] – у 37 (74 %), [Д] – у 40 (80 %), [Дь] – у 37 (74 %), [С] – у 28 (56 %), [Сь] – у 28 (56 %). Длительность курса логовосстановительной терапии составила от 5 до 30 (медиана 22,1) дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, больным раком полости рта и ротоглотки после хирургического лечения необходимо выполнение речевой реабилитации в раннем послеоперационном периоде для улучшения состояния речевой функции. Проведение логовосстановительной терапии, основанной на компенсаторных возможностях органов артикуляции с учетом общего состояния больного и объема оперативного вмешательства, позволило в большинстве случаев скорректировать произнесение отдельных звуков. Полное восстановление речи не достигнуто, однако во всех случаях удавалось добиться улучшений состояния речевой функции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасименко Н.В. Реабилитация онкологических больных. М.: Медицина, 1988. 270 с.
Gerasimenko N.V. Rehabilitation of cancer patients. Moscow: Meditsina, 1988. 270 p. [In Russian].
2. Каприн А.В., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2018. 250 с.
Kaprin A.V., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2016 (incidence and mortality). Moscow, 2018. 250 p. [In Russian].
3. Красавина Е.А., Балацкая Л.Н., Чойнзонов Е.Л. Речевая реабилитация больных раком орофарингеальной области после хирургического этапа комбинированного лечения. *Здравоохр. Рос. Федерации*. 2015; 59 (4): 33–37.
Krasavina E.A., Balatskaya L.N., Choinzonov E.L. The speech rehabilitation of patients with cancer of oro-pharyngeal area after surgical stage of combined treatment. *Zdravookhraneniye Rossiyskoy Federatsii = Health Care of the Russian Federation*. 2015; 59 (4): 33–37. [In Russian].
4. Кулаков А.А., Чучков В.М., Матякин Е.Г., Романов И.С., Ахундов А.А., Мудунов А.М., Федотенко С.П., Федотов Н.Н., Подвязычников С.О., Кропотов М.А., Жарков О.А., Чижова А.В., Чучков М.В. Восстановление звукообразования и речи у онкологических больных с дефектами верхней челюсти. *Опухоли головы и шеи*. 2012; (1): 55–60.
Kulakov A.A., Chuchkov V.M., Matyakin E.G., Romanov I.S., Akhundov A.A., Mudunov A.M., Fedotenko S.P., Fedotov N.N., Podvyaznikov S.O., Kropotov M.A., Zharkov O.A., Chizhova A.V., Chuchkov M.V. Phonation and speech recovery in cancer patients with maxillary defects. *Opukholi golovy i shei = Head and Neck Tumors*. 2012; (1): 55–60. [In Russian].
5. Письменный В.И., Кулакова Н.М., Письменный И.В. Логопедическая помощь после хирургического лечения злокачественных опухолей орофарингеальной зоны. *Изв. Самар. науч. центра РАН*. 2015; 17 (2): 622–627.
Pis'mennyi V.I., Kulakova N.M., Pis'mennyi I.V. The logopedic help after surgical treatment the malignant tumours of oropharyngeal zone. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2015; 17 (2): 622–627. [In Russian].
6. Светицкий П.В., Аединова И.В., Волкова В.Л., Нистратов Г.П., Зыкова Т.А., Богомолова О.А. Разработка операции и прогнозирование ее результатов у больных раком полости рта и ротоглотки. *Международ. журн. прикл. и фундам. исследований*. 2016; 7 (4): 572–574.
Svetitskiy P.V., Aedinova I.V., Volkova V.L., Nistratov G.P., Zyкова T.A., Bogomolova O.A. Development of operations and forecasting its results in patients with cancer of the oral cavity and oropharynx. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Basic Research*. 2016; 7 (4): 572–574. [In Russian].
7. Седаков И.Е., Семикоз Н.Г., Чистяков А.А., Степанов А.И., Олендарь Е.М. Современные аспекты лечения больных со злокачественными новообразованиями орофарингеальной зоны. *Новообразование*. 2018; 10 (4): 146–150. doi: 10.26435/neoplasm.v10i4.262
Sedakov I.E., Semikoz N.G., Chistyakov A.A., Stepanov A.I., Olendar' E.M. Modern aspects of the treatment of patients with malignant neoplasms of the oropharyngeal zone. *Novoobrazovanie = Neoplasm*. 2018; 10 (4): 146–150. [In Russian]. doi: 10.26435/neoplasm.v10i4.262
8. Чойнзонов Е.Л., Новиков В.А., Перельмутер В.М., Балацкая Л.Н., Мухамедов М.Р., Клишо Е.В., Сыркашев В.А., Авдеенко М.В. Достижения современной онкологии в лечении злокачественных опухолей головы и шеи. *Бюл. СО РАМН*. 2012; 32 (1): 81–85.
Choinzonov E.L., Novikov V.A., Perel'muter V.M., Balatskaya L.N., Mukhamedov M.R., Klisho E.V.,

Syrkashev V.A., Avdeenko M.V. Advances of current oncology in the treatment of malignant head and neck tumors. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2012; 32 (1): 81–85. [In Russian].

9. Dwivedi R.C., Kazi R.A., Agrawal N., Nutting C.M., Clarke P.M., Kerawala C.J., Harrington K.J. Evaluation of speech outcomes following treatment of oral and oropharyngeal cancers. *Cancer Treat. Rev.* 2009; 35 (5): 417–424. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.04.013

10. Dwivedi R.C., St Rose S., Chisholm E.J., Clarke P.M., Kerawala C.J., Nutting C.M., Rhys-Evans P.H., Kazi R., Harrington K.J. Acoustic parameters of speech: Lack of correlation with perceptual

and questionnaire-based speech evaluation in patients with oral and oropharyngeal cancer treated with primary surgery. *Head Neck*. 2016; 38 (5): 670–676. doi: 10.1002/hed.23956

11. Constantinescu G., Rieger J.M. Speech deficits associated with oral and oropharyngeal carcinomas. *Clinical Care and Rehabilitation in Head and Neck Cancer*. 2019; 265–279. doi: 10.1007/978-3-030-04702-3_16

12. Webster K.T., Tippet D., Simpson M., Abrams R., Pietsch K., Herbert R.J., Eisele D.W., Gourin C.G. Speech-language pathology care and short- and long-term outcomes of oropharyngeal cancer treatment in the elderly. *Laryngoscope*. 2018; 128 (6): 1403–1411. doi: 10.1002/lary.26950

Сведения об авторах:

Красавина Е.А., к.б.н., ORCID: 0000-0002-8553-7039, e-mail: krasavinaea@mail2000.ru

Балацкая Л.Н., д.б.н., ORCID: 0000-0002-2606-661X, e-mail: balatskaya@oncology.tomsk.ru

Чойнзон Е.Л., д.м.н., проф., академик РАН, ORCID: 0000-0002-3651-0665, e-mail: info@tnimc.ru

Кульбакин Д.Е., к.м.н., ORCID: 0000-0003-3089-5047, e-mail: kulbakin_d@mail.ru

Information about authors:

Krasavina E.A., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-8553-7039, e-mail: krasavinaea@mail2000.ru

Balatskaya L.N., doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2606-661X, e-mail: balatskaya@oncology.tomsk.ru

Choynzonov E.L., doctor of medical sciences, professor, academician of the RAS, ORCID: 0000-0002-3651-0665, e-mail: info@tnimc.ru

Kulbakin D.E., candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-3089-5047, e-mail: kulbakin_d@mail.ru

«ХРУПКОСТЬ» У ПАЦИЕНТОВ СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ КАК ПРЕДИКТОР ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЯМЫМИ ПЕРОРАЛЬНЫМИ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ

Мария Александровна ГАБИТОВА, Павел Михайлович КРУПЕНИН,
Анастасия Андреевна СОКОЛОВА, Дмитрий Александрович НАПАЛКОВ,
Виктор Викторович ФОМИН

Первый Московский государственный медицинский университет

им. И.М. Сеченова Минздрава России

119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Цель исследования – оценить вклад выраженности старческой астении в развитие геморрагических осложнений у пациентов старше 75 лет с фибрилляцией предсердий (ФП) на фоне терапии прямыми пероральными антикоагулянтами (ПОАК). **Материал и методы.** В исследование включено 102 пациента с ФП ≥ 75 лет, принимавшие дабигатран, апиксабан или ривароксабан в полной или сниженной дозировках в соответствии с рекомендациями и не имевшие дополнительных факторов риска кровотечений (двойной или тройной антитромботической терапии, недавно перенесенных оперативных вмешательств). Если препарат был назначен ранее, анализировался период приема ПОАК с момента достижения пациентом 75 лет. Регистрировались геморрагические события, развившиеся в течение первых 18 месяцев приема ПОАК. Оценка индекса «хрупкости» проводилась на этапе включения в исследование с использованием адаптированной шкалы Rockwood. **Результаты и их обсуждение.** За анализируемый период суммарно зафиксировано 19 малых геморрагических событий, не потребовавших госпитализации или отмены ПОАК. Пациенты, перенесшие кровотечения, и больные без геморрагических событий достоверно различались только по величине индекса «хрупкости» ($p = 0,001$). Различия по сопутствующей патологии, входящей в шкалу оценки индекса «хрупкости», были статистически незначимы. Средний возраст пациентов, перенесших и не перенесших кровотечения, значимо не различался ($p = 0,12$). В дальнейшем возможно продолжить исследование с применением нескольких шкал оценки выраженности индекса «хрупкости». Таким образом, индекс «хрупкости» у пациентов ≥ 75 лет с ФП, принимающих ПОАК, обладает предсказательной значимостью для оценки риска кровотечений.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, пациенты старческого возраста, индекс «хрупкости», прямые пероральные антикоагулянты, кровотечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Габитова М.А., e-mail: mariia_gabitova91@mail.ru

Для цитирования: Габитова М.А., Крупенин П.М., Соколова А.А., Напалков Д.А., Фомин В.В. «Хрупкость» у пациентов старческого возраста с фибрилляцией предсердий как предиктор геморрагических осложнений на фоне лечения прямыми пероральными антикоагулянтами. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 70–76. doi: 10.15372/SSMJ20190609

«FRAGILITY» AS A PREDICTOR OF BLEEDINGS IN ELDERLY PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION TAKING DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS

Mariya Aleksandrovna GABITOVA, Pavel Mikhaylovich KRUPENIN,
Anastasiya Andreevna SOKOLOVA, Dmitriy Aleksandrovich NAPALKOV,
Viktor Viktorovich FOMIN

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

119991, Moscow, Trubetskaya st., 8-2

The purpose of the study is to assess the contribution of senile asthenia level to hemorrhagic complications quantity in elderly patients with atrial fibrillation (AF) taking direct oral anticoagulants (DOAC). **Material and methods.** Elderly patients ≥ 75 y.o. with AF taking dabigatran, apixaban or rivaroxaban in full or reduced dosages and without special features of bleeding (such as double and triple antithrombotic therapy) were included in the study. If a patient was

under anticoagulants before the study (but not earlier than one became 75 y.o.), this experience was also analyzed. All bleedings during the first 18 months of anticoagulating were taken in mind. Patients in different DOAC groups were comparable in age and concomitant pathology. The «fragility» index was evaluated at the stage of inclusion in the study; an adapted Rockwood scale was used. **Results and discussion.** 102 patients with AF ≥ 75 y.o. taking dabigatran, apixaban or rivaroxaban in dosages corresponding to the instructions were included in the study. During the analyzed period, 19 small clinically significant hemorrhagic events that did not require hospitalization or cancellation of DOAC were recorded. Patients with and without bleeding in anamnesis were significantly differed only by «fragility» index score ($p = 0,001$). The differences between concomitant pathology level which are mentioned in scale, is also not statistically significant. The average age of patients with and without bleeding anamnesis was not also significantly different ($p = 0,12$). In the future, it is advisable to continue the study using several scales for assessing the severity of the «fragility» index. Thus, it is advisable to calculate the «fragility» index in patients ≥ 75 years of age with AF taking DOAC.

Key words: atrial fibrillation, elderly patients, «fragility» index, direct oral anticoagulants, bleedings.

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

Correspondence author: Gabitova M.A., e-mail: mariia_gabitova91@mail.ru

Citation: Gabitova M.A., Krupenin P.M., Sokolova A.A., Napalkov D.A., Fomin V.V. «Fragility» as a predictor of bleedings in elderly patients with atrial fibrillation taking direct oral anticoagulants. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 70–76. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190609

Фибрилляцию предсердий (ФП) считают одним из наиболее распространенных среди пожилого населения нарушением ритма сердца: в возрастной подгруппе ≥ 75 лет она определяется у 5–15 % обследуемых [1], причем чем старше пациент, тем больше вероятность обнаружить аритмию [1, 9]. Помимо нарушения ритма, пожилые пациенты имеют большой объем сопутствующих заболеваний, способных как усугубить течение аритмии, так и осложнить обязательную в этом случае антикоагулянтную терапию [14]. С одной стороны, пациенты ≥ 75 лет имеют высокий риск вероятного возникновения ишемических событий в соответствии со шкалой ишемического риска CHA₂DS₂-VASc [5], что обязывает врача назначать антикоагулянтную терапию. С другой стороны, учитывая коморбидность пациентов старческого возраста [14], повышается и риск геморрагических осложнений на фоне приема антикоагулянтов, что зачастую служит поводом для их неназначения [8]. Тем важнее становится проблема грамотного применения препаратов данного класса: исключения ситуаций, когда пациент по собственному желанию отменяет и возобновляет прием антикоагулянтов или забывает о приеме препарата [6].

Среди имеющихся на рынке лекарственных средств в последние годы предпочтение все чаще отдается прямым пероральным антикоагулянтам (ПОАК): дабигатрану, аписабану и ривароксабану. В отличие от антагонистов витамина К (АВК) (чаще всего речь идет о варфарине), прием ПОАК не требует постоянного лабораторного контроля, который привязывает больного к лечебному учреждению; кроме того, их назначение не вынуж-

дает пациента соблюдать специфическую диету. Оба эти аргумента идут на пользу и врачу, и больному: возрастающая приверженность к терапии уменьшает риск геморрагических событий. Однако часто пациентам старческого возраста даже для регулярного приема препаратов требуется посторонняя помощь. Речь идет не только о людях с инвалидностью или выраженными мнестическими нарушениями (деменцией и болезнью Альцгеймера).

В последнее время в литературе, посвященной неблагоприятным исходам или повторным госпитализациям пациентов пожилого и старческого возраста, все чаще упоминается синдром старческой астении («хрупкости») [12]. Его выраженность зависит от физических способностей больного, психоэмоционального статуса, наличия и количества сопутствующей патологии, а также этнической принадлежности и пола [4]. Это понятие отражает степень физического угасания человека, демонстрирует его возможность (или невозможность) обходиться в быту без посторонней помощи [3]. Помимо этого, из данных литературы следует, что ФП способна усугублять интенсивность отдельных проявлений синдрома «хрупкости» [11], а пациенты с выраженной старческой астенией имеют более высокий риск геморрагических и ишемических осложнений [10]. Таким образом, становится очевидной необходимость проведения комплексной оценки степени выраженности синдрома старческой астении путем расчета индекса «хрупкости» для определения группы пациентов с более высоким геморрагическим риском среди пациентов ≥ 75 лет с ФП, принимающих ПОАК.

Цель работы – оценить вклад выраженности старческой астении в развитие геморрагических осложнений у пациентов 75 лет и старше с ФП на фоне терапии ПОАК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие пациенты ≥ 75 лет с ФП неклапанной этиологии, получавшие один из трех ПОАК (дабигатран, апиксабан или ривароксабан) в полной или сниженной дозировках. Все больные подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Коррекция дозировки проводилась в соответствии с инструкцией по применению препарата. Кроме проспективной части работы, учитывался предшествующий включению в исследование опыт приема антикоагулянта от момента достижения пациентом указанного возраста. Не включались больные, получавшие двойную и тройную антитромботическую терапию, а также изначально имевшие более высокий, по сравне-

нию с общим для группы, риск геморрагических событий (перенесшие оперативное вмешательство и/или клинически значимое кровотечение менее чем за 6 месяцев до включения в анализ, страдающие хронической болезнью почек 4-й и 5-й стадий). Пациенты исключались из исследования в случае наступления ишемического или геморрагического инсульта, а также их отказа от дальнейшего наблюдения или неспособности выполнять протокол. Анализировались геморрагические события, состоявшиеся в группах, получавших разные ПОАК, в течение первых 18 месяцев приема антикоагулянтной терапии.

Расчет индекса «хрупкости» проводился на этапе включения пациентов в исследование; применялась адаптированная нами шкала Rockwood [13], включавшая 33 вопроса, в том числе о наличии у пациента сопутствующей патологии, его психоэмоциональном состоянии и физических возможностях, определяющих самообслуживание в быту (табл. 1). Результат принимал любые значения от 0 до 1, где 0 означал полное отсут-

Таблица 1. Адаптированная шкала оценки индекса «хрупкости» по Rockwood

Table 1. Adapted «fragility» rating scale

| № вопроса | Дефицит | Оценка | Количество баллов |
|-----------|---------------------------------|---------------------------|-------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | Помощь при принятии ванны | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 2 | Помощь при одевании | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 3 | Помощь при вставании с кресла | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 4 | Помощь при прогулке вокруг дома | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 5 | Помощь при принятии пищи | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 6 | Помощь при умывании | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 7 | Помощь при походе в туалет | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 8 | Помощь при ходьбе по лестнице | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 9 | Помощь при подъеме груза 5 кг | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 10 | Помощь при походе за покупками | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 11 | Помощь при работе по дому | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 12 | Помощь при приготовлении пищи | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 13 | Помощь при принятии лекарств | Требуется Не требуется | 1 0 |
| 14 | Помощь в вопросах финансов | Требуется Не требуется | 1 0 |

Окончание табл. 1

End of Table 1

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----|---|---|-------------------------------|
| 15 | Потеря в весе ≥ 5 кг за последний год | Да Нет | 1 0 |
| 16 | Вынужденный постельный режим более половины дня (последний месяц) | Да Нет | 1 0 |
| 17 | Снижение повседневной активности (последний месяц) | Да Нет | 1 0 |
| 18 | Оценка своего здоровья пациентом | Плохое Относительно плохое Хорошее Очень хорошее Отличное | 1 0,75 0,5 0,25 0 |
| 19 | Изменение состояния здоровья за последний год | Ухудшилось Улучшилось Не изменилось | 1 0 0 |
| 20 | Прогулки на улице | <1 раза в 3 дня 1 раз в 3 дня и чаще | 1 0 |
| 21 | Любые действия требуют усилий | Постоянно Иногда Редко | 1 0,5 0 |
| 22 | Депрессивное состояние | Постоянно Иногда Редко | 1 0,5 0 |
| 23 | Ощущение счастья | Постоянно Иногда Редко | 1 0,5 0 |
| 24 | Чувство одиночества | Постоянно Иногда Редко | 1 0,5 0 |
| 25 | Ощущение бесконечно продолжающихся трудностей | Постоянно Иногда Редко | 1 0,5 0 |
| 26 | Высокое АД | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 27 | Стенокардия | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 28 | ХСН | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 29 | Инсульт | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 30 | Опухоли | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 31 | СД | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 32 | Остеоартрит | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |
| 33 | Хронические заболевания легких | Да Может быть Нет | 1 0,5 0 |

ствии синдрома старческой астении, а 1 – его высокую выраженность. Оценка статистически значимых различий между пациентами сравниваемых групп по параметрическим показателям проводилась с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Для оценки достоверности различий между выборочными долями совокупности использовали критерий χ^2 . За критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0,05$. Корреляционный анализ совокупностей проводился с применением критерия V Крамера. Для установления соотношений между переменными применялся регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование было включено 102 пациента (39 мужчин и 63 женщины), которые принимали один из трех ПОАК в полной или сниженной дозировках (дабигатран 110 мг 2 раза/сут; аписабан 5 мг 2 раза/сут или 2,5 мг 2 раза/сут; ривароксабан 20 мг/сут или 15 мг/сут). За анализируемый период на фоне проводимой терапии зафиксировано 19 малых кровотечений, не потребовавших отмены приема ПОАК или госпитализации. Больших кровотечений отмечено не было. Распределение пациентов в зависимости от локализации кровотечений представлено на рис. 1.

По окончании периода наблюдения проведено сопоставление пациентов, перенесших кровотечения и не имевших геморрагических событий (табл. 2). Выявлено, что выраженность синдрома старческой астении была достоверно больше у пациентов с состоявшимися кровотечениями ($p = 0,001$). Для оценки предсказательной значимости индекса «хрупкости» выполнен регрессионный анализ, который показал наличие прямой зависимости между степенью выраженности синдрома старческой астении и вероятностью развития мало-

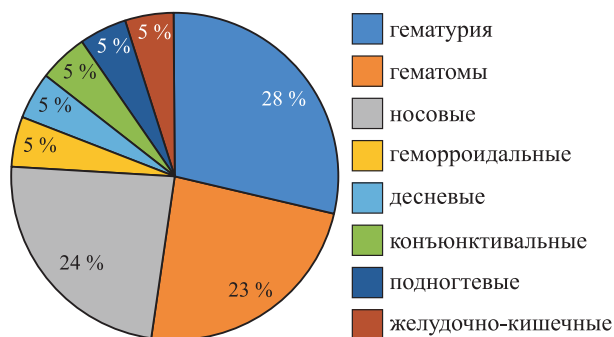


Рис. 1. Структура локализации кровотечений у пациентов ≥ 75 лет, принимавших ПОАК

Fig. 1. Bleeding localization structure in elderly patients with AF taking DOAC

Таблица 2. Характеристика пациентов ≥ 75 лет, принимавших ПОАК, перенесших и не перенесших кровотечения

Table 2. Characteristics of patients 75 years old and elderly taking DOAC with and without bleedings

| Характеристика | С кровотечениями (n = 19) | Без кровотечений (n = 83) | p |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|-------|
| Возраст | 81,3 ± 5,83 | 79,7 ± 3,64 | 0,12 |
| Индекс «хрупкости» | 0,5 ± 0,14 | 0,3 ± 0,15 | 0,001 |
| АГ, n (%) | 18 (94,74) | 79 (95,18) | 0,94 |
| ИБС, n (%) | 10 (52,63) | 31 (37,35) | 0,22 |
| ОНМК, n (%) | 3 (15,79) | 11 (13,25) | 0,77 |
| СД, n (%) | 3 (15,79) | 23 (27,71) | 0,28 |
| ХСН, n (%) | 6 (31,58) | 20 (24,1) | 0,5 |

го кровотечения: площадь под кривой составила 0,775 (рис. 2) с высоким уровнем чувствительности и специфичности.

Также проводилось сравнение пациентов в зависимости от наличия сопутствующей патологии, входящей в шкалу оценки индекса «хрупкости» Rockwood: артериальная гипертензия (АГ), ишемическая болезнь сердца (ИБС), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), сахарный диабет (СД) и хроническая сердечная недостаточность (ХСН). Наличие конкретной нозологической формы не имело достоверных корреляций с развитием кровотечения в данной группе больных, сопоставимых по среднему возрасту ($p = 0,12$).

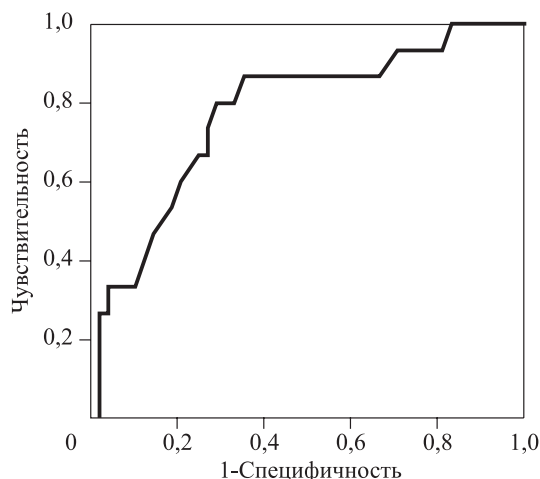


Рис. 2. Взаимосвязь степени старческой астении (индекса «хрупкости») и риска развития кровотечений (регрессионный анализ) у пациентов ≥ 75 лет, принимавших ПОАК

Fig. 2. Connection between degree of «fragility» index and the of bleeding risk (regression analysis) in elderly patients with AF taking DOAC

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами представлено моноцентровое проспективное нерандомизированное наблюдательное исследование, выполненное в популяции пациентов старческого возраста и долгожителей (возрастная характеристика приведена в соответствии с критериями ВОЗ). Наличие контрольной группы (более младшего возраста и/или без упомянутого спектра сопутствующей патологии) дизайном не предусматривалось. Пациенты, перенесшие кровотечения, и без геморрагических событий оказались сопоставимыми как по возрасту, так и по коморбидности. Об этом также свидетельствуют результаты регрессионного анализа: индекс «хрупкости» показал себя как инструмент прогнозирования малых клинически значимых кровотечений, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью.

Данные ряда исследований последних 10 лет свидетельствуют, что «хрупкие» пациенты с ФП чаще переносят геморрагические и ишемические катастрофы по сравнению со своими крепкими ровесниками [10]. Риск кровотечений у больных с высокой степенью выраженности синдрома старческой астении повышается даже несмотря на характерный для этой группы высокий уровень протромботической активности. Данные крупных исследований ONTARGET и TRANSCEND говорят о том, что у пациентов с выраженной «хрупкостью» утяжеляется течение ФП [11]. Своевременное выявление «хрупких» пациентов даст врачам возможность более тщательно подойти к их ведению и предотвратить развитие побочных эффектов антикоагулянтной терапии – кровотечений.

В нашем исследовании применялась только одна шкала оценки индекса «хрупкости» из всех представленных в литературе. Среди других часто используемых – шкала «Возраст не помеха» [2] и фенотипическая модель хрупкости по L.P. Fried [7], однако оценка индекса «хрупкости» с их помощью носит качественный характер, что дает весьма условное представление о степени выраженности синдрома. Кроме того, применение выбранной нами шкалы Rockwood не связано с проведением специальных инструментальных исследований, а перечень вопросов в анкете (не менее 30) врач может формировать самостоятельно, что упрощает ее использование. Стоит отметить, что ни одна из существующих на сегодняшний день шкал оценки индекса «хрупкости» не является валидизированной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов старческого (75 лет и старше) возраста, принимающих ПОАК, для профилактики инсульта при фибрилляции предсердий,

целесообразно проводить расчет индекса «хрупкости» по шкале Rockwood для дополнительной стратификации риска кровотечений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диагностика и лечение фибрилляции предсердий. Рекомендации РКО, ВНАО и АССХ. Национальный фонд поддержки профилактической медицины «ПРОФМЕДФОРУМ», 2012. https://scardio.ru/content/Guidelines/Rekomendations_fibrillyacia_predserdii_2012.pdf

Diagnosis and treatment of atrial fibrillation. Recommendations of Russian Cardiology Society, All-Russian Scientific Society of Specialists in Clinical Electrophysiology, Arrhythmology and Cardiac Stimulation and Association of Cardiovascular Surgeons. National Foundation for the Support of Preventive Medicine «PROFMEDFORUM», 2012. https://scardio.ru/content/Guidelines/Rekomendations_fibrillyacia_predserdii_2012.pdf [In Russian].

2. Ткачева О.Н., Рунихина Н.К., Остапенко В.С., Шарашкина Н.В., Мхитарян Э.А., Онучина Ю.С., Лысенков С.Н. Валидация опросника для скрининга синдрома старческой астении в амбулаторной практике. *Успехи геронтологии*. 2017; 30 (2): 236–242.

Tkacheva O.N., Runikhina N.K., Ostapenko V.S., Sharashkina N.V., Mkhitaryan E.A., Onuchina Yu.S., Lysenkov S.N. Validation of the questionnaire for screening frailty. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*. 2017; 30 (2): 236–242. [In Russian].

3. Campbell A.J., Buchner D.M. Unstable disability and the fluctuations of frailty. *Age Ageing*. 1997; 26: 315–318. doi: 10.1093/ageing/26.4.315

4. Collard R.M., Boter H., Schoevers R.A., Oude Voshaar R.C. Prevalence of frailty in community dwelling older persons: a systematic review. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2012; 60 (8): 1487–1492. doi: 10.1111/j.15325415.2012.04054.x

5. Coppens M., Eikelboom J.W., Hart R.G., Yusuf S., Lip G.Y., Dorian P., Shestakovska O., Connolly S.J. The CHA₂DS₂-VASc score identifies those patients with atrial fibrillation and a CHADS₂ score of 1 who are unlikely to benefit from oral anticoagulant therapy. *Eur. Heart J.* 2013; 34 (3): 170–176. doi: 10.1093/eurheartj/ehs314

6. Di Pasquale G., Mathieu G., Maggioni A.P., Fabbri G., Lucci D., Vescovo G., Pirelli S., Chiarella F., Scherillo M., Gulizia M.M., Gussoni G., Colombo F., Panuccio D., Nozzoli C., Berisso M.Z. Current presentation and management of 7148 patients with atrial fibrillation in cardiology and internal medicine hospital centers: the ATA AF study. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167 (6): 2895–2903. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.07.019

7. Fried L.P., Tangen C.M., Walston J., Newman A.B., Hirsch C., Gottdiener J., Seeman T., Tracy R., Kop W.J., Burke G., McBurnie M.A. Frailty in

older adults: evidence for a phenotype. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2001; 56 (3): M146–M156. doi: 10.1093/gerona/56.3.m146

8. Fumagalli S., Nieuwlaat R., Tarantini F., de Vos C.B., Werter C.J., Le Heuzey J.Y., Marchionni N., Crijns H.J. Characteristics, management and prognosis of elderly patients in the Euro Heart Survey on atrial fibrillation. *Aging Clin. Exp. Res.* 2012; 24 (5): 517–523. doi: 10.3275/8408

9. Go A.S., Hylek E.M., Phillips K.A., Chang Y., Henault L.E., Selby J.V., Singer D.E. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 2001; 285 (18): 2370–2375. doi: 10.1001/jama.285.18.2370

10. Hubbard R.E., Andrew M.K., Rockwood K. Effect of parental age at birth on the accumulation of deficits, frailty and survival in older adults. *Age Ageing.* 2009; 38: 380–385. doi:10.1093/ageing/afp035

11. Marzona I., O'Donnell M., Teo K., Gao P., Anderson C., Bosch J., Yusuf S. Increased risk of cognitive and functional decline in patients with atrial fibrillation: results of the ONTARGET and TRANSCEND studies. *CMAJ.* 2012; 184 (6): E329–E336. doi: 10.1503/cmaj.111173

12. Rockwood K., Stadnyk K., MacKnight C., McDowell I., Hebert R., Hogan D.B. A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people. *Lancet.* 1999; 353: 205–206.

13. Searle S.D., Mitnitski A., Gahbauer E.A., Gill T.M., Rockwood K. A standard procedure for creating a frailty index. *BMC Geriatr.* 2008; 8: 24. doi: 10.1186/1471-2318-8-24

14. Vesin C., Protogerou A.D., Lieber A., Safar H., Iaria P., Ducimetiere P., Safar M.E., Blacher J. Predictive factors for all-cause mortality in the hospitalized elderly subject: the importance of arrhythmia. *Atherosclerosis.* 2009; 207 (2): 507–513. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.035

Сведения об авторах:

Габитова М.А., ORCID: 0000-0003-3299-4743, e-mail: mariia_gabitova91@mail.ru

Крупенин П.М., ORCID: 0000-0001-5203-4497, e-mail: krupeninpavel@gmail.com

Соколова А.А., к.м.н., ORCID: 0000-0001-5938-8917, e-mail: sokolovastasya@rambler.ru

Напалков Д.А., д.м.н., ORCID: 0000-0001-6241-2711, dminap@mail.ru

Фомин В.В., д.м.н., член-корр. РАН, ORCID: 0000-0002-2682-4417, e-mail: fomin@mma.ru

Information about authors:

Gabitova M.A., ORCID: 0000-0003-3299-4743, e-mail: mariia_gabitova91@mail.ru

Krupenin P.M., ORCID: 0000-0001-5203-4497, e-mail: krupeninpavel@gmail.com

Sokolova A.A., candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5938-8917, e-mail: sokolovastasya@rambler.ru

Napalkov D.A., doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6241-2711, dminap@mail.ru

Fomin V.V., doctor of medical sciences, corresponding member of RAS, ORCID: 0000-0002-2682-4417, e-mail: fomin@mma.ru

ЦИТОКИНЫ И МЕСТНОЕ ХРОНИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ БЕСПЛОДИЯ У ЖЕНЩИН ФЕРТИЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Ольга Олеговна ОБУХОВА, Александр Николаевич ТРУНОВ,
Ольга Михайловна ГОРБЕНКО, Аля Петровна ШВАЮК

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

Цель исследования – изучение особенностей содержания цитокинов в перитонеальной жидкости у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне хронических воспалительных заболеваний органов малого таза в стадии клинической ремиссии. **Материал и методы.** Проведено обследование 50 пациенток в возрасте 23–36 лет с верифицированным диагнозом бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы в стадии клинической ремиссии. В качестве группы контроля обследовано 15 практически здоровых женщин в возрасте 25–37 лет. Концентрацию цитокинов TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1 в перитонеальной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. **Результаты и их обсуждение.** В основной группе пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием в периоде клинической ремиссии хронического воспалительного процесса зарегистрирована активность местных воспалительных реакций. Это подтверждается достоверно более высоким уровнем TNF- α , IL-4, IL-6, IFN- γ , MCP-1 в перитонеальной жидкости по сравнению с группой контроля. Исследованные биологически активные вещества играют значимую роль в развитии иммунного ответа, а также фибропластических процессов. Полученные результаты можно расценивать как латентное развитие иммунного реагирования в ответ на постоянную антигенную стимуляцию из очага хронического воспаления, что является значимым фактором в развитии спаечных процессов при формировании бесплодия и требует включения в терапию методов иммуотропной терапии.

Ключевые слова: хроническое воспаление, цитокины, иммунное реагирование, бесплодие, фертильный возраст.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Автор для переписки: Обухова О.О., e-mail: trio188@yandex.ru

Для цитирования: Обухова О.О., Трунов А.Н., Горбенко О.М., Шваюк А.П. Цитокины и местное хроническое воспаление в формировании бесплодия у женщин фертильного возраста. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 77–83. doi: 10.15372/SSMJ20190610

CYTOKINES AND LOCAL CHRONIC INFLAMMATION IN THE FORMATION OF INFERTILITY IN FERTILE AGE WOMEN

Olga Olegovna OBUKHOVA, Alexandr Nikolaevich TRUNOV, Olga Mikhaylovna GORBENKO,
Alya Petrovna SHVAYUK

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

The purpose of the study was to examine the characteristics of the content of cytokines in the peritoneal fluid in women of reproductive age with infertility against the background of chronic inflammatory diseases of the pelvic organs in the stage of clinical remission. **Material and methods.** A study was conducted of 50 patients aged 23–36 years with a verified diagnosis of infertility of tubal peritoneal genesis against a background of chronic inflammatory diseases of the reproductive sphere in the stage of clinical remission. As a control group, 15 practically healthy women aged 25–37 years were examined. Concentration of cytokines TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1 in the peritoneal fluid was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results and discussion.** In the main group of patients with tubal-peritoneal infertility, the activity of local inflammatory reactions is tested in the period of clinical remission

of a chronic inflammatory process. This is confirmed by a significantly higher level of TNF- α , IL-4, IL-6, IFN- γ , MCP-1 in the peritoneal fluid compared to the control group. The studied biologically active substances play a significant role in the development of the immune response, as well as fibroplastic processes. The results can be regarded as the latent development of the immune response in reactions to constant antigenic stimulation from the focus of chronic inflammation, which is a significant factor in the development of adhesions in the formation of infertility, and requires the inclusion of immunotropic therapy methods in treatment.

Key words: chronic inflammation, cytokines, immune response, infertility, fertile age.

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

Correspondence author: Obukhova O.O., e-mail: trio188@yandex.ru

Citation: Obukhova O.O., Trunov A.N., Gorbenko O.M., Shvayuk A.P. Cytokines and local chronic inflammation in the formation of infertility in fertile age women. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 77–83. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190610

Развитие репродуктивных технологий помогает решить многие проблемы, существующие в акушерстве и гинекологии в современных условиях. Однако приходится констатировать, что на настоящем этапе распространенность и частота встречаемости бесплодия не имеют тенденции к снижению [8, 17, 22, 25, 26]. Данные, представленные в научной литературе, а также результаты собственных исследований позволили сделать заключение о том, что в патогенезе женского бесплодия значимую роль играет высокая распространенность хронических персистирующих инфекционно-воспалительных заболеваний органов репродуктивной сферы [7, 9, 13, 23, 24].

В настоящее время роль иммунных нарушений в патогенезе острых и обострений хронических инфекционно-воспалительных заболеваний репродуктивной сферы у женщин изучена достаточно хорошо. В научной литературе представлены работы, в которых показаны активность иммуновоспалительных реакций и наличие дисбаланса продукции цитокинов, а также влияние этих процессов на нарушение синтеза ряда половых гормонов, которые играют значимую роль в процессах репродукции [10, 13, 21].

Взаимоотношения в системе «мать – плод» контролируются рядом иммунологических механизмов, сохраняющих толерантность к полуаллогенному плоду и в то же время готовых активировать все необходимые звенья защиты против инфекционных агентов [1, 15]. Установлено, что в течение беременности соотношение провоспалительных и противовоспалительных цитокинов динамически изменяется. На этапе имплантации бластоцисты в матку преобладают провоспалительные цитокины, так как в ответ на ее внедрение происходит локальная активация медиаторов воспаления. Дальнейшее течение беременности характеризуется системным или местным сдвигом в сторону противовоспалительных цитокинов Т-хелперов 2 типа [18, 20]. Подобные процессы в

определенной степени подавляют реакции клеточного иммунитета. В то же время роды протекают в присутствии провоспалительных цитокинов. Развитие таких осложнений беременности, как преждевременные роды, синдром задержки роста плода, преэклампсия, часто ассоциировано с инфекцией во время беременности. Инфекционные агенты стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, ингибируя активность Т-хелперного ответа 2 типа. В ряде исследований обнаружено снижение уровня IL-4 у женщин с самопроизвольными выкидышами. Также зафиксирован низкий уровень IL-10 при спонтанных абортах [1, 2, 11, 20].

Предполагается, что вызываемое длительным дисбалансом цитокинов нарушение иммуноэндокринной регуляции при хроническом воспалении органов малого таза приводит к развитию бесплодия [3–6, 12, 15, 18, 21]. Однако у основной части женщин с воспалительными заболеваниями репродуктивной сферы период зачатия приходится на стадию клинической ремиссии. В связи с этим пациентки, даже имея длительный стаж течения хронического воспаления органов малого таза, в периоде клинической ремиссии развития заболевания не предъявляют жалоб и не обращаются за медицинской помощью. Указанное приводит к тому, что данные об иммуноэндокринных нарушениях и активности воспаления стадии ремиссии патологического процесса представлены единичными работами [7, 24, 25]. Однако именно сохранение воспалительных реакций при хроническом процессе в стадии клинической ремиссии как во многом определяет дальнейший характер развития заболевания, так и оказывает большое влияние на процессы гестации. В связи с этим особенности дисбаланса иммунных реакций при хронических воспалительных процессах требуют углубленного изучения для понимания их роли в возможном формировании бесплодия. Не вызывает сомнения, что хронические воспалитель-

ные заболевания органов малого таза у женщин репродуктивного возраста являются серьезным фактором риска развития бесплодия [1, 6, 9, 15, 17]. Все изложенные факты определяют научно-практическую значимость исследований, посвященных углубленному изучению иммунопатогенеза бесплодия у женщин репродуктивного возраста с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза в стадии клинической ремиссии.

Цель исследования – изучить особенности содержания цитокинов в перитонеальной жидкости у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне хронических воспалительных заболеваний органов малого таза в стадии клинической ремиссии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с целью исследования на базе Новосибирского городского перинатального центра было обследовано 65 женщин репродуктивного возраста. Все женщины дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании, которое соответствовало этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Основную группу составили 50 пациенток в возрасте 23–36 лет (средний возраст – $28,5 \pm 3,57$ года) с верифицированным диагнозом вторичного бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы в стадии клинической ремиссии. Длительность бесплодия составила от 4 до 13 лет (в среднем 9,7 года). Критериями включения в исследование являлись наличие диагноза вторичного бесплодия трубно-перитонеального генеза, хронического заболевания органов малого таза инфекционно-воспалительного характера в стадии ремиссии (длительность ремиссии – не менее 30 дней), отсутствие субъективных жалоб, повышения температуры тела, а также нормативные значения показателей периферической крови (содержание лейкоцитов, лейкоцитарная формула, СОЭ). Диагнозы подтверждены данными анамнеза, клиническими, лабораторными и инструментальными методами исследования.

Контрольную группу составили 15 практически здоровых женщин в возрасте 25–37 лет (средний возраст $29,5 \pm 3,2$ года) с сохраненной репродуктивной функцией. Критерии включения – наличие хотя бы одних родов в анамнезе, отсутствие в анамнезе хронических инфекционно-воспалительных заболеваний различных органов и систем, в том числе органов малого таза.

Критерием включения для обеих групп являлось отсутствие в течение трех месяцев до обследования острых воспалительных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии, критерием исключения – наличие эндокринных нарушений, а также аутоиммунных и злокачественных опухолевых процессов, способных влиять на синтез половых гормонов и оказывать влияние на функциональное состояние иммунной системы.

Забор перитонеальной жидкости проводился во время лечебно-диагностической лапароскопии. В дальнейшем, в асептических условиях, перитонеальная жидкость помещалась в стерильную вакуумную пробирку, полученные образцы хранили до исследования при -20 °С. Концентрацию цитокинов TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ в перитонеальной жидкости определяли с использованием коммерческих тест-систем для иммуноферментного анализа производства ООО «Цитокин» (Россия), содержание MCP-1 – с использованием коммерческих тест-систем производства «Вектор-Бест» (Россия) по инструкции производителя, результаты регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм.

Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна – Уитни. Данные в таблице представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего. Значимым считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем достоверной вероятности 95 % ($p < 0,05$). Оценивались коэффициенты вариации (C_v), а также минимальные (min) и максимальные (max) значения для всех показателей в группах. Условно выборка имеет слабую вариабельность при $C_v < 10$ %, среднюю – при $10 \% < C_v < 20$ % и высокую – при $C_v > 20$ %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В перитонеальной жидкости пациенток основной группы выявлено достоверное, в 1,72 раза, повышение содержания провоспалительного цитокина TNF- α по сравнению с контрольной группой (таблица). Высокие концентрации этого цитокина определяются при многих осложнениях физиологического течения беременности, что позволяет рассматривать его как неблагоприятный фактор для процессов зачатия и гестации. Кроме того, полученные данные подтверждают сделанное ранее заключение о том, что при ремиссии патологического процесса определяется активность воспалительных реакций.

В перитонеальной жидкости пациенток основной группы обнаружено статистически зна-

Таблица. Содержание цитокинов в перитонеальной жидкости обследованных женщин

Table. The content of the studied parameters peritoneal fluid of surveyed patients

| Содержание цитокина, пг/мл | Основная группа (бесплодие + ремиссия хронического воспаления), n = 50 | | | Контрольная группа (здоровые женщины), n = 15 | | |
|----------------------------|--|-------|---------|---|-------|---------|
| | M ± m | Cv, % | min–max | M ± m | Cv, % | min–max |
| TNF-α | 23,6 ± 0,9* | 32,49 | 6–20 | 13,7 ± 1,1 | 19,65 | 7–18 |
| IL-4 | 23,7 ± 1,6* | 45,27 | 8–46 | 15,7 ± 0,8 | 15,23 | 6–27 |
| IL-6 | 68,1 ± 10,9* | 35,17 | 24–88 | 19,3 ± 1,3 | 12,32 | 9–18 |
| IL-10 | 23,3 ± 3,1 | 54,05 | 17–56 | 18,5 ± 2,6 | 15,22 | 15–35 |
| IFN-γ | 94,2 ± 8,1* | 52,28 | 38–180 | 20,8 ± 1,9 | 12,44 | 8–36 |
| MCP-1 | 394,6 ± 62,1* | 43,21 | 120–562 | 148,2 ± 3,1 | 9,54 | 86–234 |

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

чимое (в 4,52 раза) повышение содержания IFN-γ относительно данных, полученных в группе сравнения (см. таблицу). IFN-γ является важнейшим эндогенным иммуномодулятором, который необходим для развития специфического иммунного реагирования. Будучи продуктом Т-хелперов 1 типа, он вместе с другими провоспалительными цитокинами активирует макрофаги, цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллеры, подавляет активность В-лимфоцитов, активизирует простагландиную и кортикостероидную системы. Все эти факторы усиливают фагоцитарные и цитотоксические реакции в зоне очага воспаления. Вместе с тем на поздних стадиях острого воспаления и при хронических воспалительных реакциях IFN-γ усиливает секрецию антител, в том числе аутореактивных. Высокие концентрации IFN-γ определяются при многих осложнениях физиологического течения беременности, что также рассматривается как неблагоприятный фактор для процессов зачатия и гестации [1, 3, 13]. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что при ремиссии патологического процесса определяется активация индуцибельной фазы иммунного реагирования в ответ на антигенную стимуляцию.

Определение содержания в перитонеальной жидкости индуктора гуморального звена иммунной системы IL-4, активация которого характерна, в том числе, для инфекций бактериальной этиологии, у обследованных пациенток основной группы выявило его достоверное (в 1,51 раза) нарастание относительно значений изучаемого показателя в группе сравнения (см. таблицу). Выявленную закономерность можно расценивать как реакцию иммунной системы, направленную на стимуляцию синтеза антител и развитие гуморального иммунного ответа на персистенцию возбудителей патологического процесса из оча-

га хронического воспаления. Известно, что IL-4 усиливает пролиферацию эндометриальных клеток и стимулирует ангиогенез, а также активно участвует в развитии фибропластических и спайчных процессов. Повышение концентрации IL-4 в перитонеальной жидкости пациенток основной группы свидетельствует об активации процессов фиброобразования, играющих значимую роль в развитии бесплодия трубно-перитонеального генеза на фоне хронических воспалительных заболеваний, что согласуется с данными, представленными в литературе [11, 14, 19].

Также проводилось определение содержания в перитонеальной жидкости IL-6 – цитокина, который обладает про- и противовоспалительными функциями на разных этапах иммунного ответа, а также участвует в активации синтеза специфических антител во второй фазе иммунного реагирования. Кроме того, IL-6 играет важную роль в процессах хронизации воспаления, в том числе при инфекционных процессах бактериальной этиологии [9, 12, 16]. Показано, что у пациенток основной группы концентрация IL-6 достоверно больше (в 3,5 раза), чем у женщин группы сравнения (см. таблицу).

Определение содержания в перитонеальной жидкости IL-10 обусловлено тем, что это – наиболее важный противовоспалительный цитокин, оказывающий противовоспалительное и антицитокиновое действие: он ингибирует синтез цитокинов Т-хелперов 1 типа, хемокинов, адгезионных молекул, моноцитарно/макрофагальных факторов – TNF-α и других [2, 18, 20]. Концентрация IL-10 у пациенток основной и контрольной групп не различалась (см. таблицу).

Несомненный интерес представляют данные, полученные при определении MCP-1. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) – цитокин, секретруемый моноцитами/макрофагами и эндоте-

лиальными клетками в ответ на действие таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α и IL-1. MCP-1 является хемоаттрактантом в отношении моноцитов, он обеспечивает миграцию моноцитов из кровяного русла в очаг воспаления [3, 10, 15]. Наибольшие концентрации MCP-1 были отмечены в случаях, когда основное заболевание протекало с выраженным процессом фиброобразования [18, 21]. В нашем исследовании установлено, что содержание MCP-1 в перитонеальной жидкости пациенток основной группы достоверно (в 2,6 раза) выше значений показателя в группе сравнения (см. таблицу).

Исследование индивидуальных значений содержания цитокинов у пациенток основной группы выявило их значительную гетерогенность (см. таблицу). Наибольшая вариабельность в основной группе отмечена для IL-10 и IFN- γ , однако можно говорить о высокой вариабельности значений и остальных исследованных показателей основной группы. В группе контроля вариабельность исследованных показателей была средней либо слабой. Высокие коэффициенты вариации и значительные разбросы минимальных и максимальных значений исследованных цитокинов, вероятно, можно расценивать как динамическое развитие хронического воспалительного процесса, что обуславливает гетерогенность показателей основной группы.

Выявленные закономерности можно расценивать как факт, подтверждающий предположение о наличии активности местного воспалительного процесса у пациенток основной группы. Эта реакция, вероятно, является ответом на постоянную персистенцию инфекционного фактора из очага хронического воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что, несмотря на отсутствие клинических проявлений хронического воспаления и нормативные значения общелабораторных анализов, у женщин репродуктивного возраста с бесплодием на фоне хронического воспалительного процесса органов малого таза в стадии клинической ремиссии тестируется активность местных воспалительных реакций. Указанное подтверждается достоверным повышением в перитонеальной жидкости пациенток основной группы концентраций биологически активных веществ, являющихся маркерами активности воспаления (провоспалительные цитокины TNF- α , IL-6, а также MCP-1). Развитие воспалительного процесса у обследованных пациенток основной группы сопровождается активацией иммунного ответа на

постоянную антигенную стимуляцию из очага хронического воспаления, о чем свидетельствует достоверное повышение в перитонеальной жидкости концентраций индукторов гуморального и клеточного иммунитета (IFN- γ , IL-4). Выявленные нарушения являются значимым фактором возникновения и развития бесплодия, поскольку наличие очага хронического воспаления в органах репродуктивной системы создает неблагоприятный для возникновения и развития беременности баланс цитокинов и способно вызвать развитие иммунно-эндокринных нарушений. Результатом указанных патологических процессов являются структурно-функциональные нарушения в репродуктивной системе женщин с развитием бесплодия [4, 5, 7, 12, 18, 21, 24].

Полученные в исследовании данные позволяют считать, что при проведении лечебных мероприятий у женщин с бесплодием на фоне хронических воспалительных заболеваний репродуктивной сферы необходимы разработка и использование патогенетически обоснованных методов лечения с включением в рациональную санацию необходимых методов иммуотропной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Свитич О.А., Малушенко С.В. Иммуногенетические аспекты проблемы невынашивания беременности. *Рос. иммунол. журн.* 2015; 9 (8): 194–200.
Gankovskaya L.V., Bakhareva I.V., Svitich O.A., Malushenko S.V. Immunogenetic aspects of miscarriage. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology.* [2015; 9 (8): 194–200. [In Russian].
2. Дикке Г.Б., Остроменский В.В. Нарушение иммунного статуса при хроническом эндометрите и опыт его коррекции посредством локальной цитокинотерапии. *Акушерство и гинекология.* 2019; (9): 139–146. doi: 10.18565/aig.2019.9.139-146
Dikke G.B., Ostromenskiy V.V. Immune dysfunction in chronic endometritis and the experience of its correction using local cytokine therapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology.* 2019; (9): 139–146. [In Russian]. doi: 10.18565/aig.2019.9.139-146
3. Каграманова Ж.А., Сускова В.С., Гусева Т.С., Паршина О.В., Выжлова Е.Н. Клинико-иммунологическое обоснование иммунотерапии больных с острыми воспалительными заболеваниями придатков матки. *Рос. вестн. акушера-гинеколога.* 200; (5): 29–33.
Kagramanova Zh.A., Suskova V.C., Guseva T.S., Parshina O.V., Vyzhlova E.N. Clinical and immunological rationale for immunotherapy of patients with

acute inflammatory disease uterus. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2006; (5): 29–33. [In Russian].

4. Радзинский В.Е., Запертова Е.Ю. Прогестеронобусловленные изменения провоспалительных цитокинов при привычном невынашивании беременности. *Журн. акушерства и жен. болезней*. 2004; 53 (4): 59–81.

Radzinskiy V.E., Zapertova E.Yu. Progesterone-related changes in pro-inflammatory cytokines in habitual miscarriage. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2004; 53 (4): 59–81. [In Russian].

5. Сотникова Н.Ю., Кудряшова А.В., Крошкина Н.В., Панова И.А., Лукина Н.С. Роль ранних нарушений продукции цитокинов в формировании патологии беременности. *Рос. иммунол. журн.* 2007; (3-4): 258–265.

Sotnikova N.Yu., Kudryashova A.V., Kroshkina N.V., Panova I.A., Lukina N.S. The role of early disturbances of cytokine production in the formation of pathological pregnancy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*. 2007; (3-4): 258–265. [In Russian].

6. Трунов А.Н., Ефремов А.В., Трунова Л.А. Принципы патогенетически обоснованной диагностики при иммуномодулирующей терапии хронических инфекционно-воспалительных заболеваний. *Аллергология и иммунология*. 2002; 3 (1): 117–122.

Trunov A.N., Efremov A.V., Trunova L.A. The principles of diagnosis at immunomodulatory therapy of chronic infectious and inflammatory diseases. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*. 2002; 3 (1): 117–122. [In Russian].

7. Трунова Л.А., Горбенко О.М., Шваюк А.П., Обухова О.О., Трунов А.Н. Особенности иммунного реагирования у девушек пубертатного возраста с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза в стадии ремиссии. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2010; 12 (2): 93–96.

Trunova L.A., Gorbenko O.M., Shvayuk A.P., Obukhov O.O., Trunov A.N. Features of the immune response in girls pubertal age with chronic infectious and inflammatory diseases of the pelvic organs in remission. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2010; 12 (2): 93–96. [In Russian].

8. Устинов Т.А., Артымук Н.В., Власов В.В., Пыжов А.Ю. Бесплодие в Кемеровской области. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2010; (1): 37–39.

Ustinov T.A., Artymuk N.V., Vlasov V.V., Puzhov A.Yu. Infertility in the Kemerovo region. *Mat' i ditya v Kuzbasse = Mother and Baby in Kuzbass*. 2010; (1): 37–39. [In Russian].

9. Фролов М.В., Халим Х. Оценка репродуктивной функции женщины при острых и хронических воспалительных заболеваниях придатков матки. *Вестн. Воронеж. гос. техн. ун-та*. 2006; 2 (7): 21–26.

Frolov M.V., Khalim Kh. Evaluation of the reproductive function of women with acute and chronic inflammatory diseases of the uterine appendages. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Bulletin of Voronezh State Technical University*. 2006; 2 (7): 21–26. [In Russian].

10. Чабанова Н.Б., Матаев С.И., Василькова Т.Н., Шевлюкова Т.П. Роль системного воспаления в развитии осложнений беременности у женщин с ожирением. *Акушерство и гинекология*. 2017; (10): 12–18.

Chabanova N.B., Mataev S.I., Vasilkova T.N., Shevlyukova T.P. Role of systemic inflammation in the development of pregnancy complications in obese women. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*. 2017; (10): 12–18. [In Russian]. doi: 10.18565/aig.2017.10.12-18

11. Chatterjee P., Chiasson V.L., Bounds K.R., Mitchell B.M. Regulation of the antiinflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Front. Immunol.* 2014; 27 (5): 253. doi: 10.3389/fimmu.2014.00253

12. Das C., Kumar V.S., Gupta S., Kumar S. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 53 (1-2): 257–268.

13. Genc M.R., Ford C.E. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2010; 22 (2): 116–121. doi: 10.1097/GCO.0b013e3283374ac8

14. Kanellakis P., Ditiatkovski M., Kostolias G., Bobik A. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 2012; 95 (1): 77–85. doi: 10.1093/cvr/cvs142

15. Koga K., Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (6): 587–600. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00848.x

16. Lee S.A., Tsai H.T., Ou H.C., Han C.P., Tee Y.T., Chen Y.C., Wu M.T., Chou M.C., Wang P.H., Yang F. Plasma interleukin-1beta, 6, 8 and tumor necrosis factor-alpha as highly informative markers of pelvic inflammatory disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008; 7: 997–1003. doi: 10.1515/CCLM.2008.196

17. Milewski R., Milewska A.J., Czerniecki J., Leśniewska M., Wołczyński S. Analiza profilu demograficznego pacjentów leczonych z powodu niepłodności metodami rozrodu wspomaganego w latach 2005–2010. *Ginekol. Pol.* 2013; 84 (7): 609–614. doi: 10.17772/gp/1612

18. Ng S.C., Gilman-Sachs A., Thaker P. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2002; 2: 77–86. doi: 10.1034/j.1600-0897.2002.01105.x

19. Postlethwaite A.E., Holness M.A., Katai H., Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated le-

- vels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J. Clin. Invest.* 1992; 90 (4): 1479–1485. doi: 10.1172/JCI116015
20. Rolle L., Memarzadeh Tehran M., Morell-Garcia A., Raeva Y., Schumacher A., Hartig R., Costa S.D., Jensen F., Zenclussen A.C. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013; 70 (6): 448–453. doi: 10.1111/aji.12157
21. Romero R., Gotsch F., Pineles B., Kusanovic J.P. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr. Rev.* 2007; 65 (12): 194–202. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00362.x
22. Rouchou B. Consequences of infertility in developing countries. *Perspect. Public Health.* 2013; 133 (3): 174–179. doi: 10.1177/1757913912472415
23. Smith M., Hagerty K.A., Skipper B., Bocklage T. Chronic endometritis: a combined histopathologic and clinical review of cases from 2002 to 2007. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2010; 29 (1): 44–50. doi: 10.1097/PGP.0b013e3181ae81bb
24. Trunov A., Obukhova O., Gorbenko O., Shvayk A., Trunova L. Cytokines, estradiol and progesterone in the plasma of women of reproductive age with pelvic inflammatory disease in remission. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013; 4 (6): 727–730. doi: 10.4236/abb.2013.46096
25. Van Oostrum N., de Sutter P., Meys J., Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2013; 28 (7): 1809–1815. doi: 10.1093/humrep/det096
26. Ziller V., Hadji P., Thielscher C., Ziller M., Kostev K. Prevalence of female subfertility in German gynecological practices. *Gynecol. Endocrinol.* 2013; 29 (8): 767–770. doi: 10.3109/09513590.2013.798274

Сведения об авторах:

Обухова О.О., д.м.н., ORCID: 0000-0002-9834-1799, e-mail: trio188@yandex.ru
Трунов А.Н., д.м.н., ORCID: 0000-0002-7592-8984, e-mail: trunov1963@yandex.ru
Горбенко О.М., к.б.н., ORCID: 0000-0002-5672-9234, e-mail: gorbenko.olga.m@bk.ru
Шваюк А.П., к.б.н., ORCID: 0000-0002-8247-7085, e-mail: alya.shvayuk@bk.ru

Information about authors:

Obukhova O.O., doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9834-1799, e-mail: trio188@yandex.ru
Trunov A.N., doctor of medical science, ORCID: 0000-0002-7592-8984, e-mail: trunov1963@yandex.ru
Gorbenko O.M., candidate of biological science, ORCID: 0000-0002-5672-9234, e-mail: gorbenko.olga.m@bk.ru
Shvayuk A.P., candidate of biological science, ORCID: 0000-0002-8247-7085, e-mail: alya.shvayuk@bk.ru

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СОННЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ АРТЕРИЙ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, СОЧЕТАННОЙ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМ ПАРОКСИЗМАЛЬНЫМ ПОЗИЦИОННЫМ ГОЛОВОКРУЖЕНИЕМ

Владимир Яковлевич ПОЛЯКОВ, Лариса Александровна ЩЕПАНКЕВИЧ,
Юрий Алексеевич НИКОЛАЕВ, Светлана Викторовна ПЕГОВА,
Елена Геннадьевна НОВИКОВА, Евгения Викторовна СЕВОСТЬЯНОВА

*НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ фундаментальной
и трансляционной медицины*

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Целью исследования было оценить диагностическую значимость структурно-функциональных изменений в области сонных и позвоночных артерий у больных артериальной гипертензией (АГ), сочетанной с доброкачественным пароксизмальным позиционным головокружением (ДППГ). **Материал и методы.** На базе клиники ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск) обследованы 38 пациентов с артериальной гипертензией и сопутствующим головокружением, проводилось дуплексное сканирование сосудов шеи с помощью ультразвукового сканера Vivid E9. **Результаты и их обсуждение.** Показано влияние состояния кровотока на уровне сонных и позвоночных артерий на выраженность клинической симптоматики головокружения у больных артериальной гипертензией с сочетанным ДППГ. Выявлена клиническая значимость атеросклеротического изменения сонных артерий, степени извитости сонных и позвоночных артерий на эффективность лечения и профилактики головокружения у больных с АГ и ДППГ. Показано, что у больных АГ с ДППГ выраженность взаимосвязи гемодинамически значимых изменений сонных и позвоночных артерий с клиническими проявлениями головокружения больше, чем у больных с АГ без ДППГ. Использование ультразвукового дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий у больных АГ, сочетанной с головокружением, позволяет проводить дифференциальную диагностику ДППГ и дисциркуляторных цереброваскулярных нарушений, оценивать степень их участия в клинических проявлениях головокружения, что может служить основой для разработки новой медицинской технологии.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, доброкачественное пароксизмальное позиционное головокружение, ультразвуковое дуплексное сканирование сосудов, пиковая систолическая скорость кровотока, сонные артерии, позвоночные артерии, атеросклероз, комплекс «интима – медиа».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Поляков В.Я., e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Для цитирования: Поляков В.Я., Щепанкевич Л.А., Николаев Ю.А., Пегова С.В., Новикова Е.Г., Севостьянова Е.В. Диагностическая значимость структурно-функциональных изменений сонных и позвоночных артерий при артериальной гипертензии, сочетанной с доброкачественным пароксизмальным позиционным головокружением. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39 (6): 84–91. doi: 10.15372/SSMJ20190611

DIAGNOSTIC VALUE OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE CAROTID AND VERTEBRAL ARTERIES IN ARTERIAL HYPERTENSION, ASSOCIATED WITH BENIGN PAROXYSMAL POSITIONAL VERTIGO

Vladimir Yakovlevich POLYAKOV, Larisa Aleksandrovna SHCHAPANKEVICH,
Yuriy Alekseevich NIKOLAEV, Svetlana Viktorovna PEGOVA,
Elena Gennadiyevna NOVIKOVA, Evgeniya Viktorovna SEVOSTYANOVA

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

Objective of the study was to assess the diagnostic significance of hemodynamic disorders in the area of carotid and vertebral arteries in patients with hypertension combined with benign paroxysmal positional vertigo (DPPG) using ultrasound duplex scanning of neck vessels. **Material and methods.** Thirty eight patients of the clinic of Federal

Research Center for Fundamental and Translational Medicine with hypertension and concomitant dizziness were examined. The state of carotid and vertebral arteries, blood flow in the arteries were assessed by duplex ultrasound scanning using the Vivid E9 apparatus. **Results and discussion.** The influence of the blood flow at the level of carotid and vertebral arteries on the severity of clinical symptoms of dizziness in patients with hypertension with concomitant DPPG was shown. The clinical significance of atherosclerotic changes in carotid arteries, tortuosity of carotid and vertebral arteries of the effectiveness of treatment and prevention of dizziness in patients with hypertension and DPPG was revealed. It is shown that in patients with hypertension and comorbid DPP, the severity of the relationship of hemodynamically significant changes in the carotid and vertebral arteries with clinical manifestations of dizziness is greater than in patients with hypertension without DPP. The use of ultrasound duplex scanning of brachiocephalic arteries in hypertension with comorbid vertigo allows for differential diagnosis of benign paroxysmal positional vertigo and cerebrovascular dyscirculatory disorders, the degree of their participation in clinical manifestations of dizziness. A new medical technology for the diagnosis of pathogenic mechanisms of dizziness in patients with hypertension, using ultrasound duplex scanning of carotid and vertebral arteries, allows to personalize treatment and prevention in such patients.

Key words: arterial hypertension, benign paroxysmal position dizziness, ultrasonic duplex scanning of blood vessels, peak systolic blood flow velocity, carotid arteries, vertebral arteries, atherosclerosis, «intima – media» complex.

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

Correspondence author: Polyakov V.Ya., e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Citation: Polyakov V.Ya., Shchepankevich L.A., Nikolaev Yu. A., Pegova S.V., Novikova E.G., Sevostyanova E.V. Diagnostic value of structural and functional changes in the carotid and vertebral arteries in arterial hypertension, associated with benign paroxysmal positional vertigo. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 84–91. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190611

Современная клиническая медицина все чаще встречается с коморбидными патологическими процессами. Артериальная гипертензия (АГ), являясь одним из наиболее распространенных заболеваний, редко представляет собой изолированную нозологическую форму и во многом определяет клинику и патогенез сочетанной патологии [4]. Возрастание полиморбидной патологии связано с хронизацией заболеваний, старением населения, увеличением объема диагностических исследований, неблагоприятными средовыми воздействиями на человека.

Клинические проявления и патогенетические механизмы артериальной гипертензии во многом связаны с повышением жесткости артерий, развитием атеросклероза, ухудшением периферического кровообращения с ишемией органов и тканей [5, 9, 17, 24]. Большое значение в патогенетических механизмах развития цереброваскулярной недостаточности при АГ имеет снижение эластичности сосудистой стенки, развитие атеросклероза [21]. Снабжение головного мозга кровью осуществляется через систему сонных и позвоночных артерий, диагностика кровотока в которых в клинике осуществляется в основном с помощью ультразвукового сканирования с использованием доплерографии [13]. Ультразвуковое дуплексное сканирование дает информацию о степени утолщения сосудистой стенки, объеме и характере наполнения сосудистого русла, важным компонентом которых является скорость

кровотока [18]. Существует градиент жесткости артериального русла, влияющий на скоростные характеристики гемодинамики, который зависит от возраста и наличия сердечно-сосудистой патологии [14, 23]. В этой связи актуальным является совершенствование диагностических подходов к оценке состояния кровотока у больных артериальной гипертензией, коморбидной патологией.

Дисциркуляторные цереброваскулярные нарушения при артериальной гипертензии часто проявляются симптомами головокружения. В то же время головокружение может быть проявлением коморбидно протекающих других заболеваний, таких как дорсопатия шейного отдела позвоночника, доброкачественное пароксизмальное позиционное головокружение (ДППГ), психогенное головокружение, вестибулярная мигрень, болезнь Меньера и др. [11]. Головокружение – одна из наиболее частых жалоб больных неврологического профиля [16]. Пациенты часто расширяют понятие головокружения и включают в него неустойчивость в положении стоя и при ходьбе, тошноту, предобморочные состояния. Во врачебной практике остается сложным вопросом дифференциальная диагностика и лечение головокружения [16]. Особенно важно при проведении дифференциальной диагностики головокружения исключить ДППГ и цереброваскулярную недостаточность различной степени выраженности, причиной которой могут быть АГ, гемодинамически значимые изменения сонных и позвоночных

артерий различной этиологии [2]. Вероятность сочетания АГ и ДППГ возрастает в связи с тем, что эти два заболевания чаще встречаются у пациентов старших возрастных групп [3, 8]. Показатели каротидного кровотока коррелируют с биохимическими маркерами проатерогенных нарушений липидного обмена, индексами вегетативного регулирования. Таким образом, диагностические подходы к оценке причин дисциркуляторной энцефалопатии должны включать и функциональные доплерографические, и лабораторно-биохимические методы [10, 13].

При артериальной гипертензии прогрессированию атеросклероза и повышению цереброваскулярного риска способствуют коморбидные патологические процессы. Головокружение и вестибулярные расстройства патогенетически могут быть связаны с патологией шейного отдела позвоночника, в этом случае в клинической практике используется термин «шейное головокружение». В качестве причин цервикального головокружения рассматривают дегенеративно-дистрофические изменения, аномалии строения позвоночника, мышечно-тонические синдромы и сочетание этих состояний с сопровождающими их изменениями кровотока в сосудах шеи [15]. Повышение артериального давления при коморбидной дорсопатии шейного отдела позвоночника включает вертеброгенные механизмы (синдром позвоночной артерии), синдром нарушения вегетативной регуляции, синдром нарушения микроциркуляции с развитием гипоксии и вертебро-базиллярной недостаточности. При патологии шейного отдела позвоночника головокружение может появляться вследствие нарушения афферентации с проприорецепторов патологически измененного мышечно-связочного аппарата и нарушения восприятия вестибулярной системой информации о пространственной ориентации [20]. При запрокидывании головы назад с одномоментным ее поворотом в сторону возможно появление головокружения за счет компрессии позвоночной артерии в канале позвоночной артерии (обычно это происходит на уровне С2). Этому способствуют патологические изменения позвонков (остеофиты), гипоплазия контрлатеральной позвоночной артерии. Такое головокружение сопровождается позиционным нистагмом. Для дифференциальной диагностики в этом случае необходима динамическая ангиография. Как правило, данное состояние требует хирургического лечения. При физиологических движениях шеи сдавление позвоночной артерии маловероятно. В то же время неустойчивость при запрокидывании головы назад может быть физиологической и

объясняется отклонением лабиринта от обычного положения и обработкой головным мозгом более сложной информации для сохранения равновесия. Из этого следует, что коморбидное сочетание АГ с дорсопатией и атеросклеротическим поражением сосудов требует особого подхода к выбору диагностических мероприятий, комплексного лечения и реабилитации.

Эффективность лечения головокружения во многом зависит от точности диагностики и дифференциальной диагностики [19]. Для постановки диагноза позиционного головокружения выполняются позиционные пробы Эпли, Дикса – Холлпайка и МакКлюра – Пагини [7], которые следует проводить всем пациентам с головокружением, поскольку при болезни Меньера, мигрени, вестибулярном нейроните возможно возникновение вторичного ДППГ. Выявленное головокружение устраняется с помощью специальных лечебных маневров (Эпли, Семонта, Брандта-Дароффа и др.), часто в течение нескольких минут [22]. Дополнительную информацию дает исследование равновесия с помощью маршевой пробы Фукуда (Унтербергера). Одностороннее нарушение вестибулоокулярного рефлекса выявляется при вестибулярном нейроните. В типичных случаях внезапно развивается головокружение системного характера, тошнота и нарушение равновесия. В остром периоде заболевание дифференцируют, прежде всего, с инсультом в мозжечке [19]. Обнаружение одностороннего нарушения вестибулоокулярного рефлекса при отсутствии нарушений слуха и очаговых симптомов со стороны центральной нервной системы подтвердит периферический тип головокружения.

Мало изученным остается вопрос зависимости клинической выраженности сопряженных с головокружением симптомов при сочетании ДППГ с нарушениями кровоснабжения головного мозга за счет изменения кровотока в сонных и позвоночных артериях при их атеросклеротическом поражении, извитости, внешней компрессии. Наряду с ультразвуковым дуплексным сканированием сосудов шеи [12] важными для диагностики являются рентгенологические, магнитно-резонансные методы исследования, которые позволяют связать головокружение с найденными изменениями сосудистого русла [6, 20].

Цель исследования – оценить взаимосвязь структурно-функциональных изменений сонных и позвоночных артерий у больных артериальной гипертензией с клиническими проявлениями доброкачественного пароксизмального позиционного головокружения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 38 пациентов (18 мужчин, 20 женщин) клиники ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (г. Новосибирск), больных АГ с симптомами головокружения, в возрасте от 46 лет до 81 года ($58,4 \pm 2,1$ года). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (последний пересмотр Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все пациенты давали письменное информированное согласие на включение в исследование.

Больным выполнялось стандартное клиническое обследование для подтверждения диагноза эссенциальной АГ и исключения АГ симптоматического генеза. Верификация диагноза осуществлялась в соответствии с рекомендациями ВНОК (2010 г.). Проводилось дуплексное сканирование сосудов шеи с помощью ультразвукового сканера Vivid E9 (GE, США) с определением диаметра общих сонных артерий, внутренних сонных артерий, наружных сонных артерий, позвоночных артерий, толщины комплекса «интима – медиа», определение пиковой систолической скорости кровотока общих сонных артерий, внутренних сонных артерий, наружных сонных артерий, позвоночных артерий, индекса резистентности. За верхнюю границу нормы толщины комплекса «интима – медиа» принималось значение 0,9 мм. Выраженность атеросклеротических изменений оценивалась в зависимости от степени стенозирования сонной артерии: до 30 % – незначительные атеросклеротические изменения, 30–50 % – умеренные, более 50 % – выраженные. Гемодинамически значимым изменением кровотока в артерии считался при его градиенте более 30 % либо превышении пиковой систолической скорости кровотока более 100 см/с.

Верификация диагноза ДППГ осуществлялась врачом-неврологом с проведением диагностического маневра Эпли. Порядок проведения маневра был следующим.

1. Положение пациента сидя прямо на кушетке.

2. Поворот головы пациента в ту сторону, в которой есть проблемы во внутреннем ухе, на угол в 45° , и пациент ложится на спину. Задержка в этом положении не меньше, чем на 2 мин.

3. Поворот головы в другую сторону на 90° . Задержка в этом положении на 2 мин.

4. Поворот туловища пациента в направлении наклона головы так, чтобы нос был направлен вниз. Задержка в этом положении на 2 мин.

5. Возвращение пациента в исходное сидячее положение на 30 с.

По анкете ВАШ (визуально-аналоговая шкала) оценивалась выраженность головокружения.

Непрерывные переменные представлены в виде среднего арифметического и его ошибки ($M \pm m$), номинальные данные – в виде относительных частот объектов исследования (n , %). Для оценки различий количественных данных использовали критерий Стьюдента, для номинальных данных – точный критерий Фишера. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У 17 пациентов был верифицирован диагноз ДППГ (I группа), у 21 больного АГ с головокружением диагноз ДППГ не был подтвержден (II группа). Средние, минимальные и максимальные морфофункциональные показатели ультразвукового дуплексного сканирования сонных и позвоночных артерий обследованных больных представлены в таблице. При ультразвуковом дуплексном сканировании сосудов шеи у 13 (76,5 %) больных с АГ и ДППГ были выявлены извитости внутренних сонных артерий (справа и слева), у двух (11,8 %) – общей сонной артерии, у 15 (88,2 %) – позвоночных артерий. Во второй группе таких пациентов было соответственно 9 (42,9 %, $p = 0,038$), 2 (9,5 %) и 11 (52,4 %, $p = 0,020$).

Атеросклеротические изменения сонных и позвоночных артерий в первой группе больных выявлены у 13 человек (76,5 %). Начальные и незначительные атеросклеротические изменения были у семи (41,2 %) пациентов, умеренные – у четырех (23,5 %), выраженные гемодинамически значимые – у двух (11,8 %). Во второй группе атеросклеротические изменения обнаружены у 18 (94,7 %) больных, в том числе незначительные и умеренные – соответственно у 10 (52,6 %) и восьми (42,1 %) человек.

В процессе лечения больных с применением корригирующих маневров, лечебной физкультуры и физиотерапии отмечалось снижение симптоматики головокружения, уменьшение его оценки в баллах по ВАШ (с $9,00 \pm 0,33$ до $6,75 \pm 0,45$, $p < 0,05$).

Таблица. Показатели ультразвукового дуплексного сканирования сонных и позвоночных артерий у обследованных больных**Table.** Indicators of ultrasonic duplex scanning of carotid and vertebral arteries in the examined patients

| Показатель | АГ и ДППГ | | | АГ без ДППГ | | |
|---|-------------|------|-------|-------------|------|-------|
| | $M \pm m$ | Min | Max | Mean | Min | Max |
| Диаметр ОСА_Пр, мм | 5,9 ± 0,16 | 4,9 | 7,4 | 6,2 ± 0,16 | 5,3 | 7,3 |
| Диаметр ОСА_Л, мм | 6,0 ± 0,14 | 4,9 | 7,2 | 6,3 ± 0,14 | 5,2 | 7,6 |
| Диаметр ВСА_Пр, мм | 4,5 ± 0,09 | 3,9 | 5,2 | 4,7 ± 0,12 | 4,0 | 5,6 |
| Диаметр ВСА_Л, мм | 4,4 ± 0,09 | 3,8 | 5,0 | 4,6 ± 0,10 | 3,8 | 5,3 |
| Диаметр НСА_Пр, мм | 3,9 ± 0,10 | 3,2 | 4,8 | 3,9 ± 0,11 | 3,2 | 4,9 |
| Диаметр НСА_Л, мм | 3,8 ± 0,14 | 3,0 | 5,4 | 4,1 ± 0,11 | 3,4 | 4,8 |
| Диаметр ПА_Пр, мм | 3,5 ± 0,14 | 2,5 | 4,5 | 3,3 ± 0,20 | 2,4 | 5,0 |
| Диаметр ПА_Л, мм | 3,3 ± 0,12 | 2,5 | 4,2 | 3,6 ± 0,13 | 2,3 | 4,8 |
| Комплекс «интима – медиа» ОСА_Пр, мм | 1,1 ± 0,05 | 0,8 | 1,4 | 1,2 ± 0,03 | 1,0 | 1,4 |
| Комплекс «интима – медиа» ОСА_Л, мм | 1,2 ± 0,05 | 0,9 | 1,4 | 1,2 ± 0,05 | 0,9 | 1,4 |
| Скорость ОСА_Пр, см/с | 71,4 ± 3,85 | 45,0 | 107,8 | 63,3 ± 3,05 | 50,3 | 87,6 |
| Скорость ОСА_Л, см/с | 75,4 ± 4,52 | 51,7 | 119,0 | 66,8 ± 3,43 | 50,5 | 88,2 |
| Скорость ВСА_Пр, см/с | 87,7 ± 8,21 | 51,3 | 165,0 | 70,4 ± 3,95 | 51,3 | 107,1 |
| Скорость ВСА_Л, см/с | 77,8 ± 4,00 | 56,9 | 115,0 | 70,6 ± 5,72 | 50,6 | 145,2 |
| Скорость НСА_Пр, см/с | 94,2 ± 7,81 | 56,7 | 184,0 | 86,6 ± 4,22 | 62,9 | 127,6 |
| Скорость НСА_Л, см/с | 87,3 ± 6,18 | 52,9 | 142,4 | 75,7 ± 2,74 | 57,6 | 94,2 |
| Скорость ПА_Пр, см/с | 46,6 ± 3,29 | 21,7 | 71,8 | 49,3 ± 3,58 | 30,4 | 77,5 |
| Скорость ПА_Л, см/с | 55,9 ± 8,36 | 31,9 | 167,0 | 52,1 ± 5,99 | 24,4 | 118,5 |

Примечание. Min – минимальное значение, Max – максимальное значение, ВСА – внутренняя сонная артерия, НСА – наружная сонная артерия, ОСА – общая сонная артерия, ПА – позвоночная артерия: Пр – правая, Л – левая.

Выраженное головокружение у больных с АГ и ДППГ было у 88,9 % обследованных. Выявлены значимые ($p < 0,05$) корреляционные связи:

– выраженности головокружения при госпитализации и толщины комплекса «интима – медиа» справа ($r = 0,82$) и слева ($r = 0,76$);

– выраженности положительной динамики симптоматики головокружения по шкале ВАШ и толщины комплекса «интима – медиа» справа ($r = 0,67$);

– выраженности атеросклеротических изменений сонных артерий и степени головокружения при поступлении ($r = 0,92$);

– выраженности положительной динамики симптоматики головокружения по шкале ВАШ и степени извитости правой сонной артерии ($r = 0,85$);

– степени головокружения при поступлении и скорости кровотока по наружным сонным артериям справа ($r = 0,75$) и слева ($r = 0,76$);

– степени головокружения после лечения и скорости кровотока по правой позвоночной артерии ($r = 0,65$).

Обнаружена прямая корреляционная связь между динамикой снижения степени головокружения в результате лечения и использования лечебно-коррекционных маневров и возрастом пациентов $r = 0,79$ ($p < 0,05$). Выявлена значимая ($p < 0,05$) обратная корреляционная связь между уровнем альфа-холестерина и степенью извитости внутренних ($r = -0,71$) и позвоночных ($r = -0,67$) артерий.

Во второй группе пациентов выраженное головокружение было у 54,6 % человек, умеренное и незначительное – у 46,4 %. Выявлены обратные корреляционные связи снижения выраженности головокружения в процессе лечения и толщины комплекса «интима – медиа», $r = -0,56$ ($p < 0,05$). В то же время общее количество взаимосвязей между клиническими проявлениями головокружения до и после лечения, его динамики и показателями кровотока и состоянием сонных и позвоночных артерий во второй группе обследованных было меньше, чем у больных с АГ и ДППГ.

У пациентов с АГ и ДППГ патогенез головокружения имеет сочетанный характер, включаю-

ший отогенные и дисциркуляторные механизмы. Применение на диагностическом этапе оценки отогенной роли в патогенезе головокружения с помощью позиционных проб и выраженности дисциркуляторных процессов, нарушающих эффективное кровоснабжение головного мозга, с помощью ультразвукового дуплексного сканирования позволяет оценить степень участия каждой из нозологических форм в патогенезе и клинических проявлениях головокружения. Увеличение толщины комплекса «интима – медиа» может рассматриваться маркером дисциркуляторной энцефалопатии (в том числе ее субклинических проявлений) у больных с АГ и ДППГ.

При наличии АГ и ДППГ степень взаимосвязи гемодинамически значимых изменений сонных и позвоночных артерий с клинической симптоматикой головокружения выше, чем у больных с АГ без ДППГ. Сочетание у больных АГ и дисциркуляторной энцефалопатией с ДППГ является причиной более выраженной симптоматики головокружения, что необходимо учитывать при прогнозировании эффективности лечения ДППГ с целью персонализировано планировать профилактику рецидивов головокружения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выраженность головокружения у больных АГ, сочетанной с ДППГ, зависит от состояния сонных и позвоночных артерий. Головокружение у таких больных в большей степени выражено при утолщении комплекса «интима – медиа», что отражает повышение жесткости артерий при появлении их атеросклеротического изменения и гемодинамически значимой извитости сонных и позвоночных артерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев Ф.Т. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний. *Серд. недостаточность*. 2003; (1): 22–25.

Ageev F.T. The role of endothelial dysfunction in the development and progression of cardiovascular disease. *Serdechnaya nedostatochnost' = Russian Heart Failure Journal*. 2003; (1): 22–25. [In Russian].

2. Антоненко Л.М., Бестужева Н.В., Парфенов В.А. Диагностика и лечение головокружения в амбулаторной практике. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2015; (1): 55–60.

Antonenko L.M., Bestuzheva N.V., Parfenov V.A. Diagnosis and treatment of vertigo in outpatient practice. *Nevrologiya, neuropsychiatriya, psychosomatics = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2015; (1): 55–60. [In Russian].

3. Байбакова Е.В. Доброкачественное пароксизмальное позиционное головокружение: диагностика и лечение. *Рос. мед. журн*. 2012; (27): 1370.

Baybakova E.V. Benign paroxysmal positional vertigo: diagnosis and treatment. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*. 2012; (27): 1370. [In Russian].

4. Белялов Ф.И. Лечение болезней сердца в условиях коморбидности. Иркутск, 2014. 311 с.

Belyalov F.I. Treatment of heart diseases in the conditions of comorbidity. Irkutsk, 2014. 311 p. [In Russian].

5. Бойко А.Н. Оптимизированные протоколы прогнозирования риска при бессимптомном стенозе сонных артерий с использованием регистрации эмболического сигнала. Исследование Asymptomatic carotid emboli study. *Журнал Национальной ассоциации по борьбе с инсультом /Stroke/ Российское издание*. 2012; (2): 34–36.

Boiko A.N. Optimized risk prediction protocols for asymptomatic carotid stenosis using embolic signal registration. Asymptomatic carotid emboli study. *Zhurnal Nacional'noj associacii po bor'be s insul'tom /Stroke/ Rossijskoe izdanie = Journal of the National Stroke Association / Stroke / Russian edition*. 2012; (2): 34–36. [In Russian].

6. Брандт Т., Дитерих М., Штрupp М. Головокружение. Пер. с англ. М.: Практика, 2009. 200 с.

Brandt T., Dieterich M., Shtrupp M. Dizziness. Translation from English. Moscow: Praktika, 2009. 200 p. [In Russian].

7. Замерград М.В., Парфенов В.А., Яхно Н.Н., Мельников О.А., Морозова С.В. Диагностика системного головокружения в амбулаторной практике. *Неврол. журн*. 2014; 19 (2): 23–29.

Zamergrad M.V., Parfenov V.A., Yakhno N.N., Melnikov O.A., Morozova S.V. Diagnosis of systemic vertigo in outpatient practice. *Nevrologicheskij zhurnal = Neurological Journal*. 2014; 19 (2): 23–29. [In Russian].

8. Кунельская Н.Л., Гусева А.Л., Байбакова Е.В., Чистов С.Д., Чугурова М.А. Эффективный алгоритм диагностики и лечения доброкачественного пароксизмального головокружения. *Вестн. оториноларингологии*. 2015; (5): 19–22. doi: 10.17116/otorino201580519-22

Kunelskaya N.L., Guseva A.L., Baybakova E.V., Chistov S.D., Chugurova M.A. Efficient algorithm for diagnosis and treatment of benign paroxysmal vertigo. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*. 2015; (5): 19–22. [In Russian]. doi: 10.17116/otorino201580519-22

9. Маркова Е.Н., Николаев Ю.А., Митрофанов И.М., Поляков В.Я., Поспелова Т.И., Долгова Н.А. Качество жизни у больных артериальной гипертензией при применении импульсной электротерапии и хлоридных натриевых ванн. *Бюл. СО РАМН*. 2014; 34 (4): 67–72.

Markova E.N., Nikolaev Yu.A., Mitrofanov I.M., Poliakov V.Ya., Pospelova T.I., Dolgova N.A. Quality of life in patients with hypertension using pulsed electrotherapy and sodium chloride baths. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2014; 34 (4): 67–72. [In Russian].

10. Николаев Ю.А., Геворгян М.М., Козарук Т.В., Кузнецова А.П., Поляков В.Я. Особенности клинико-биохимических и иммунологических показателей у больных АГ, пришлых жителей Севера, сочетанной с заболеваниями гепатобилиарной системы. *Бюл. СО РАМН*. 2012; (4): 66–71.

Nikolaev Yu.A., Gevorgyan M.M., Kozaruk T.V., Kuznetsova A.P., Polyakov V.Ya. Peculiarities of clinical-biochemical and immunological indicators in patients with AH, alien inhabitants of the North, combined with diseases of the hepatobiliary system. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2012; (4): 66–71. [In Russian].

11. Пальчун В.Т., Кунельская Н.Л., Ротермел Е.В. Диагноз и лечение доброкачественного пароксизмального головокружения. *Вестн. оториноларингологии*. 2007; (1): 4–7.

Palchun V.T., Kunelskaya N.L., Rotermel E.V. Diagnosis and treatment of benign paroxysmal vertigo. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*. 2007; (1): 4–7. [In Russian].

12. Парфенов В.А., Абдулина О.В., Замерград М.В. Периферическая вестибулопатия под маской инсульта. *Неврол. журн*. 2005; (6): 28–32.

Parfenov V.A., Abdulina O.V., Zamergrad M.V. Peripheral vestibulopathy under the guise of stroke. *Neurologicheskiy zhurnal = Neurological Journal*. 2005; (6): 28–32. [In Russian].

13. Пospelova Л.М., Сорокоумов В.А., Белякова Л.А. К вопросу о возможности уточнения тактики лечения атеросклеротического поражения брахиоцефальных артерий с помощью лабораторной диагностики. *Успехи соврем. естествознания*. 2014; (4): 51–55.

Pospelova L.M., Sorokoumov V.A., Belyakova L.A. To the question about the possibility of refinement of tactics of treatment of atherosclerotic lesions of the brachiocephalic arteries using laboratory diagnostics. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2014; (4): 51–55. [In Russian].

14. Рогоза А.Н. Неинвазивные методы определения ригидности магистральных артерий. *Функци. диагностика*. 2007; (3): 17–32.

Ragoza A.N. Non-invasive methods of determining rigidity of great arteries. *Funkcional'naya diagnostika = Functional Diagnostics*. 2007; (3): 17–32. [In Russian].

15. Савенков М.П., Иванова С.В. Артериальная гипертензия при патологии шейного отдела позвоночника. *Рос. кардиол. журн*. 2010; (2): 38–44. doi: 10.15829/1560-4071-2006-0-65-69

Savenkov M.P., Ivanova S.V. Arterial hypertension in the pathology of the cervical spine. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2010; (2): 38–44. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2006-0-65-69

16. Agrawal Y., Carey J.P., Della Santina C.C. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2004. *Arch. Intern. Med*. 2009; 169 (10): 938–944. doi: 10.1001/archinternmed.2009.66

17. Asmar R. Effects of treatment on arterial stiffness and central blood pressure – points to consider. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*. 2015; 17 (2): 105–106. doi: 10.1111/jch.12477

18. Baguet J.P., Kingwell B.A., Dart A.L., Shaw J., Ferrier K.E., Jennings G.L. Analysis of the regional pulse wave velocity by Doppler: methodology and reproducibility. *J. Hum. Hypertens*. 2003; 17 (6): 407–412. doi: 10.1038/sj.jhh.1001566

19. Baloh R.W. Clinical practice. Vestibular neuritis. *N. Engl. J. Med*. 2003; 348 (11): 1027–1034. doi: 10.1056/NEJMcп021154

20. Brandt T., Bronstein A.M. Cervical vertigo. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2001; (71): 8–12. doi: 10.1136/jnnp.71.1.8

21. Coll B., Betriu A., Feinstein S.B., Valdivielso J.M., Zamorano J.L., Fernández E. The role of carotid ultrasound in assessing carotid atherosclerosis in individuals at low-to-intermediate cardiovascular risk. *Rev. Esp. Cardiol*. 2013; (12): 929–934. doi: 10.1016/j.rec.2013.05.030

22. Kulcu D.G., Yanik B., Boynukalin S. Efficacy of a home-based exercise program on benign paroxysmal positional vertigo compared with betahistine. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2008; 37 (3): 373–379. doi: 10.2310/7070.2008.0063

23. Laurent S., Cockcroft J., van Bortel L., Boutouyrie P. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical application. *Eur. Heart J*. 2006; (21): 2588–2605. doi: 10.1093/eurheartj/ehl254

24. Tu S.T., Wang I.W., Lin H.F., Liao Y.Ch., Lin R.T., Liu C.S., Juo S.H. Carotid intima-media thickness and stiffness are independent risk factor of atherosclerotic disease. *J. Investig. Med*. 2010; (6): 786–790. doi: 10.2311/JIM.0b013e3181e8019d

Сведения об авторах:

Поляков В.Я., д.м.н., ORCID: 0000-0002-9606-2331, e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Щепанкевич Л.А., д.м.н., e-mail: shepankevich@rambler.ru

Николаев Ю.А., д.м.н., e-mail: nicol@centercem.ru

Пегова С.В., e-mail: psv-nsk@mail.ru

Новикова Е.Г., к.м.н., e-mail: niiekм@yandex.ru

Севостьянова Е.В., к.м.н., e-mail: luck.nsk@rambler.ru

Information about authors:

Polyakov V.Ya., doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9606-2331, e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Shshepankevich L.A., doctor of medical sciences. e-mail: shepankevich@rambler.ru

Nikolaev Yu.A., doctor of medical sciences, e-mail: nicol@centercem.ru

Pegova S.V., e-mail: psv-nsk@mail.ru

Novikova E.G., candidate of medical sciences, e-mail: niiekм@yandex.ru

Sevostyanova E.V., candidate of medical sciences, e-mail: luck.nsk@rambler.ru

ТРУДНОСТИ ДИАГНОСТИКИ АТИПИЧНОГО ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Наталья Викторовна ФОМИНА^{1,2}, Людмила Данииловна ЧЕСНОКОВА^{1,2},
Ольга Александровна КОНДЕРОВА¹, Светлана Анатольевна СМАКОТИНА^{1,2},
Екатерина Владимировна УТКИНА², Владислав Юрьевич ИСАЕВ²

¹ Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева
650066, г. Кемерово, Октябрьский просп., 22

² Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России
650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а

Представлен случай клинического наблюдения пациентки с атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС). аГУС – заболевание, характеризующееся неблагоприятным прогнозом (тяжелое или катастрофическое течение с быстрым развитием терминальной почечной или полиорганной недостаточности). Цель исследования – оценить подходы дифференциальной диагностики аГУС в клинической практике. **Материал и методы.** Исследование проводилось на базе нефрологического отделения Кемеровской областной клинической больницы имени С.В. Беляева. Представлено клиническое наблюдение пациентки Д. 26 лет. **Результаты и их обсуждение.** Для постановки диагноза аГУС необходимо: 1) диагностировать микроангиопатическую гемолитическую анемию (ее признаки – тромбоцитопения или снижение числа тромбоцитов более чем на 25 % от исходного, поражение внутренних органов (почки, ЦНС, ЖКТ, сердце, легкие)); 2) исключить ГУС, вызванный продуцирующей Шига-токсин *Esherihia coli* (СТЕС-ГУС; отрицательный результат на Шига-токсин в крови и стуле), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), системные заболевания соединительной ткани, катастрофический антифосфолипидный синдром, ВИЧ-инфекцию; 3) определить активность металлопротеиназы ADAMTS13 (ее снижение подтверждает диагноз аГУС); 4) определить содержание компонентов комплемента С3 и С4. У пациентки на первом этапе была диагностирована тромботическая микроангиопатия (содержание тромбоцитов $37 \times 10^9/\text{л}$, концентрация гемоглобина 59 г/л), поражение печени (активность АсАТ, АлАТ и ЛДГ соответственно 55, 60 и 824 ЕД/л), почек (острое почечное повреждение), легких, сердца, головного мозга. На втором этапе были исключены СТЕС-ГУС (шига-токсин в крови и стуле не обнаружен), ТТП (активность ADAMTS13 – 66 %, в то время как референсные значения составляют 93–113 %, а при ТТП она ниже 5–10 %), системные заболевания соединительной ткани, катастрофический антифосфолипидный синдром, ВИЧ-инфекция, сепсис. Содержание компонентов комплемента С3 и С4 было в пределах нормы (соответственно 0,9 и 0,23 г/л), что не исключало диагноз аГУС.

Ключевые слова: тромботическая микроангиопатия, атипичный гемолитико-уремический синдром, система комплемента, ADAMTS13, экулизумаб.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Уткина Е.В., e-mail: Goll1997.2011@mail.ru

Для цитирования: Фомина Н.В., Чеснокова Л.Д., Кондерова О.А., Смакотина С.А., Уткина Е.В., Исаев В.Ю. Трудности диагностики атипичного гемолитико-уремического синдрома. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 92–97. doi: 10.15372/SSMJ20190612

DIFFICULTIES IN DIAGNOSING ATYPICAL HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME

Natalya Viktorovna FOMINA^{1,2}, Lyudmila Daniilovna CHESNOKOVA^{1,2},
Olga Alexandrovna KONDEROVA¹, Svetlana Anatolevna SMAKOTINA^{1,2},
Ekaterina Vladimirovna UTKINA², Vladislav Yuryevich ISAEV²

¹ Kemerovo Regional Clinical Hospital n.a. S.V. Belyaev
650066, Kemerovo, Oktyabr'sky av., 22

² Kemerovo State Medical University of Minzdrav of Russia
650056, Kemerovo, Voroshilov str., 22a

The paper presents the case of clinical observation of a patient with atypical hemolytic-uremic syndrome (aHUS). aHUS is a disease characterized by an unfavorable prognosis (severe or catastrophic course with rapid development of terminal renal or multi-organ failure). The aim of the study is to evaluate the approaches to differential diagnosis of aHUS in clinical practice. **Material and methods.** The study was conducted on the basis of the Nephrology Department of Kemerovo Regional Clinical Hospital n.a. S.V. Belyaev. The clinical observation of patient D., aged 26 years old, is discussed. **Results and discussion.** Diagnosing aHUS requires: 1) diagnosing thrombotic microangiopathy (TMA: thrombocytopenia or decrease in platelet count by more than 25 % of original, visceral damage (kidneys, CNS, gastrointestinal tract, heart, lungs)); 2) ruling out HUS associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC-HUS; negative for Shiga-toxin in blood and stool), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), systemic connective tissue disease, catastrophic antiphospholipid syndrome, HIV infection; 3) assessing the activity of ADAMTS13 (decrease confirms the aHUS diagnosis); 4) proving normal content of complement components C3 and C4 as an additional argument in favor of aHUS diagnosis. At the first stage, the patient was diagnosed with TMA (platelet content $37 \times 10^9/l$, hemoglobin content 59 g/l), LDH up to 824 E/l, liver damage (AST, ALT and LDH activity 55, 60 and 824 U/l, respectively), kidney damage (acute renal damage), lungs, heart, and brain damage. At the second stage the following diagnoses were ruled out: STEC-HUS (Shiga toxin in blood and stool was not detected), TTP (ADAMTS13 activity level was 66 %, whereas reference values are 93–113 %, in TTP – below 5–10 %); systemic connective tissue diseases catastrophic antiphospholipid syndrome, HIV infection sepsis. Normal values of C3 (0.9 g/l) and C4 (0.23 g/l) complement components did not rule out the diagnosis of aHUS.

Key words: thrombotic microangiopathy, atypical hemolytic-uremic syndrome, compliment system, alternative way of activation of the compliment system, eculizumab.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Utkina E.V., e-mail: Goll1997.2011@mail.ru

Citation: Fomina N.V., Chesnokova L.D., Konderova O.A., Smakotina S.A., Utkina E.V., Isaev V.Yu. Difficulties in diagnosing atypical hemolytic uremic syndrome. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 92–97. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190612

Атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС) – редкое заболевание преимущественно генетической природы, которое входит в группу тромботических микроангиопатий [1, 4]. Основным механизмом его развития – хроническая неконтролируемая активация системы комплемента [1], связанная с мутациями генов, ответственных за синтез регуляторных белков альтернативного пути активации комплемента: факторов H, I и B, антител к фактору H, мембранного кофакторного белка (MCP, или CD46), тромбомодулина (TNBD), C3-конвертазы, компонента C3, [2, 4, 5, 7, 11, 13, 15]. Установлено, что генетические мутации в системе комплемента являются не обязательной причиной, а лишь факторами, способствующими развитию аГУС [8]. К триггерам относятся инфекции дыхательных путей и ЖКТ в 30 % случаев, грипп H1N1 [9], ветряная оспа, беременность в 7 % случаев, трансплантация органов в 5 % случаев [10]; пусковые факторы не всегда удается идентифицировать. Распространенность аГУС в России составляет 2–7 случаев на 100 000 населения, около 10 % от распространенности STEC-ГУС (ГУС, вызванный продуцирующей Шига-токсин *Escherichia coli*) [3, 4].

аГУС – клинико-морфологический синдром, в основе которого лежит повреждение эндотелия

сосудов микроциркуляторного русла. Основными симптомами заболевания являются тромбоцитопения и микроангиопатическая (неиммунная) гемолитическая анемия, развивающаяся в результате механического повреждения эритроцитов при контакте с тромбами, заполняющими просвет мелких сосудов. Наблюдается уменьшение числа тромбоцитов, обусловленное их потреблением в процессе микротромбообразования, индуцированного активацией тромбоцитов при взаимодействии с утратившими в результате повреждения естественную тромборезистентность, клетками эндотелия [6–8, 10, 11, 14]. Генерализованное образование тромбов в микроциркуляторном русле приводит к ишемическому повреждению жизненно важных органов: почек, головного мозга, сердца, ЖКТ, легких и других [4, 6, 7, 8, 12]. Исходом рецидивирующего течения заболевания является хроническая болезнь почек [3, 5, 10]. Цель настоящего исследования – оценить подходы дифференциальной диагностики аГУС в клинической практике врача.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В 2017 г. на базе нефрологического отделения ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева» обследовалась па-

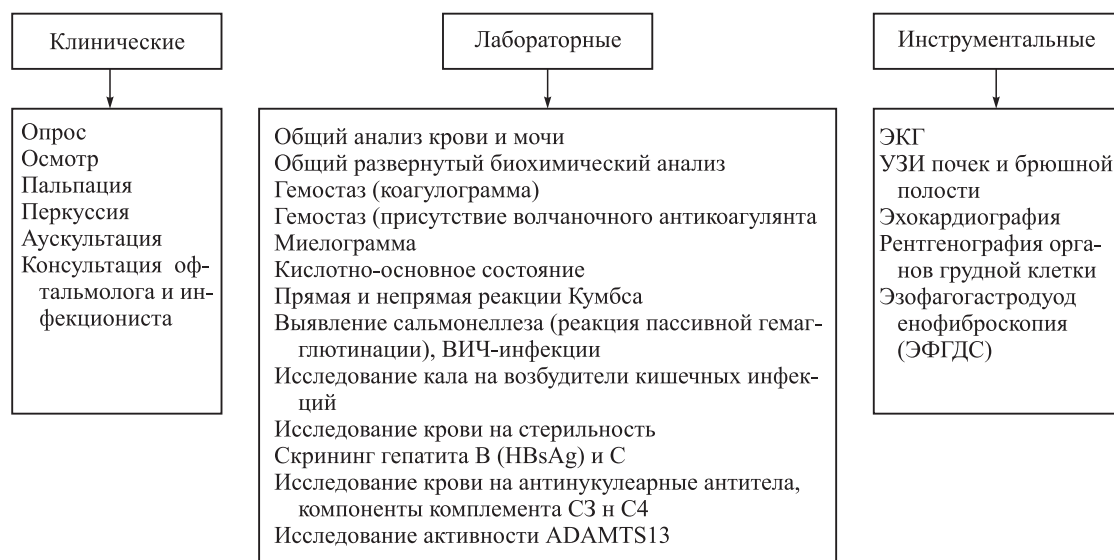


Рис. Методы исследования
Fig. Research methods

циентка Д. 26 лет. Дифференциальный диагноз проводился в соответствии с приведенной на рисунке схемой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентка Д. 26 лет поступила экстренно 02.02.2017 в нефрологическое отделение. *Жалобы*: общая слабость, тошнота, позывы на рвоту, повышение температуры тела до 38 °С, жидкий стул без крови и слизи до 5 раз в сутки на протяжении 5 дней. *Анамнез заболевания*: 08.01.2017 у пациентки повысилась температура тела до 38,5 °С, появились боль в горле, общая слабость. На фоне приема парацетамола в течение 7 дней нормализовалась температура, исчезла боль в горле. 23.01.17 повысилось артериальное давление (АД) до 180/100 мм рт. ст., стала нарастать общая слабость и появилась тошнота, пациентка была госпитализирована по месту жительства. 02.02.2017 была переведена в нефрологическое отделение в связи с нарастающей гиперазотемией, анемией. *Анамнез жизни*. Ранее заболевание почек отрицает, наследственность не отягощена. Во время беременности в 2009 г. в 3-м триместре отмечались повышение АД, изменения в анализах мочи отсутствовали. *Результаты обследования при поступлении*. Общий анализ крови: анемия (содержание эритроцитов $2,09 \times 10^{12}/л$, гемоглобина 66 г/л, гематокрит 21 %), общее содержание лейкоцитов $16,5 \times 10^9/л$, палочкоядерных – 15 %. Общий биохимический анализ крови: содержание креатинина 863 мкмоль/л, мочевины 29,4 ммоль/л (гиперазотемия). Общий анализ мочи: эритроцитурия (эритроциты 15 в поле

зрения). УЗИ почек: правая почка 120 × 54 мм, паренхима 20 мм, левая почка 125 × 54 мм, паренхима 22 мм, паренхима повышенной экзогенности, чашечно-лоханочная система не расширена. В брюшной полости свободная жидкость. Таким образом, на основании синдрома артериальной гипертензии (АГ), мочевого синдрома, гиперазотемии, анемического синдрома, желудочной и кишечной диспепсии, наличия триггерного фактора (фарингеальная инфекция) был выставлен предварительный диагноз – острое почечное повреждение от января 2017 г., ренальное, стадия олигоанурии.

При госпитализации состояние пациентки было оценено как тяжелое. В течение первых трех дней госпитализации сохранялось повышение температуры тела до 37,3 °С, диурез составлял 400–500 мл/сутки, стул жидкий, светлорыжий цвета, без крови и слизи семь раз и более за сутки, появились периферические отеки. 03.02.2017 на фоне консервативной терапии отмечался рост азотемии – содержание мочевины повысилось с 29,4 до 33,2 ммоль/л, креатинина – с 863 до 1156 мкмоль/л, фосфора – до 3 мг/дл. Общий анализ мочи: содержание белка 4,8 г/л, лейкоциты 38 в поле зрения, эритроциты 10 в поле зрения, цилиндры: зернистые 0–2, гиалиновые 2,8 в поле зрения. Проводилась коррекция анемии эритроцитарной массой, трансфузия прошла без осложнений.

03.02.2017 по данным миелограммы злокачественных заболеваний кроветворной системы не было выявлено. При ЭФГДС выявлены признаки эрозивно-геморрагического эзофагита. Прямая и непрямая пробы Кумбса были отрицательные.

В связи с отрицательной динамикой (нарастающие содержания в крови мочевины, креатинина, калия, фосфора) 06.02.2017 был выполнен первый сеанс бикарбонатного диализа. Несмотря на гемодиализ, у пациентки сохранялись азотемия (содержание мочевины 37,2–15,1 ммоль/л; креатинина 1264–877 мкмоль/л), олигоанурия. Прогрессировала анемия (содержание гемоглобина 83–58 г/л), количество тромбоцитов снизилось до 81×10^9 /л. 09.02.2017 и 16.02.2017 были проведены исследование крови на сальмонеллез с помощью реакции пассивной гемагглютинации (О-АГ сальмонеллезный диагностиком комплекс 1 : 100; О-АГ сальмонеллезный диагностиком 1,9,12 = 1 : 200; Ви-антиген, сальмонеллезный диагностиком – отрицательны) и осмотр инфекционистом, кишечная инфекция исключена. Исследование крови на ВИЧ, гемокультуру, гепатиты В и С, сифилис показало их отсутствие.

На фоне лечения с 11.02.2017 отмечалась нормализация температуры тела, уменьшилась частота стула до 1–2 раз в день. Диурез составлял 100 мл/сутки. Сохранялась тяжелая анемия, повысилась активность АсАТ (55 Е/л), АлАТ (60 Е/л), ЛДГ (824 Е/л), появилась гипопропротеинемия (53–48 г/л), гипоальбуминемия (28–26 г/л). Учитывая повышение активности ЛДГ, указывающее на микроангиопатический гемолиз, тромбоцитопению, нарушение функции почек, отправлены образцы крови на исследование активности ADAMTS13 [3, 6, 8, 10, 11, 14, 15], которое составило 66 % (референсные значения 93–113 %), что свидетельствует о тромботической микроангиопатии.

По результатам ультразвуковых, рентгенологических исследований внутренних органов и отрицательных результатов посевов крови на стерильность № 5 был исключен сепсис. Получены отрицательные результаты на антинукулеарные антитела, волчаночный антикоагулянт, нормальные значения содержания компонентов комплекса С3 (0,9 г/л) и С4 (0,23 г/л). 19.02.2017 пациентка отметила ухудшение зрения. Осмотрена офтальмологом и выставлен диагноз: гипертензивная почечная нейроретинопатия. Заключение консилиума в составе заместителя главного врача больницы по лечебной работе, сотрудников кафедры факультетской терапии, заведующего отделением трансфузиологии: учитывая анемию, тромбоцитопению, острую почечную недостаточность, АГ, отсутствие суставного синдрома, кожного синдрома, выставлен диагноз ГУС, в план дифференциального диагноза включен аГУС. назначены инфузии свежзамороженной плазмы, рекомендовано назначение экулизумаба.

Учитывая тяжелое состояние пациентки, она была переведена в отделение реанимации. После

введения свежзамороженной плазмы в объеме 1980 мл состояние пациентки ухудшилось, нарастала одышка, частота сердечных сокращений 140 в минуту, повысилось АД до 200/100 мм рт. ст. Аускультативно в легких выслушивалось жесткое дыхание, ослабленное в нижних отделах, больше слева, появились влажные хрипы. По рентгенографии органов грудной клетки застой в малом круге кровообращения, двухсторонний гидроторакс. Проводилась постоянная инфузия нитроглицерином 4–6 мл/ч. 20.02.2017 состояние ухудшалось, нарастала дыхательная недостаточность, нарушилось сознание. Пациентка была переведена на искусственную вентиляцию легких. 23.02.2017 состояние оставалось крайне тяжелым, было обусловлено синдромом полиорганной недостаточности. Отмечалось снижение АД до 114/64 мм рт. ст., развилась анурия. 24.02.2017 наблюдалась гипотония АД 50/20 мм рт. ст. на фоне введения прессорных дозировок адреналина, по ЭКГ синусовый ритм сменился на идиовентрикулярный с короткими пароксизмами фибрилляции желудочков. Реанимационные мероприятия были не эффективны и в 19:00 была констатирована смерть пациентки. Экулизумаб пациентке не вводился в связи с его отсутствием в Кемеровской области. Фирма, выпускающая данный препарат, была готова предоставить его за счет спонсорской помощи, однако не успела поставить в клинику. По данным вскрытия непосредственная причина смерти: легочно-сердечная недостаточность. Клинический и патолого-анатомический диагноз совпали.

Таким образом, диагностика аГУС в данном случае представлялась достаточно сложной задачей, требующей исключения других тромботических микроангиопатий. Проводился дифференциальный диагноз между первичными (тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), STEC-ГУС и аГУС) и вторичными тромботическими микроангиопатиями (системные заболевания соединительной ткани, катастрофический антифосфолипидный синдром, ВИЧ-инфекция). В соответствии с представленной таблицей пациентке был выставлен диагноз аГУС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализированный клинический случай доказывает, что необходим дифференцированный подход к основным формам тромботических микроангиопатий. Для постановки диагноза аГУС необходимо:

1) диагностировать тромботическую микроангиопатию, признаками которой служат тромбоцитопения или снижение числа тромбоцитов на

Таблица. Особенности дифференциальной диагностики аГУС

Table. Features of aHUS differential diagnostics

| Диагностика тромботической микроангиопатии | |
|---|--|
| Тромбоцитопения | Есть – содержание тромбоцитов $37 \times 10^9/\text{л}$. |
| Микроангиопатический гемолиз | Есть – содержание гемоглобина до 59 г/л, активность ЛДГ 824 ЕД/л, отрицательная прямая и непрямая пробы Кумбса |
| Признаки поражения почек и/или экстраренальные поражения | Протеинурия (белок в суточной моче 15,8 г/л), лейкоцитурия (122 лейкоцита в поле зрения), эритроцитурия (38 эритроцитов в поле зрения) Гипоальбуминемия (содержание белка 28–26 г/л), азотемия (содержание мочевины 35,3 ммоль/л, креатинина 1206 мкмоль/л) Поражение ЖКТ (эрозии по ЭФГДС, диарея) Поражение печени (активность АсАТ 55 Е/л, АлАТ 60 Е/л) Поражение ЦНС (нарушение зрения, кома) Поражение сердца, легких (гидроперикард, гидроторакс, застой в малом круге кровообращения, нарушения ритма) |
| Исключение STEC-ГУС | |
| Шига-токсин в крови и стуле | Не выявлен |
| Исключение ТТП | |
| Активность ADAMTS13 | Активность ADAMTS13 составляла 66 % (при ТТП активность ADAMTS13 ниже 5–10 %) |
| Исследование крови на содержание компонентов комплемента C3 и C4 | |
| Содержание C3, C4 | Содержание C3 – 0,9 г/л (норма), C4 – 0,23 г/л (норма) |
| Исключение системных заболеваний | |
| Системные заболевания соединительной ткани (системная красная волчанка и др.), катастрофический антифосфолипидный синдром | Отсутствуют (отсутствуют клинико-лабораторные диагностические критерии системных заболеваний соединительной ткани, антинуклеарные антитела, волчаночный антикоагулянт в крови) |
| Исключение ВИЧ-инфекции | |
| Маркеры ВИЧ-инфекции, сепсиса | Отрицательные |

25 % от исходного и более, поражение внутренних органов (почки, ЦНС, ЖКТ, сердце, легкие и т.д.);

2) исключить STEC-ГУС (на основании исключения наличия шига-токсина в крови и стуле);

3) исключить ТТП, системные заболевания соединительной ткани, катастрофический антифосфолипидный синдром, ВИЧ-инфекцию;

4) определить активность ADAMTS-13, снижение которой подтверждает диагноз аГУС;

5) определить содержание компонентов комплемента C3 и C4 (нормальные показатели могут служить дополнительным аргументом в пользу этого диагноза) [3].

На сегодняшний день единственным препаратом для лечения аГУС является экулизумаб. Учитывая, что у больных аГУС наблюдается постоянная неконтролируемая активация комплемента, риск развития внезапных осложнений сохраняется на протяжении всей жизни, в связи с чем таким пациентам рекомендуется постоянное проведение терапии экулизумабом [3–6, 10, 12,

14]. Возможно, своевременное назначение данного препарата повлияло бы на исход заболевания у пациентки Д.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батюшин М.М., Руденко Л.И., Кожин А.А., Голуб В.В., Данькин О.Н., Грекова И.А. Атипичный гемолитико-уремический синдром. Клинические наблюдения. *Нефрология*. 2014; 18 (5): 80–84.

Batyushin M.M., Rudenko L.I., Kozhin A.A., Golub V.V., Dan'kin O.N., Grekova I.A. Atypical hemolytic uremic syndrome. Clinical observations. *Nefrologiya = Nephrology*. 2014; 18 (5): 80–84. [In Russian].

2. Демьянова К.А., Козловская Н.Л., Боброва Л.А., Козлов Л.В., Андина С.С., Юрова В.А., Кучиева А.М., Рошупкина С.В., Шилов Е.М. Сравнительный анализ изменений в системе комплемента при катастрофическом антифосфолипидном синдроме и атипичном гемолитико-уремическом синдроме. *Вестн. РАМН*. 2017; 72 (1): 42–52. doi: 10.15690/vramn769

- Dem'yanova K.A., Kozlovskaya N.L., Bobrova L.A., Kozlov L.V., Andina S.S., Yurova V.A., Kuchieva A.M., Roshchupkina S.V., Shilov E.M. Complement system abnormalities in patients with atypical hemolytic uremic syndrome and catastrophic antiphospholipid syndrome. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017; 72 (1): 42–52. [In Russian]. doi: 10.15690/vramn769
3. Козловская Н.Л., Прокопенко Е.И., Эмирова Х.М., Серикова С.Ю. Клинические рекомендации по диагностике и лечению атипичного гемолитико-уремического синдрома. *Нефрология и диализ*. 2015; 17 (3): 242–264.
- Kozlovskaya N.L., Prokopenko E.I., Emirova Kh.M., Serikova S.Yu. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of atypical hemolytic uremic syndrome. *Nefrologiya i dializ = Nephrology and Dialysis*. 2015; 17 (3): 242–264. [In Russian].
4. Лора Ш., Фремю-Бачи В. Атипичный гемолитико-уремический синдром. *Нефрология*. 2012; 16 (2): 16–48. doi: 10.1186/1750-1172-6-60
- Lora Sh., Fremyu-Bachi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Nefrologiya = Nephrology*. 2012; 16 (2): 16–48. [In Russian]. doi: 10.1186/1750-1172-6-60
5. Afshar-Kharghan V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2016; (1): 217–225. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.217
6. Brocklebank V., Wood K.M., Kavanagh D. Thrombotic microangiopathy and the kidney. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 13 (2): 300–317. doi: 10.2215/CJN.00620117
7. Jokiranta T.S. HUS and atypical HUS. *Blood*. 2017; 129 (21): 2847–2856. doi: 10.1182/blood-2016-11-709865
8. Kavanagh D., Raman S., Sheerin N.S. Management of hemolytic uremic syndrome. *F1000Prime Rep*. 2014; 6: 119. doi: 10.12703/P6-119
9. Kobbe R., Schild R., Christner M., Oh J., Loos S., Kemper M.J. Case report – atypical hemolytic uremic syndrome triggered by influenza B. *BMC Nephrol*. 2017; 18 (1): 1–4. doi: 10.1186/s12882-017-0512-y
10. Loirat C., Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J. Rare Dis*. 2011; 6: 60. doi: 10.1186/1750-1172-6-60
11. Rafiq A., Tariq H., Abbas N., Shenoy R. Atypical hemolytic-uremic syndrome: a case report and literature review. *Am. J. Case Rep*. 2015; 16: 109–114. doi: 10.12659/AJCR.892907
12. Rodriguez E., Barrios C., Soler M.J. Should eculizumab be discontinued in patients with atypical hemolytic uremic syndrome? *Clin. Kidney J*. 2017; 10 (3): 320–322. doi: 10.1093/ckj/sfx024
13. Yoshida Y., Kato H., Ikeda Y., Nangaku M. Pathogenesis of atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Atheroscler. Thromb*. 2019; 26 (2): 99–110. doi: 10.5551/jat.RV17026
14. Yenerel M.N. Atypical hemolytic uremic syndrome: Differential diagnosis from TTP/HUS and management. *Turk. J. Haematol*. 2014; 31 (3): 216–225. doi: 10.4274/tjh.2013.0374
15. Zhang K., Lu Y., Harley K.T., Tran M.H. Atypical hemolytic uremic syndrome: a brief review. *Hematol. Rep*. 2017; 9 (2): 7053. doi: 10.4081/hr.2017.7053

Сведения об авторах:

Фомина Н.В., д.м.н., e-mail: natafomin11@mail.ru
Чеснокова Л.Д., e-mail: lches48@mail.ru
Кондерова О.А., e-mail: olga-konderova@list.ru
Смакотина С.А., д.м.н., e-mail: smak67@mail.ru
Уткина Е.В., e-mail: goll1997.2011@mail.ru
Исаев В.Ю., e-mail: vasy.vasichkin@bk.ru

Information about authors:

Fomina N.V., doctor of medical sciences, e-mail: natafomin11@mail.ru
Chesnokova L.D., e-mail: lches48@mail.ru
Konderova O.A., e-mail: olga-konderova@list.ru
Smakotina S.A., doctor of medical sciences, e-mail: smak67@mail.ru
Utkina E.V., e-mail: goll1997.2011@mail.ru
Isaev V.Yu., e-mail: vasy.vasichkin@bk.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ САМООЦЕНКИ И ОБЪЕКТИВНОГО СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ У СТУДЕНТОВ МЛАДШИХ КУРСОВ МЕДИЦИНСКИХ И ГУМАНИТАРНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

Владимир Вячеславович КУЗНЕЦОВ¹, Ирина Геннадьевна КУЗИНА², Кирилл Владимирович КОСИЛОВ^{1,2}, Евгений Андреевич СМИРНОВ¹, Екатерина Кирилловна КОСИЛОВА¹, Руслан Андреевич БАЙРАМОВ¹

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России 690002, г. Владивосток, просп. Острякова, 2

² Дальневосточный федеральный университет Минобрнауки России 690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

Цель исследования – определить уровень самооценки качества жизни, связанного со здоровьем (КЖСЗ), и соотносить его с объективным состоянием здоровья студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей. **Материал и методы.** Исследование проводилось в Дальневосточном федеральном университете (ДФУ) и в Тихоокеанском Государственном медицинском университете (ТГМУ) с 10.12. 2017 по 10.06.2018. В нем приняли участие 479 студентов младших (1–3) курсов, из них 228 (47,5 %) обучались специальностям медицинского направления в ДФУ и ТГМУ, 251 (52,5 %) – специальностям гуманитарного профиля (ДФУ). Средний возраст студентов составил $19,5 \pm 1,9$ года, средняя частота отклика – 94,2 %. Отбор проводился с использованием принципов стратифицированной по половому признаку рандомизации. Состояние здоровья студентов оценивалось по наличию хронических заболеваний и уровню индекса коморбидности Чарлсона. При сборе данных использовались карты амбулаторного пациента (Форма 025/у), журналы учета приема больных (Форма 001-1/у), врачебно-контрольные карты диспансерного наблюдения (Форма 062/у). Для самооценки КЖСЗ применялась анкета «Краткая форма самооценки КЖСЗ MOS SF-36v2» (MOS SF – Medical Outcomes Study Short Form version 2). Демографический и социально-экономический статус определялся с помощью специальной анкеты. **Результаты и их обсуждение.** Показатель КЖСЗ у студентов медицинских специальностей оказался связан с частотой обращаемости за врачебной помощью ($r = 0,75; p < 0,01$), индексом коморбидности ($r = 0,43; p < 0,05$) и средним числом имеющихся у респондентов хронических заболеваний ($r = 0,49; p < 0,05$). Взаимосвязь суммарного показателя КЖСЗ с физическим и психическим компонентами самооценки КЖ также оказалась достаточно сильной (соответственно $r = 0,69; p < 0,01$ и $r = 0,59; p < 0,01$). У студентов гуманитарных специальностей показатель КЖСЗ был (помимо физического и психического компонента КЖ) связан лишь со средним числом хронических заболеваний ($r = 0,69; p < 0,05$). Таким образом, 76,0 % студентов медицинских и гуманитарных специальностей на младших курсах имеют хронические заболевания внутренних органов; наиболее часто встречаются заболевания пищеварительной (30–33 %), мочеполовой (10–14 %), респираторной (7–10 %) и нервной (6–10 %) систем. КЖСЗ у студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей достоверно не различается и оценивается ими как удовлетворительное.

Ключевые слова: самооценка здоровья, качество жизни, состояние здоровья, студенты, медицинское и гуманитарное образование, вопросы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Косилов К.В., e-mail: oton2000@mail.ru

Для цитирования: Кузнецов В.В., Кузина И.Г., Косилов К.В., Смирнов Е.А., Косилова Е.К., Байрамов Р.А. Сравнительный анализ самооценки и объективного состояния здоровья у студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 98–106. doi: 10.15372/SSMJ20190613

COMPARATIVE ANALYSIS OF SELF-ASSESSMENT AND OBJECTIVE STATE OF HEALTH IN STUDENTS OF JUNIOR COURSES OF MEDICAL AND HUMANITARIAN SPECIALTIES

Vladimir Vyacheslavovich KUZNETSOV¹, Irina Gennadyevna KUZINA²,
Kirill Vladimirovich KOSILOV^{1,2}, Evgeniy Andreevich SMIRNOV¹,
Ekaterina Kirillovna KOSILOVA¹, Ruslan Andreevich BAYRAMOV¹

¹ Pacific State Medical University of Minzdrav of Russia
690002, Vladivostok, Ostryakov av., 2

² Far Eastern Federal University of Minobrnauki of Russia
690091, Vladivostok, Sukhanov str., 8

Aim of the study was to determine the level of self-assessment of health-related quality of life (HRQoL) and its relationship with the objective state of health in students of junior courses of medical and humanitarian specialties. **Materials and methods.** The study has been conducted at the Far Eastern Federal University (FEFU) and at the Pacific State Medical University (TSMU) since December 10, 2017 to June 10, 2018. It was attended by 479 students of junior (1–3) courses, of which 228 (47.5 %) studied medical specialties at FEFU and TSMU, 251 (52.5 %) studied humanitarian specialties (FEFU). The average age of students was 19.5 ± 1.9 years, the average response rate – 94.2 %. The selection was carried out using the principles of gender-stratified randomization. The state of health of the students was assessed by the presence of chronic diseases and the level of the Charlson comorbidity index. In the collection of data used outpatient cards (Form 025/y); patient registration logs (Form 001-1/y); medical control cards of follow-up (Form 062/y). For the self-assessment of HRQoL, a questionnaire was used: «A short form of self-assessment of HRQoL, MOS SF-36v2» (Medical Outcomes Study Short Form version 2). The demographic and socio-economic status was determined using a special questionnaire. **Results and discussion.** HRQoL indicator in medical students turned out to be related to the frequency of seeking medical help ($r = 0.75$; $p < 0.01$), the comorbidity index ($r = 0.43$; $p < 0.05$) and the average number of chronic diseases among respondents ($r = 0.49$; $p < 0.05$). The relationship between the total HRQoL and the physical and mental components of QoL self-assessment also proved to be quite strong ($r = 0.69$; $p < 0.01$; $r = 0.59$; $p < 0.01$, respectively). In students of humanitarian specialties HRQoL appeared (in addition to the physical and mental component of QoL) to be interrelated only with the average number of chronic diseases ($r = 0.69$; $p < 0.05$). Thus, 76,0 % of students of medical and humanitarian specialties have undergone chronic diseases of internal organs in junior courses. Diseases of the digestive (30–33 %), urogenital (10–14 %), respiratory (7–10 %) and nervous systems (6–10 %) are most common in the student environment. HRQoL in the students of junior courses of medical and humanitarian specialties does not significantly differ and is rated by them as satisfactory.

Key words: self-assessment of health, health-related quality of life, health status, students, medical and humanitarian education, questionnaires.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Kosilov K.V., e-mail: oton2000@mail.ru

Citation: Kuznetsov V.V., Kuzina I.G., Kosilov K.V., Smirnov E.A., Kosilova E.K., Bayramov R.A. Comparative analysis of self-assessment and objective state of health in students of junior courses of medical and humanitarian specialties. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 98–106. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190613

Состояние здоровья и уровень заболеваемости студентов напрямую связаны с эффективностью овладения ими профессиональными компетенциями и навыками. Между тем до 65 % обучающихся в высших учебных заведениях Российской Федерации имеют хронические соматические заболевания [4, 8, 12]. Высокий уровень хронической патологии среди студентов не детерминирован одной-двумя причинами, а связан с влиянием множества разнородных факторов: от демографических и социально-экономических до

экологических, физиологических, алиментарных и ряда других [5, 14, 15]. Многие исследователи в настоящее время обращают внимание на самооценку студентами качества жизни, связанного со здоровьем (КЖСЗ). Объективное состояние здоровья и его субъективное восприятие могут сильно отличаться у одного и того же индивида, и самооценка физического и психического статуса представляет собой отдельный фактор, коррелирующий с успеваемостью и успешностью овладения профессиональными навыками [7, 9, 10].

Ложные, неадекватные представления о своем текущем физическом и психическом состоянии, их неверная, некорректная интерпретация, с учетом существенных компенсаторных возможностей молодого организма, может изменить поведение студента в отношении здоровья в негативную сторону, привести к формированию девиантных поведенческих стратегий [2, 11].

Медицинское и гуманитарное образование имеет свою специфику и может быть связано с чрезмерными психоэмоциональными, интеллектуальными и физическими нагрузками. Часто студенты сталкиваются с серьезными трудностями и проблемами при овладении узкопрофессиональными компетенциями. В то же время в научной литературе практически отсутствует анализ влияния субъективной оценки состояния здоровья студентов медицинских и гуманитарных направлений на успешность обучения, ее взаимосвязи с объективным состоянием здоровья [2, 5, 10, 11]. Изучение самооценки состояния здоровья и КЖСЗ в настоящее время являются актуальным направлением исследования мотиваций здоровьесберегающего поведения студенческой молодежи начального периода обучения [7, 9–11]. Исходя из предположения, что влияние субъективной самооценки здоровья на выбор поведенческой стратегии, а значит, и успешность обучения слабо освещены в текущей научной литературе, мы сформулировали следующую цель исследования: изучить взаимосвязь КЖСЗ с объективным состоянием здоровья у студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с 10.12.2017 по 10.06.2018 в Дальневосточном федеральном университете (ДВФУ) и в Тихоокеанском Государственном медицинском университете (ТГМУ). При отборе студентов использовалась стратифицированная рандомизация с обеспечением равного гендерного представительства. «Ослепление» исследователя, проводившего статистический анализ результатов, осуществлялось за счет обезличивания файлов с индивидуальной информацией. Каждому информационному пакету присваивался случайный порядковый номер с использованием генератора случайных чисел. В исследовании приняли участие 479 студентов младших (1–3) курсов, из них 228 (47,5 %) обучались специальностям медицинского направления в ДВФУ и ТГМУ, 251 (52,5 %) – специальностям гуманитарного профиля (ДВФУ). Средний возраст студентов составил $19,5 \pm 1,9$ года, средняя частота отклика – 94,2 %.

Критерии включения: обучение медицинским или гуманитарным специальностям на 1–3 курсах ДВФУ или ТГМУ, критерии исключения – академический отпуск по болезни, неуспеваемости, наличие второго высшего образования. Объективное состояние здоровья студентов верифицировалось по наличию хронических заболеваний с расчетом числа заболеваний на одного студента в год и индекса коморбидности Чарлсона. Информационными источниками верификации служили амбулаторные карты пациента (Форма 025/у), журналы учета приема больных (Форма 001-1/у), врачебно-контрольные карты диспансерного наблюдения (Форма 062/у). Индекс коморбидности Чарлсона рассчитывали в соответствии с таблицей рангов хронических заболеваний по листу уточненных диагнозов (Форма 025/у). Для работы с личными данными было получено письменное информированное согласие студентов и администраций лечебно-профилактических учреждений.

Для самооценки КЖСЗ студенты самостоятельно заполняли стандартизованную анкету «Краткая форма самооценки КЖСЗ MOS SF-36v2» (MOS SF – Medical Outcomes Study Short Form version 2), валидизированную для использования в Российской Федерации. При самооценке физического состояния и здоровья (ФЗ) студенты отвечали на вопросы из доменов физического функционирования (ФФ), ролевого функционирования (РФ), соматической (телесной) боли (СБ), общего самочувствия (ОС), при самооценке психического статуса – на вопросы из доменов жизнестойкости (ЖС), социального функционирования (СФ), эмоционального статуса (ЭС), психологического комфорта (ПК). Каждый домен оценивался в диапазоне от 0 до 100 баллов. Среднее значение самооценок физического (ФЗ) и психического здоровья (ПЗ) определялось как композитная (общая) оценка КЖСЗ респондента. В соответствии с рекомендациями авторов вопросника, а также исследователей, проводивших его валидизацию на русском языке, уровень значений переменных в каждом блоке, превышающий 50 баллов, расценивался как удовлетворительная самооценка исследуемой функции [18, 19]. Вопросник прошел проверку конструктивной, критериальной и дискриминантной валидности и применяется в Российской Федерации при исследовании качества жизни, связанного со здоровьем, более 10 лет [3, 13].

Данные о демографическом и социально-экономическом статусе были собраны с помощью специальной анкеты качества жизни студентов [16], которая состоит из независимых блоков вопросов, касающихся демографического, экономического, финансового, социального статуса респондента, а также содержит вопросы об условиях проживания и обучения, о качестве обра-

зовательного процесса, поведении в отношении здоровья, организационно-бытовых условиях и характеристиках учебного процесса. Каждый пункт оценивается в диапазоне от 0 (минимальное значение) до 5 баллов (максимальное). Состояние академической успеваемости студентов, принявших участие в исследовании, оценивалось по итоговым отчетным семестровым формам факультетов и департаментов вузов.

Расчет объема выборочной совокупности проводился с учетом стандартного распределения значений подобных параметров в ранее проведенных исследованиях. Непрерывные переменные представлены в виде среднего арифметического и среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$), номинальные данные – в виде относительных частот объектов исследования ($n, \%$). Для оценки различий количественных данных использовали критерий Стьюдента, для номинальных данных –

точный критерий Фишера. Взаимосвязь переменных оценивалась с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 22 (4,6 %) случаях от респондентов не было получено полных данных. Это объяснялось допущенными при заполнении анкет ошибками или отказом отвечать на конкретный вопрос (в 15 случаях – о личном и семейном доходе). Анализ соотношения полных и неполных данных (тест Вальда) показал, что влияние недостающих данных на сравнение параметров не достоверно.

Демографические характеристики, социально-экономический статус и связанные со здоровьем характеристики, представленные в табл. 1,

Таблица 1. Демографические характеристики, социально-экономический статус и характеристики, связанные со здоровьем, у студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей ДВФУ и ТГМУ ($n = 479$)

Table 1. Demographic characteristics, socio-economic status and health-related characteristics in junior students of medical and humanitarian specialties FEFU and PSMU ($n = 479$)

| Переменная | Специальности | |
|---|---------------------------|----------------------------|
| | медицинские ($n = 228$) | гуманитарные ($n = 251$) |
| Средний возраст | 19,8 ± 2,4 | 19,3 ± 1,6 |
| Ежемесячный индивидуальный доход, тыс. руб. | 5,34 ± 0,95 | 5,94 ± 0,78 |
| Ежемесячный доход домохозяйства, тыс. руб. | 69,5 ± 12,4 | 73,6 ± 13,6 |
| Условия проживания* | 3,2 ± 1,2 | 3,9 ± 1,3 |
| Условия обучения* | 3,4 ± 0,6 | 4,2 ± 1,1 |
| Качество питания* | 3,6 ± 1,3 | 3,3 ± 0,4 |
| Число хронических заболеваний | 0,6 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 |
| Индекс коморбидности Чарлсона | 0,6 ± 0,4 | 0,6 ± 0,2 |
| Число обращений к врачу за год | 1,8 ± 0,9 | 2,4 ± 0,9 |
| Употребление алкоголя* | 0,8 ± 0,4 | 1,2 ± 0,3 |
| Курение (интенсивность)* | 2,0 ± 1,2 | 1,5 ± 0,3 |
| Занятия спортом (эпизодов в неделю) | 2,5 ± 1,2 | 2,9 ± 0,8 |
| Семейный статус (состоит в браке), n (%) | 21 (9,2) | 23 (9,2) |
| Наличие детей, n (%) | 14 (6,1) | 9 (3,6) |
| Проживание в сельской местности, n (%) | 94 (41,2) | 115 (45,8) |
| Проживание в городском округе, n (%) | 134 (58,8) | 136 (54,2) |
| Направление обучения | | |
| медицинская биофизика (ДВФУ), n (%) | 46 (20,2) | 0 |
| медицинская биохимия (ДВФУ), n (%) | 33 (14,5) | 0 |
| педиатрия (ТГМУ), n (%) | 38 (16,7) | 0 |
| лечебное дело (ТГМУ), n (%) | 77 (33,8) | 0 |
| стоматология (ТГМУ), n (%) | 34 (14,9) | 0 |
| социология (ДВФУ), n (%) | 0 | 83 (33,7) |
| социальная работа (ДВФУ), n (%) | 0 | 63 (25,1) |
| массовые коммуникации (ДВФУ), n (%) | 0 | 92 (36,6) |
| теология (ДВФУ), n (%) | 0 | 13 (5,2) |

Примечание. * – значение в баллах, от 1 до 5.

Таблица 2. Состояние здоровья и заболеваемость у студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей ДВФУ и ТГМУ ($n = 479$)**Table 2.** The state of health and morbidity in junior students of medical and humanitarian specialties FEFU and PSMU ($n = 479$)

| Переменная | Специальности | |
|---|---------------------------|----------------------------|
| | медицинские ($n = 228$) | гуманитарные ($n = 251$) |
| Болезни сердечно-сосудистой системы (I00-I99), n (%) | 5 (2,2) | 2 (0,8) |
| Болезни респираторной системы (J00-J99), n (%) | 17 (7,4) | 25 (10,0) |
| Болезни пищеварительной системы (K00-K99), n (%) | 69 (30,3) | 85 (33,9) |
| Болезни мочеполовой системы (N00-N99), n (%) | 34 (14,9) | 27 (10,8) |
| Заболевания опорно-двигательного аппарата и соединительной ткани (M00-M99), n (%) | 10 (4,4) | 4 (1,6) |
| Эндокринные заболевания (E00-E99), n (%) | 7 (3,1) | 12 (4,8) |
| Болезни нервной системы (G00-G99), n (%) | 23 (10,1) | 16 (6,4) |
| Другие | 18 (7,9) | 10 (4,0) |
| Всего | 183 (80,3) | 181 (72,1) |
| Число обращений за медицинской помощью, в год на 1 студента | $1,9 \pm 0,7$ | $2,4 \pm 1,3$ |
| Индекс коморбидности Чарлсона | $1,1 \pm 0,2$ | $0,7 \pm 0,7$ |
| Число дней пропуска по болезни за год | $9,8 \pm 3,8$ | $11,8 \pm 2,7$ |

Примечание. Перечень заболеваний приводится в соответствии с МКБ-10.

оказались однородными у студентов разных направлений, достоверных различий между средними значениями переменных не выявлено. Заболевания желудочно-кишечного тракта встречались наиболее часто как у студентов медицинских направлений, так и у их сверстников, получающих гуманитарное образование (табл. 2). Достаточно распространенными среди исследуемого контингента оказались урологические заболевания, хроническая патология системы дыхания, нервной системы. Частота хронической заболеваемости у студентов медицинских специальностей выше, чем у гуманитариев ($p = 0,0419$).

Число обращений за медицинской помощью и дней, пропущенных по болезни в год, оказалось сравнительно небольшим у студентов обоих направлений.

Характеристики физического и психического состояния студентов, согласно их самооценке, представлены на рисунке. Более высокие оценки физического состояния оказались характерны для студентов медицинских специальностей, в то время как студенты гуманитарных специальностей лучше оценивали свой психический статус (различия статистически не значимы). Общая оценка КЖСЗ у медиков и гуманитариев оказалась практически идентичной.

В табл. 3 представлены корреляции между объективными и субъективными показателями здоровья студентов младших курсов исследуемой группы. Показатель КЖСЗ у студентов медицин-

ских специальностей оказался наиболее жестко связан с частотой обращаемости за врачебной помощью, индексом коморбидности и средним числом имеющихся у респондентов хронических заболеваний. Взаимосвязь суммарного показателя КЖ с физическим и психическим компонентами самооценки качества жизни также оказалась достаточно сильной. У студентов гуманитарных специальностей показатель КЖСЗ оказался (помимо физического и психического компонента КЖ) взаимосвязан лишь со средним числом хронических заболеваний.

ОБСУЖДЕНИЕ

Общий уровень хронической заболеваемости у студентов обоих направлений оказался очень высок, ее величина соответствует полученным другими авторами и даже несколько их превышает [4, 8]. Надо отметить, что преобладание тех или иных нозологических форм в структуре студенческой заболеваемости несколько варьирует у разных авторов, что может быть связано с особенностями организации учебного процесса в вузе, доступностью медицинской помощи, климатическими условиями местности расположения конкретного вуза, рядом других факторов. Тем не менее явное преобладание заболеваний пищеварительной системы в структуре студенческой заболеваемости, отмеченное в нашем исследовании, хорошо согласуется с данными дру-

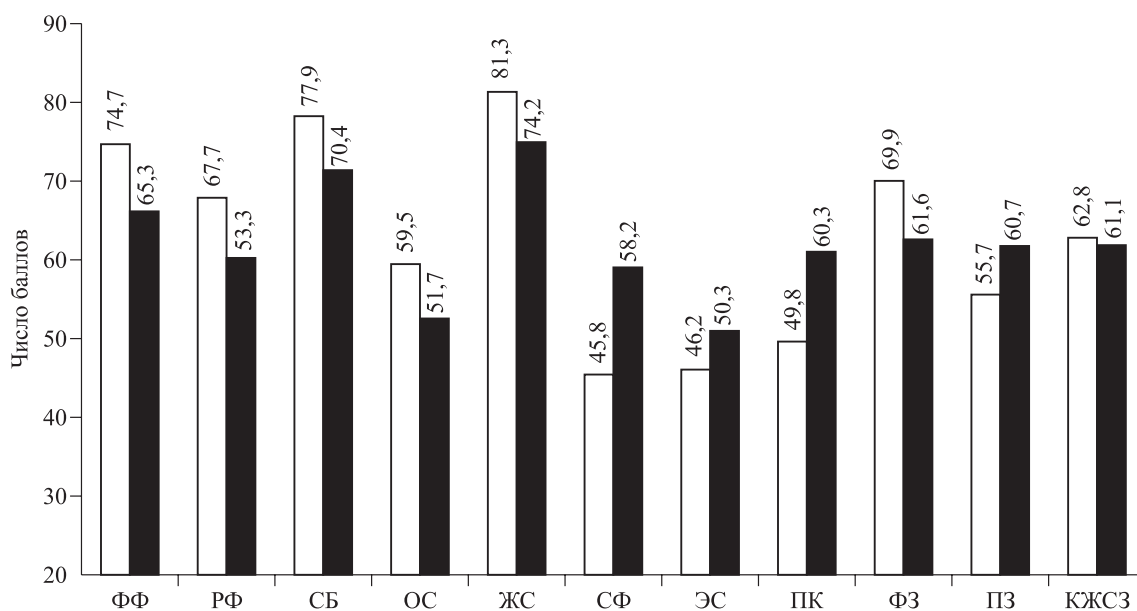


Рис. Самооценка КЖСЗ у студентов медицинских (белые столбики) и гуманитарных (черные столбики) специальностей ДВФУ и ТГМУ (n = 479) по вопросу MOS SF-36v2

Fig. HRQoL self-assessment in student of medical (white column) and humanitarian (black column) specialties

Таблица 3. Корреляционная матрица взаимосвязи объективных переменных состояния здоровья и субъективных переменных самооценки физического и психического состояния у студентов младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей ДВФУ и ТГМУ (n = 479)

Table 3. The correlation matrix of the relationship between objective variables of the state of health and subjective variables of self-assessment of physical and mental state of students in junior students of medical and humanitarian specialties FEFU and PSMU (n = 479)

| | КЖСЗ | ФЗ | ПЗ | ИК | ЧОЗ | ДП | ЧЗ |
|------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|
| КЖСЗ | | 0,69** | 0,59** | 0,43* | 0,75** | 0,27 | 0,49* |
| ФЗ | 0,71** | | 0,56** | 0,37* | 0,72** | 0,12 | 0,55* |
| ПЗ | 0,81** | 0,63* | | 0,14 | 0,20 | 0,11 | 0,05 |
| ИК | 0,35 | 0,45* | 0,14 | | 0,53* | 0,23 | 0,54* |
| ЧОЗ | 0,25 | 0,82** | 0,09 | 0,69* | | 0,31* | 0,47* |
| ДП | 0,11 | 0,17 | 0,11 | 0,13 | 0,73** | | 0,34 |
| ЧЗ | 0,39* | 0,26 | -0,16 | 0,43* | 0,56** | 0,29 | |

Примечание. Вверху справа – медицинские специальности, внизу слева – гуманитарные; субъективные переменные – самооценка КЖСЗ, ФЗ и ПЗ, объективные – индекс коморбидности Чарлсона (ИК), частота обращаемости по заболеваниям (ЧОЗ), число дней пропуска по болезни в год (ДП), среднее число заболеваний (ЧЗ); обозначены статистически значимые коэффициенты корреляции (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$).

гих авторов и наиболее рационально может быть объяснено серьезными нарушениями в распорядке питания, недоступностью качественных продуктов, «сухомыткой», связанной с неудобным расписанием занятий, и тому подобными обстоятельствами [1, 6, 14, 15, 17]. Кроме того, установлено, что частота хронической заболеваемости у студентов медицинских специальностей (80,3 %) достоверно больше, чем у гуманитариев (72,1 %), за счет высокого уровня патологии нервной и мочеполовой систем. Это может быть связано с

более интенсивными аудиторными нагрузками, в том числе во вторую половину дня, характерными для процесса обучения студентов-медиков. Тем не менее эти результаты требуют дальнейшего, более углубленного исследования и интерпретации.

Согласно полученным данным, КЖСЗ у студентов обоих направлений достоверно не различалось и расценивалось респондентами в среднем как удовлетворительное (соответственно 62,8 и 61,1 балла, $p > 0,05$). По данным текущей научной

литературы, самооценки КЖСЗ студентами (согласно MOS-36SFv2) значительно различаются и составляют от 35 до 72 балла, однако большинство авторов указывают на более строгий диапазон 55–65 баллов [2, 7, 9, 10]. В него попадают и результаты нашего исследования, которые, очевидно, вступают в некоторое противоречие с объективными данными о наличии хронических заболеваний у большинства участников исследования. Однако, на наш взгляд, это несоответствие имеет вполне рациональные объяснения. Компенсаторные возможности организма человека в 18–28 лет, как известно, чрезвычайно велики и позволяют сравнительно легко адаптироваться к гомеостатическим «возмущениям», дисбалансу, вызванному развивающимся заболеванием. Кроме того, именно на младших курсах обучения студент открывает для себя широкое коммуникативное пространство, открыт воздействию интенсивного информационного потока. Подобные особенности восприятия способны вытеснить преморбидную симптоматику на периферию сознания, снизить ее значимость в иерархии значимых событий и явлений. Наконец, хронические заболевания имеют разную частоту рецидивирования, у значительной части студентов отмечается длительная и устойчивая ремиссия, что также объективно влияет на самооценку КЖСЗ.

Мы впервые обнаружили, что показатель КЖСЗ у студентов медицинских специальностей связан с частотой обращаемости за врачебной помощью, индексом коморбидности и средним числом имеющихся у респондентов хронических заболеваний, а у студентов гуманитарных специальностей – лишь со средним числом хронических заболеваний. Это может быть связано с доступностью медицинской помощи и, что более вероятно, с большей осведомленностью студентов медицинских специальностей о негативных последствиях отказа от своевременной диагностики и лечения хронических висцеральных заболеваний.

В данном исследовании мы использовали сравнительно небольшие выборки студентов всего двух направлений обучения, не сопоставляли влияние самооценки и объективного состояния здоровья на успешность обучения, а также не изучали заболеваемость и КЖСЗ у студентов старших курсов. Безусловно, отсутствие этих направлений в дизайне накладывает определенные ограничения на значимость исследования. Тем не менее упомянутые вопросы могут послужить предметом дальнейших изысканий в области оценки и самооценки здоровья студенческой молодежи и их связи с успеваемостью, мотивацией и профессиональным выгоранием.

Полученные данные могут быть использованы при разработке здоровьесберегающих программ и технологий в студенческой среде, а также для прогноза влияния различных факторов самооценки здоровья на успешность обучения и приверженность избранной профессии.

ВЫВОДЫ

1. Уровень хронической заболеваемости у студентов младших курсов в смешанной выборке студентов медицинских и гуманитарных специальностей очень высок и в среднем составляет 76,0 %, что соответствует общероссийским данным.

2. Уровень хронической заболеваемости у студентов медицинских специальностей достоверно выше, чем у гуманитариев: 80,3 и 72,1 % соответственно.

3. Свое КЖСЗ оценивается студентами младших курсов медицинских и гуманитарных специальностей как удовлетворительное и составляет в среднем 61,1–62,8 балла.

4. Показатель КЖСЗ у студентов младших курсов гуманитарных специальностей коррелирует со средним числом хронических заболеваний ($r = 0,75$; $p < 0,05$), у медиков – с индексом коморбидности ($r = 0,43$; $p < 0,05$), числом хронических заболеваний ($r = 0,69$; $p < 0,05$) и частотой обращаемости за врачебной помощью ($r = 0,75$; $p < 0,01$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаларова Л.С., Адигюзелов Ф.Б., Гамзаева М.А., Ильясова У.Г., Абдулкеримова Д.Р. Изучение и оценка состояния здоровья студентов. *Урал. мед. журн.* 2017; (1): 147–148.

Agalarova L.S., Adigyuzelov F.B., Gamzaeva M.A., Ilyasova U.G., Abdulkirimova D.R. The study and assessment of the health of students. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal.* 2017; (1): 147–148. [In Russian].

2. Алексеенко С.Н., Дробот Е.В. Категории жизнестойкости и качества жизни у студентов медицинского ВУЗа в сопряженности с самооценкой здоровья. *Земский врач.* 2014; (2): 41–44.

Alekseenko S.N., Drobot E.V. Categories of resilience and quality of life for students of medical universities in conjunction with self-esteem health. *Zemskiy vrach = Zemsky Doctor.* 2014; (2): 41–44. [In Russian].

Амирджанова В.Н. Ревматоидный артрит и качество жизни больных: методология исследований, валидации инструментов, оценка эффективности терапии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2008.

Amirdzhanova V.N. Rheumatoid arthritis and the quality of life of patients: research methodology, instru-

ment validation, treatment efficacy assessment: abstract of thesis. ... doct. med. sciences. Moscow, 2008. [In Russian].

4. Бабина В.С. Проблемы здоровья студенческой молодежи. *Молодой ученый*. 2015; (11): 572–575.

Babina V.S. Problems of health of student youth. *Molodoy uchenyy = Young Scientist*. 2015; (11): 572–575. [In Russian].

5. Били-Лазарь А.А., Хлебугина Э.В., Вольский В.В. Причины ухудшения состояния здоровья студенческой молодежи. *Успехи соврем. естествознания*. 2013; (10): 192.

Bili-Lazar A.A., Khlebutina E.V., Volsky V.V. The reasons for the deterioration of the health status of student youth. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2013; (10): 192. [In Russian].

6. Бобылева О.В. Состояние здоровья студенческой молодежи как социально-экологическая проблема. *Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки*. 2013; 18 (3): 852–854.

Bobylev O.V. The state of health of students as a socio-environmental problem. *Vestnik Tambovskogo Universiteta. Seriya: Yestestvennyye i tekhnicheskkiye nauki = Tambov University Reports. Series: Natural and Technical Sciences*. 2013; 18 (3): 852–854. [In Russian].

7. Бянкина Л.В., Изотова В.М., Хотимченко А.В., Цуман Н.А. Самооценка здоровья студентами профессиональных учебных заведений Хабаровска как составляющая их психофизиологического состояния. *Учен. зап. ун-та им. П.Ф. Лесгафта*. 2014; (4): 24–28.

Vyankina L.V., Izotova V.M., Khotimchenko A.V., Tsuman N.A. Self-assessment of health by students of vocational schools of Khabarovsk as a component of their psycho-physiological state. *Uchenye zapiski universiteta imeni Petra Frantsevicha Lesgafta = The Scientific Notes of the P.F. Lesgaft University*. 2014; (4): 24–28. [In Russian].

8. Здоровье студентов: социологический анализ. Отв. ред. И.В. Журавлева. М., 2012. 252 с.

Student health: a sociological analysis. Ed. I.V. Zhuravleva. Moscow, 2012. 252 p. [In Russian].

9. Ирихин Н.В., Журавлев Ю.И., Жернакова Н.И., Чефранова Ж.Ю., Ирихина И.В. Сравнительный анализ объективной и субъективной оценок здоровья студентов в ходе реализации инновационной образовательной программы «Здоровьесбережение». *Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки*. 2009; (6): 149–153.

Irikhin N.V., Zhuravlev Yu.I., Zhernakova N.I., Chefranova Zh.Yu., Irikhina I.V. Comparative analysis of objective and subjective assessments of students' health in the course of the implementation of the innovative educational program «Health Preservation». *Vestnik Tambovskogo Universiteta. Seriya: Yestestvennyye i tekhnicheskkiye nauki = Tambov University Re-*

ports. Series: Natural and Technical Sciences. 2009; (6): 149–153. [In Russian].

10. Каргышева С.И., Попова О.А., Грошева Е.С. Самооценка здоровья и образа жизни студентов педагогического университета. *Гигиена и санитария*. 2015; (9): 18–20.

Kartysheva S.I., Popova O.A., Grosheva E.S. Self-esteem of health and lifestyle of students of the pedagogical university. *Gigiiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*. 2015; (9): 18–20. [In Russian].

11. Корниенко Д.С., Козлов А.И., Отавина М.Л. Взаимосвязь самооценок здоровья и психологического благополучия у практически здоровых и имеющих хронические заболевания молодых людей. *Гигиена и санитария*. 2016; (6): 577–581.

Kornienko D.S., Kozlov A.I., Otavina M.L. Interrelation of self-assessments of health and psychological well-being in practically healthy and having chronic diseases of young people. *Gigiiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*. 2016; (6): 577–581. [In Russian].

12. Миннибаев Т.Ш., Рапопорт И.К., Гончарова Г.А., Чубаровский В.В., Тимошенко К.Т. Состояние здоровья студентов и основные задачи университетской медицины. *Здоровье населения и среда обитания*. 2012; (3): 16–20.

Minnibayev T.Sh., Rapoport I.K., Goncharova G.A., Chubarovskiy V.V., Timoshenko K.T. The state of health of students and the main tasks of university medicine. *Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya = Public Health and Life Environment*. 2012; (3): 16–20. [In Russian].

13. Недошивин А.О., Кутузова А.Э., Петрова Н.Н., Варшавский С.Ю., Перепеч Н.Б. Исследование качества жизни и психологического статуса больных с хронической сердечной недостаточностью. *Серд. недостаточность*. 2000; 1 (4): 148–159.

Nedoshivin A.O., Kutuzova A.E., Petrova N.N., Varshavsky S.Yu., Perepech N.B. Study of the quality of life and psychological status of patients with chronic heart failure. *Serdechnaya nedostatochnost' = Russian Heart Failure Journal*. 2000; 1 (4): 148–159. [In Russian].

14. Николаева Н.И., Порфирьева Т.И., Гуменюк В.И. Неблагоприятные факторы образовательного пространства. *Здравоохранение Рос. Федерации*. 2011; (1): 28–31.

Nikolayeva N.I., Porfiryeva T.I., Gumenyuk V.I. Unfavorable factors of the educational space. *Zdravookhraneniye Rossiyskoy Federatsii = Health Care of the Russian Federation*. 2011; (1): 28–31. [In Russian].

15. Новохатская Э.А., Яковлева Т.П., Калитина М.А. Заболеваемость студентов, обусловленная характером питания в современных условиях обучения. *Пробл. соц. гигиены, здравоохр. и ист. медицины*. 2017; (5): 281–285.

Novokhatskaya E.A., Yakovleva T.P., Kalitina M.A. The incidence of students due to the nature

of nutrition in modern learning environments. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine*. 2017; (5): 281–285. [In Russian].

16. Поздеева Т.В. Научное обоснование концепции и организационной модели формирования здоровьесберегающего поведения студенческой молодежи: автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2008.

Pozdeyeva T.V. Scientific substantiation of the concept and organizational model of the formation of health-saving behavior of student youth: abstract of thesis. ... doct. med. sci. Moscow, 2008. [In Russian].

17. Проскуракова Л.А., Лобыкина Е.Н. Структура и оценка эффективности мероприятий системы

сохранения здоровья студентов. *Гигиена и санитария*. 2017; (1): 79–84.

Proskuryakova L.A., Lobykina E.N. Structure and evaluation of the effectiveness of measures for the preservation of student health. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*. 2017; (1): 79–84. [In Russian].

18. McColl E., Han S.W., Barton J.R., Welfare M.R. A comparison of the discriminatory power of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire and the SF-36 in people with ulcerative colitis. *Qual. Life Res.* 2004; 13 (4): 805–811. doi: 10.1023/B:QU RE.0000021701.28467.57

19. Ware J.E., Jr., Sherbourne C.D. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med. Care*. 1992; 30 (6): 473–483.

Сведения об авторах:

Кузнецов В.В., к.м.н., ORCID: 0000-0001-5320-5876, e-mail: kuznetsov@tgmu.ru

Кузина И.Г., к.и.н., ORCID: 0000-0001-9993-0133, e-mail: irina-ku1@yandex.ru

Косилов К.В., д.м.н., ORCID: 0000-0001-9747-3100, e-mail: oton2000@mail.ru

Смирнов Е.А., ORCID: 0000-0003-1027-1528, e-mail: jenyasmi1988@gmail.com

Косилова Е.К., ORCID: 0000-0001-9428-3248, e-mail: katrina.kosilova@yandex.ru

Байрамов Р.А., ORCID: 0000-0001-5787-9886, e-mail: bairamov92@mail.ru

Information about authors:

Kuznetsov V.V., candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5320-5876, e-mail: kuznetsov@tgmu.ru

Kuzina I.G., candidate of historical sciences, ORCID: 0000-0001-9993-0133, e-mail: irina-ku1@yandex.ru

Kosilov K.V., doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9747-3100, e-mail: oton2000@mail.ru

Smirnov E.A., ORCID: 0000-0003-1027-1528, e-mail: jenyasmi1988@gmail.com

Kosilova E.K., ORCID: 0000-0001-9428-3248, e-mail: katrina.kosilova@yandex.ru

Bairamov R.A., ORCID: 0000-0001-5787-9886, e-mail: bairamov92@mail.ru

О НЕСОСТОЯТЕЛЬНОСТИ КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ РОССИИ

**Владимир Михайлович ЧЕРНЫШЕВ¹, Михаил Иванович ВОЕВОДА²,
Ильдар Файзрахманович МИНГАЗОВ³**

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

² *ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

³ *Новосибирский НИИ гигиены Роспотребнадзора
630099, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 84*

Сохраняющийся в течение многих лет дефицит медицинских кадров, прежде всего – в участковой службе и сельском здравоохранении, недостаточная эффективность мер, принимаемых государством для решения кадровой проблемы («президентская» надбавка участковой службе, программа «Земский доктор» и др.), свидетельствуют о несостоятельности кадровой политики в отрасли. Затрачивая огромные бюджетные средства на подготовку специалистов, государство лишило себя права использовать их там, где в них есть острая необходимость. Не дало желаемого результата стремление повысить качество подготовки студентов медицинских вузов на основе присоединения к Болонскому соглашению. Доступность медицинской помощи ограничивается еще и тем, что в общей структуре врачебных специальностей количество врачей клинических специальностей, т.е. тех, кто непосредственно работает с пациентами, существенно ниже, чем в странах ЕС, и их доля продолжает снижаться. Все перечисленное свидетельствует о том, что у Минздрава нет четкого представления о решении кадрового вопроса, не сформирована система, способная его решить, которая должна включать в себя: профориентацию – подготовку специалиста – государственное распределение обучавшихся на бюджетной основе – повышение квалификации – карьерный рост. Государство и руководство регионов должны создавать благоприятные условия для работы и жизни, привлекающие специалистов, а также заинтересовывающие их в продолжительной работе по месту распределения. На основе советского опыта организации кадровой работы в здравоохранении, наработок других стран авторы предлагают меры по совершенствованию подготовки медицинских кадров, привлечению и долговременной заинтересованности в работе их на «проблемных» должностях (участковая служба, сельское здравоохранение и т.д.).

Ключевые слова: здравоохранение, медицинские кадры, врачи, средние медицинские работники, медицинские организации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Автор для переписки: Чернышев В.М., e-mail: chernyshevladimir@yandex.ru

Для цитирования: Чернышев В.М., Воевода М.И., Мингазов И.Ф. О несостоятельности кадровой политики в здравоохранении России. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 107–115. doi: 10.15372/SSMJ20190614

ABOUT INEFFICIENCY OF PERSONNEL POLICY IN HEALTH CARE OF RUSSIA

**Vladimir Mikhaylovich CHERNYSHEV¹, Mikhail Ivanovich VOEVODA²,
Ildar Fayzrakhmanovich MINGAZOV³**

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

² *Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2*

³ *Novosibirsk Research Institute of Hygiene of Rospotrebnadzor
630099 Novosibirsk, Frunze str., 84*

The shortage of medical personnel, primarily in the district service and rural health care, the insufficient effectiveness of measures taken by the state to solve the personnel problem («presidential» allowance for the district service, the program «Zemsky doctor», etc.) indicate the insolvency of personnel policy in the industry. The state spending huge budgetary funds for training specialists deprived itself of the right to use them where they are urgently needed. The desire to improve the quality of training of medical students on the basis of accession to the Bologna agreement did not give the desired result. The availability of medical care is also limited by the fact that in the general structure of medical specialties, the number of doctors of clinical specialties, i.e. those who directly work with patients is significantly lower than in the EU and their share continues to decline. All of the above suggests that the Ministry of Health has no clear idea about the issue of personnel, is not formed the system able to solve it, which must include: career counseling – training – public distribution trained on a budgetary basis – professional development – career growth. The state and the leadership of the regions should create favorable conditions for work and life, attracting specialists, as well as interesting them in long-term work at the place of distribution. On the basis of the Soviet experience in the organization of personnel work in health care, best practice of other countries, the authors propose measures in the medical personnel training improvement, in attracting and long-term interest in their work in «problem» positions (district service, rural health care, etc.).

Key words: health care, medical personnel, doctors, paramedical workers, medical organizations.

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

Correspondence author: Chernyshev V.M., e-mail: chernyshevladimir@yandex.ru

Citation: Chernyshev V.M., Voevoda M.I., Mingazov I.F. About inefficiency of personnel policy in health care of Russia. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 107–115. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190614

Вы никогда не сумеете решить возникшую проблему, если сохраните то же мышление и тот же подход, который привел вас к этой проблеме.

Альберт Эйнштейн

Кадровый ресурс системы здравоохранения, особенно государственного и муниципального секторов, является наиболее значимым и ценным ее компонентом. Недостаточная укомплектованность квалифицированными врачами и персоналом среднего звена не позволяет обеспечить население востребованной, доступной и качественной медицинской помощью, ограничивает применение сложных, высокотехнологичных и инновационных лечебно-диагностических и реабилитационно-восстановительных технологий и методик [10]. Вместе с тем в последние 20–25 лет проблема кадрового обеспечения в здравоохранении не только сохраняется, но становится все более ощутимой. Обеспеченность врачами и специалистами со средним медицинским образованием стабильно снижается в течение последних лет (рис. 1). По оценкам экспертов, кроме естественной убыли в связи с выходом на пенсию эта динамика свидетельствует о сокращении количества медицинских организаций, снижении привлекательности работы в государственном здравоохранении и переходе врачей в частные клиники.

За период с 2005 по 2016 г. отмечено существенное постарение врачебного состава, работающего в государственных медицинских организациях. Так, если в 2005 г. врачи в возрасте до

30 лет составляли 18,6 %, старше 55 лет – 13 %, то в 2016 г. – 16,6 и 18,9 % соответственно, при этом их средний возраст увеличился с 41,3 до 43,2 года. О достаточно активном переходе сотрудников из государственного здравоохранения в частную медицину свидетельствует изменение численности и структуры кадров. Так, в 2005 г. в государственном секторе работало 4080,3 тыс. человек (93,6 % всех занятых в системе здравоохранения), в частных клиниках – 173,1 тыс. (4,0 %). В 2016 г. численность занятых в госсекторе сократилась до 3843,3 тыс. (88,8 % всех занятых), а количество работников частных медицинских организаций выросло до 401,3 тыс. (9,3 %). [4]. Положение дел усугубляется еще и тем, что значительная часть врачей, ранее работавших с пациентами, переходят в управленческие и контролирующие структуры, появившиеся в связи с введением ОМС (страховые компании, Росздравнадзор, фонды ОМС и др.) [8].

Важной характеристикой эффективности и качества медицинской помощи является обеспеченность населения врачами клинических специальностей. Во многих европейских странах она варьирует в диапазоне 30–40 человек на 10 000 населения: так, в 2010 г. количество таких специалистов составляло во Франции – 35, в Гер-

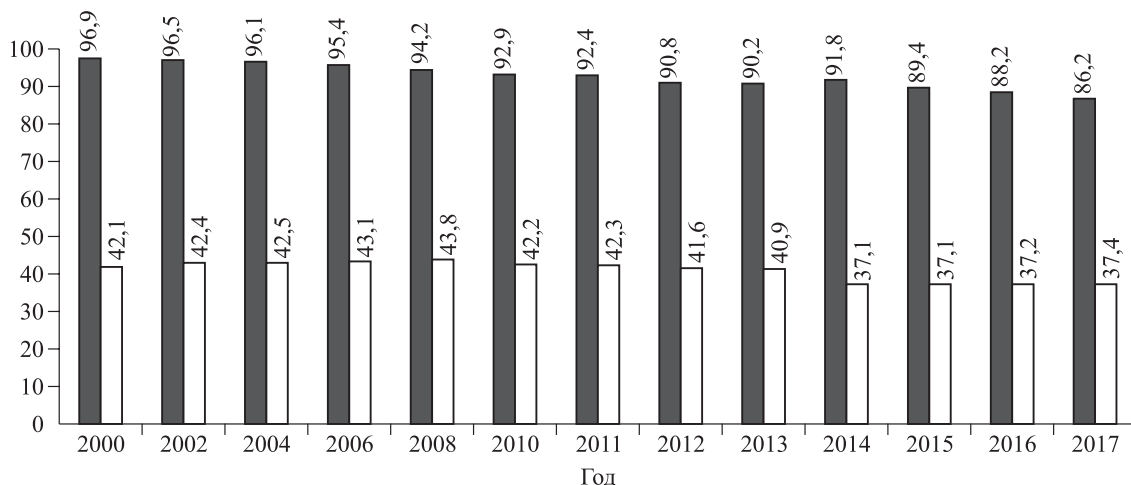


Рис. 1. Обеспеченность средними медработниками (черные столбики) и врачами (белые столбики) в РФ на 10 тыс. населения (здесь и на рис. 2 источник – ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения»; без Крымского федерального округа)

Fig. 1. The physicians and medical attendants capacity in the RF per 10000 peoples

мании – 35,3, в Швеции – 35,8. Россия по этому показателю отставала с самого начала (29,8 в 2009 г.), и со временем разрыв этот только растет: в 2012 г. – 25,9, в 2016 г. – 23,6 врачей клинических специальностей на 10 000 населения [11].

Серьезные диспропорции в обеспеченности кадрами наблюдаются по линиям «город – село», «стационары – амбулаторно – поликлинические учреждения», «узкие специалисты – участковые врачи, врачи-специалисты со средним медицинским образованием» и др. Это не является чисто российской проблемой, кадровые диспропорции в системе здравоохранения характерны для многих стран. Даже самые развитые из них нередко испытывают дефицит врачей в амбулаторно-поликлинических учреждениях, что отчасти объясняется существенной разницей в доходах: врачи общей практики зарабатывают намного меньше, чем узкие специалисты, и студенты неохотно выбирают эту специальность. Однако в России разрывы чрезмерно велики, что негативно отражается на обеспечении равнодоступности и качества медицинской помощи. Так, доля участковых в общей численности российских врачей не превышает 13 %, тогда как в Канаде и Франции их почти половина (по 48 %), в странах Организации экономического сотрудничества и развития – в среднем треть. Из-за нехватки специалистов их нагрузка в 1,5–2 раза превышает нормативную.

Проблема кадрового дефицита особенно актуальна для сельских медучреждений. В России сельских врачей лишь 14,5 в расчете на 10 000 жителей, в то время как в городах втрое больше (45,2). Методика планирования кадров для сельской местности должна устанавливать сближение

этих показателей, как минимум, до двукратного уровня. Современные организационные, коммуникативные технологии позволяют преодолевать проблемы, вызванные дефицитом врачей, и поддерживать доступность и качество медицинских услуг на приемлемом уровне даже при нехватке специалистов. К сожалению, в России эти механизмы практически не используются. Вместо рационализации работы с имеющимися ресурсами решение проблем с доступностью медпомощи, как правило, происходит за счет введения новых должностей, увеличения числа рабочих мест.

Концепция кадровой политики в здравоохранении Российской Федерации была принята еще в 2002 г. Основной ее целью было заявлено развитие системы управления кадровым потенциалом отрасли, основанной на рациональном планировании подготовки и трудоустройства специалистов, использовании современных образовательных технологий и эффективных мотивационных механизмов, позволяющих обеспечить органы и учреждения здравоохранения персоналом, способным на высоком профессиональном уровне решать задачи повышения качества медицинской и лекарственной помощи населению. Как видно, указанная цель не достигнута. Этого следовало ожидать, так как реальных механизмов управления кадрами, особенно из числа молодых специалистов, нет. Начать с того, что ряд кадровых перекосов закладывается уже на этапе получения образования. К сожалению, образовательная и кадровая политики в отрасли разбалансированы. Подготовка в медицинских вузах слабо коррелирует со спросом общества на тех или иных специалистов.

В России в настоящее время существует квотирование приема, но этого недостаточно, ведь оно опирается лишь на текущие показатели. На наш взгляд, планирование подготовки специалистов должно дополняться расширением горизонта до 2030–2035 гг., с подключением к процессу профессионального сообщества. Требуется пересмотра организация оказания первичной медико-санитарной помощи населению, прежде всего, работы участковой службы. Если первичная помощь организована хорошо, это помогает спасти немало жизней, поддерживать здоровье и разгрузить стационары. Однако мало того, что в России участковых врачей не хватает, их работа организована далеко не оптимальным образом. Как показали исследования, проведенные в Новосибирске, по мнению участковых врачей, более 50 % обращений к ним пациентов были необоснованными (продление листков нетрудоспособности, регулярные выписки рецептов на медикаменты, прописанные хроническим больным на многие годы и т.д.). Более 70 % вызовов врача на дом могли быть обслужены фельдшерами либо были необоснованны [7].

Чрезвычайно затрудняет и замедляет работу врачей постоянно растущее количество учетно-отчетных документов, порой сомнительной необходимости. Даже внедрение медицинских информационных систем, которые, по замыслу, должны были освободить врачей от «бумажной работы» и обеспечить им простой доступ к электронной «истории болезни» пациента, на деле только отнимает время. Из-за того, что их применение недостаточно законодательно определено, требуется дублирование записей на бумажном носителе [7].

Все это не способствует повышению качества медицинских услуг, равно как и популяризации профессии врача. По мнению руководителя департамента исследований в медицине и фармацевтике MAR CONSULT К. Медведевой, в последнее время все чаще врач воспринимается не как специалист, эксперт, а как сотрудник сферы обслуживания. По данным опросов, проведенных департаментом, почти 40 % докторов отмечают, что не ощущают уважения к себе со стороны общества. Около 65 % говорят, что не видят положительной динамики в плане интереса к профессии со стороны молодежи, а около 20 % даже отмечают отрицательную динамику.

Снижение престижности профессии врача в России является следствием в том числе и низкой оплаты труда медработников. Врач в западном здравоохранении – дорогой ресурс. Государство и профессиональное сообщество предъявляют высокие требования к уровню его квалификации

и ответственности, отсюда и высокий уровень оплаты труда. Врачи общей практики в большинстве западных стран получают в 2–2,5 раза больше, чем средний работник в экономике, узкие специалисты – в 3–4,5 раза. Во многих странах Восточной Европы также имеет место эта тенденция. Например, в Чехии узкие специалисты в медицине зарабатывают в 2,3 раза больше среднего работника в экономике, в Эстонии – в 2,1 раза, в Польше – в 2,2 раза (врачи общей практики) [8].

В России же зарплату медиков только в 2018 г. начали повышать в соответствии с «майскими» указами Президента от 2012 г., но при этом оперируют цифрами *среднеотраслевой оплаты труда*, которая включает в том числе относительно высокие заработки управленцев, сотрудников федеральных медучреждений и специалистов, оказывающих высокотехнологичную медицинскую помощь. В результате реальная зарплата врачей первичного звена слишком часто не «дотягивает» до двукратного превышения ее среднерегионального уровня.

В попытке повысить качество и доступность медицинской помощи, смягчить остроту кадровой проблемы Минздрав РФ реализовал несколько масштабных проектов, результаты которых трудно назвать удачными. Так, в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье» (2006 г.) для укрепления участковой службы была установлена так называемая президентская надбавка в 10 000 руб., которая ежемесячно выплачивалась участковым врачам. Но если в первые годы после ее введения количество участковых и врачей общей практики несколько увеличилось, то в последующие годы произошел их отток (рис. 2). То есть свою функцию надбавка не выполнила. При этом медицинские работники с аналогичными функциями (в системе скорой медицинской помощи, участковых больниц, сельских фельдшеров), но лишённые такой надбавки, почувствовали себя обделёнными, что вызвало их справедливое возмущение и потребовало внесения дополнений в приказ. Кроме того, введение надбавки не привело к существенному повышению качества работы врачей, так как ее размер был фиксированным и не зависел ни от качества и интенсивности работы, ни от квалификации специалистов. Впоследствии порядок выплат был изменен: введены дополнения, устанавливающие зависимость размера доплаты от объема и качества работы. Более того, введение надбавки породило ряд новых проблем в организации медицинской помощи – часть «узких» специалистов, зарплата которых осталась на прежнем уровне, уволилась. Некоторые ушли в частные клиники,

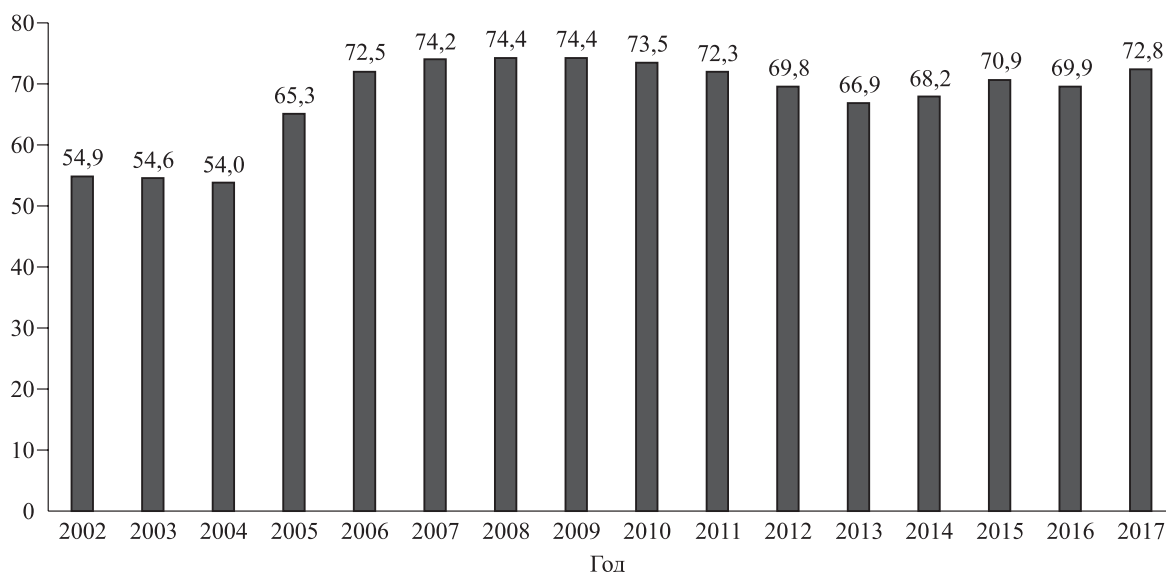


Рис. 2. Динамика численности врачей, участковых терапевтов, педиатров, врачей общей практики в РФ, тыс. человек

Fig. 2. Dynamics of physicians, primary care physicians, pediatricians, general practitioners in the RF

а некоторые сменили профиль, перейдя в участковые врачи.

Не менее неуклюжей оказалась и попытка внедрения стандартов оказания медицинской помощи, предусматривающих материальное поощрение за работу по ним. Идея сама по себе неплоха, но ее реализация вызвала ненужную напряженность в профессиональной среде из-за несправедливого распределения доходов. Казалось бы, очевидно, что сначала следует обеспечить стандартами все организации, по всем специальностям и основным заболеваниям, а уже затем поощрять тех, кто реально начал по ним работать. Однако этого не произошло, поэтому часть сотрудников объективно не имела возможности получить доплату, так как по их специальности стандарты не были вовремя подготовлены и утверждены. Кроме того, нельзя не упомянуть, что доплата за работу по стандартам поначалу предполагалась только для лечащих врачей. Сотрудники лабораторий, кабинетов функциональной диагностики и др., которые непосредственно участвуют в оказании медпомощи по тем же стандартам, оказались вне сферы внимания реформаторов (позже эта несправедливость была исправлена).

Для решения кадрового дефицита сельских медицинских учреждений была сформирована государственная программа «Земский доктор», предусматривающая выдачу молодым сельским врачам «подъемных» в размере 1 млн руб. Результаты ее реализации тоже оказались провальными. За 2012–2017 гг. фактическая численность участников программы составила 28 968 человек, а

общее количество сельских врачей увеличилось всего на 6955 человек. В Сибирском федеральном округе оно даже сократилось на 318 человек. Причин тому много, одна из них – возрастная структура сельской медицины. Более 26 % врачей, работающих на селе в последние годы, это лица пенсионного возраста, выход которых на заслуженный отдых не удастся компенсировать молодыми специалистами. Вторая причина (о чем Минздрав РФ предпочитает не говорить) в том, что часть молодых врачей отказалась работать в сельской местности, вернув полученные деньги. Таким образом, программа «Земский доктор» не смогла решить кадровую проблему на селе. Более того, если президентская надбавка породила в свое время конфликт между участковой службой и «узкими» специалистами, то «подъемные» молодым врачам привели к конфликту между поколениями медработников. Так, ежемесячная надбавка к зарплате у молодого специалиста с учетом полученного миллиона рублей составляет 16 600 рублей, а в сумме с должностным окладом и другими надбавками и доплатами на несколько тысяч превышает зарплату тех, кто многие годы отдал сельскому здравоохранению, что породило у них недоумение, обиды и негативное отношение к молодежи [5].

К сожалению, перечень подобных «инноваций» Минздрава и других ведомств можно продолжить. Это и требование Минэкономразвития заменить санитарок, много лет отработавших в медицинских организациях, на дипломированных; и отказ от сертификации специалистов и переход на аккредитацию, хотя обе процедуры

нужны, чтобы убедиться, что специалист знает и умеет делать то, что обязан в соответствии с профессиональными требованиями; и учетно-отчетный беспорядок, в связи с которым за последние 25 лет число графоклеток в отчетных документах увеличилось почти в 8 (!) раз; и пресловутая «оптимизация» отрасли, направленная на сокращение медицинских организаций, вместо реструктуризации и/или организации, скажем, эффективной реабилитационной службы, системы поддержки тяжелых больных (отделения по уходу, хосписы и т.д.), необходимость в которых давно назрела.

Все эти инициативы Минздрава никак не способствовали улучшению условий жизни и работы медиков, повышению доступности и качества медицинской помощи. Большинство опрошенных пациентов (65,1 %) считают, что за последние 5 лет качество и доступность медицинской помощи в поликлиниках ухудшились, и лишь 17,9 % не заметили изменений. При этом 55 % пациентов отмечают недоброжелательное к ним отношение в государственных поликлиниках. Это сигнал о том, что с амбулаторным звеном в стране неладно и нужны реальные меры по исправлению ситуации [2].

Для медицинских работников и пациентов очевидно, что пора прекратить навязывать абсолютно чужеродную, карикатурную «систему» ОМС, поскольку 74 % медиков оценивают ее негативно и считают неэффективной. Она противоречит менталитету наших пациентов и медицинских работников. Кроме того, со слов В.И. Матвиенко, на содержание аппарата системы медицинского страхования (СМО, ТФОМСы и др.) тратится около 14 % и без того дефицитного бюджета здравоохранения. А когда подавляющее большинство граждан и почти все медработники не понимают, куда мы идем, и не видят перспектив развития, любая реформа, в том числе навязанная сверху система ОМС, обречена на неудачу [2].

Конечно же, совершенно неоправданно предание забвению опыта СССР по решению кадровых вопросов в здравоохранении, ведь он был достаточно эффективен, максимально адаптирован к нашим реалиям. Органы власти использовали в кадровой политике очень разнообразные методы, в том числе мощные административные, систему обязательного распределения после окончания вуза. При этом молодым специалистам с высшим образованием выделялись квартиры социального найма в целях закрепления их на местах, что подкреплялось их высоким социальным статусом. В обеспечении медицинскими кадрами регионов страны важную роль играли целевые наборы в

медицинские образовательные учреждения, после окончания которых молодые специалисты возвращались на места своего довузовского проживания. Использование комплекса перечисленных мер позволяло системе здравоохранения достаточно успешно решать задачи кадрового обеспечения региональных систем здравоохранения.

С переходом к рыночным отношениям в отрасли сложилась ситуация, при которой старая система подготовки и насыщения кадрами здравоохранения уже давно не работает, а новая не создана. А лозунг «кадры решают все» по-прежнему актуален и становится все более востребованным [9]. *Кадровая политика в здравоохранении требует кардинального пересмотра, причем на всех этапах:* профориентация – обучение – трудоустройство – повышение квалификации – карьерный рост.

Профориентация является важным этапом в системе подготовки кадров, который, к сожалению, часто недооценивается и потому работает недостаточно эффективно. На наш взгляд, значительно повысить ее эффективность могло бы привлечение специально подготовленных сотрудников, которые работали бы в тесном взаимодействии с педагогами школ. Профориентация должна носить системный, постоянный характер с учетом реальной потребности в кадрах. Следует использовать различные формы, такие как кружковую работу, создание специализированных классов, а при возможности организовывать подготовку из числа учеников старших классов младшего медицинского персонала (младших сестер по уходу, санитарок, сиделок) на базе медицинских учебных заведений и учебно-производственных комбинатов. Можно привлекать ребят к работе в составе санитарных дружин, участию в волонтерском движении, с обязательной выдачей дипломов и сертификатов о прошедшей подготовке, дающих право на льготы при поступлении в медицинские учебные заведения.

Работу с направленными в медицинские учебные заведения следует продолжать в период их обучения. Они должны проходить все виды практики по месту своей будущей работы, знакомиться с коллективом, традициями учреждения. По возможности нужно привлекать их к участию в мероприятиях, проводимых в медицинской организации, т.е. создавать условия для того, чтобы они постепенно «вливались» в коллектив. Соответственно отношение к студентам должно быть внимательным, заботливым и в то же время принципиальным в вопросах дисциплины и выполнения медицинских манипуляций и т.д. Необходимо создать такие условия, чтобы они почувствовали

себя членами коллектива еще до окончания учебного заведения.

В части планирования подготовки специалистов, на наш взгляд, целесообразно учесть зарубежный опыт, где потребность в кадрах оценивается с учетом текущей и прогнозируемой возрастной структуры населения, уровня заболеваемости, объема потребления медпомощи и пр. Более того, во многих странах государство активно регулирует не только прием в медицинские институты и состав постдипломного образования, но и трудоустройство выпускников. Россия же, вкладывая огромные средства в подготовку медицинских работников, вопросами трудоустройства практически не занимается. По данным Минздрава РФ, в 2016 г. получили направление на работу только 20,2 % (!) выпускников медицинских вузов и медицинских факультетов. По данным Ю.М. Комарова [2], 30 % выпускников не пошли работать в медицину вообще. В своем выступлении на коллегии по итогам работы в 2017 г. министр Вероника Скворцова с гордостью заявила, что в медицинские вузы принято 56 % абитуриентов по контракту. Возникает вопрос, а для кого готовятся еще 44 %?

Возможно, целесообразно было бы вернуться к обязательному распределению выпускников медицинских учебных заведений, обучавшихся за счет бюджетных средств. Такой подход не лишает студента права выбора, только его нужно сделать при поступлении в медицинское учебное заведение. Хочешь учиться за счет государства – получишь направление на работу туда, куда оно сочтет нужным направить молодого специалиста. Если хочешь самостоятельно распоряжаться своей судьбой – обучайся за свой счет. Обязательным условием для региональной власти и органов местного самоуправления должно стать создание благоприятных условий для жизни и работы молодых специалистов (определенных законодательно); если эти условия не предоставлены специалисту, он должен иметь право покинуть место распределения.

Совершенно очевидно, что для обеспечения и стабилизации кадров, особенно в проблемных местах и специальностях, необходим комплекс мер, направленных на долговременную заинтересованность специалистов:

- 1) выплата подъемных для возмещения затрат, связанных с переездом, обустройством;
- 2) выделение служебного жилья, которое через 15–20 лет может перейти в собственность специалиста;
- 3) установление надбавок за работу там, где традиционно низкая укомплектованность (село, участковая служба и др.);

4) предоставление социального пакета: места для детей в детских дошкольных учреждениях, бесплатное санаторно-курортное лечение 1 раз в 2–3 года, оплата (либо льготы по оплате) коммунальных услуг, льготное кредитование и др.;

5) установление дифференцированных надбавок (до 25 %) к пенсии лицам, отработавшим более 20 лет в селе, на участке и т.д. (пропорционально стажу);

6) льготы на обучение (поступление) в медицинские учебные заведения детей таких специалистов и т.д.

Этот перечень не претендует на полноту. Для его корректировки целесообразно изучить опыт других стран, советского здравоохранения и в обязательном порядке учесть специфику сегодняшней России: низкая плотность населения, значительная удаленность населенных пунктов друг от друга и региональных центров, периодически возникающая изоляция их (распутица, разлив рек и др.), суровые климатические условия и многое другое.

Безусловно, это потребует определенных затрат, но они, скорее всего, меньше тех потерь, которые несет государство в связи с отсутствием врачей, и прежде всего – смертность лиц трудоспособного возраста в связи с неоказанием либо несвоевременным оказанием медицинской помощи, выход на инвалидность по тем же причинам. Полный ущерб от преждевременной смертности экономически активного сельского населения может исчисляться сотнями миллиардов рублей в год [1].

Дополнительных расходов требует и двойная или тройная зарплата специалистов, работающих «вахтовым методом», поездки и транспортировка больных в лечебно-профилактические учреждения других населенных пунктов, в областные учреждения и т.д., отъезд людей из села и отказ от переезда в сельскую местность на постоянное место жительства из-за отсутствия медицинских работников (еще пророк Мухаммед говорил: «Если нет правителя – туда не заходите, а если нет врача в селе – оттуда убегайте»). Это далеко не полный перечень потерь, которое несет государство из-за отсутствия в сельской местности медицинских работников [6].

Особого внимания заслуживает оплата труда работников системы здравоохранения как один из важнейших факторов, способствующих привлечению и закреплению кадров, повышению качества и эффективности медицинских услуг. Американский политический деятель Генри Джордж писал: «Общеизвестно, что труд наиболее продуктивен там, где платят наибольшую зарплату. Низко оплачиваемый труд неэффективен во всех

странах мира». При этом курс на повышение оплаты труда врача должен сопровождаться мерами по повышению его результативности. Основа этой стратегии – переход на эффективный контракт, в рамках которого все компоненты заработной платы медиков должны работать на повышение эффективности и качества их труда на одном рабочем месте (на одну ставку).

Совершенствование мотивации медицинских работников необходимо сочетать с сокращением причин демотивации (неэффективная организация труда, дефицит информации и обратной связи, устаревшее оборудование, чрезмерная нагрузка и т.д.) [3, 8]. Самого пристального внимания заслуживает постоянно растущий объем учетно-отчетной документации, которой вынуждены заниматься врачи вместо непосредственного общения с пациентами. Очевидно, что подавляющее количество ее совершенно не нужно, только отнимает время у врачей и уж, конечно, не способствует повышению доступности и качества медицинской помощи.

Немаловажное значение имеет дискредитация медицинской профессии – это и безнаказанные необоснованные нападки СМИ, бесконечные «строгости» со стороны Минздрава РФ, следственного комитета и Государственной Думы, в то время как закон о защите медицинских работников два года не может быть рассмотрен. И, конечно же, нельзя относить медицину к сфере обслуживания, что порождает соответствующее отношение к ней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В стране сложилась достаточно напряженная ситуация с кадрами в здравоохранении, прежде всего с врачебными. Она характеризуется постарением кадрового состава, сохраняющимся дефицитом в первичном звене, особенно в сельской местности, что влечет за собой чрезвычайные нагрузки, которые в 1,5–2 раза превышают нормативные, и затрудняет обеспечение качественной и доступной медицинской помощи. Принимаемые в течение более 20 лет Минздравом России меры не дают планируемого результата, что свидетельствует о несостоятельности кадровой политики ведомства либо об отсутствии таковой вообще. В сельской местности, несмотря на все возрастающий дефицит молодых специалистов, муниципальные власти зачастую не создают необходимые условия для их жизни и работы. Опыт зарубежных стран и советского здравоохранения свидетельствует о том, что решение кадрового вопроса в здравоохранении должно носить системный и комплексный характер, включать в себя

ряд научно обоснованных и долгосрочных мер по привлечению и закреплению медицинских работников со стороны как государства, администраций субъектов РФ, так и органов местного самоуправления. А именно: организация качественной профориентации, целевой прием, программы софинансирования обучения, дополнительные стипендии и льготы, единовременные «подъемные» и решение жилищных проблем, содействие в получении поствузовского профессионального образования, дополнительные денежные выплаты на регулярной основе, установление надбавок к пенсии и т.д.

По мнению авторов, управление региональными и муниципальными программами экономического стимулирования и мерами социальной поддержки медицинских работников в сельских и отдаленных районах должно стать самостоятельным направлением кадровой политики в сфере здравоохранения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинова Т.В., Былина С.Г. Экономические потери от преждевременной смертности сельского населения. *Менеджер здравоохранения*. 2013; (10): 44–47.

Blinova T.V., Bylina S.G. Economic losses from premature mortality of rural population. *Menedzher zdavookhraneniya = Manager of Health Care*. 2013; (10): 44–47. [In Russian].

2. Комаров Ю.М. Мониторинг и первичная медико-санитарная помощь. М., 2016. 231 с.

Komarov Yu.M. Monitoring and primary health care. Moscow, 2016. 231 p. [In Russian].

3. Пугачев В.П. Деструктивная мотивация: определение и причины. *Зам. глав. врача*. 2014; (1): 80–84.

Pugachev V.P. Destructive motivation: definition and causes. *Zamestitel' glavnogo vracha = Chief Physician Deputy*. 2014; (1): 80–84. [In Russian].

4. Ресурсы и деятельность медицинских организаций здравоохранения. Статистические материалы. Минздрав России, Москва, 2005–2017 гг. [In Russian].

Resources and activities of health care organizations. Statistical materials. Ministry of health of Russia, Moscow, 2017. [In Russian].

5. Стрельченко О.В., Чернышев В.М., Мингазов И.Ф. Основные показатели здоровья населения и здравоохранения Сибирского федерального округа в 2017 году. Сборник статистических и аналитических материалов. Общ. ред. О.В. Стрельченко. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2018. Вып. 17. 277 с.

Strelchenko O.V., Chernyshev V. M., Mingazov I.F. Main indicators of health of the population and health of the Siberian Federal district in 2017. Collection of

statistical and analytical materials. Novosibirsk: Sibirskoye universitetskoye izdatel'stvo, 2018. Vol. 17. 277 p. [In Russian].

6. Тарасенко Е.А., Хорева О.Б. Экономическое стимулирование для устранения дефицита медицинских кадров в сельских территориях. *Вопр. гос. и муницип. управления.* 2016; (4): 117–140.

Tarasenko E.A., Khoreva O.B. Economic incentives to eliminate the shortage of medical personnel in rural areas. *Voprosy gosudarstvennogo i munitsipal'nogo upravleniya = Issues of State and Municipal Government.* 2016; (4): 117–140. [In Russian].

7. Шарапов И.В., Иванинский О.И., Кривушкина Е.В., Шаманская Ю.А. Результаты социологического опроса пациентов амбулаторно-поликлинических учреждений Новосибирской области. *Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Регенеративная медицина и новые биосовместимые материалы:* мат. III Междунар. форума, Новосибирск, 24–25 октября 2014 г. Новосибирск, 2014. 367–372.

Sharapov I.V., Ivaninskiy O.I., Krivushkina E.V., Shamanskaya Yu.A. Results of a sociological survey of the patients of outpatient facilities in Novosibirsk region. *Innovations in medicine: the main problems and solutions. Regenerative medicine and new biocompatible materials:* mat. III Int. forum. Novosibirsk, October 24–25, 2014. Novosibirsk, 2014. 367–372. [In Russian].

8. Шейман И.М., Шевский В.И. Кадровая политика в здравоохранении: сравнительный анализ российской и международной практики. *Вопр. гос. и муницип. управления.* 2015; (1): 143–167.

Sheyman I.M., Shevskiy V.I. Personnel policy in health care: comparative analysis of Russian and international practice. *Voprosy gosudarstvennogo i munitsipal'nogo upravleniya = Issues of State and Municipal Government.* 2015; (1): 143–167. [In Russian].

9. Шубцова Л.В., Махнова Н.А. Проблемы кадрового обеспечения региональной системы здравоохранения. *Фундам. исследования.* 2014; (12, Ч. 11): 2434–2439.

Shubtsova L.V., Makhnova N.A. The problem of staffing of regional health system. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research.* 2014. (12, Pt. 11). 2434–2439. [In Russian].

10. Щепин В.О. Обеспеченность населения Российской Федерации основным кадровым ресурсом государственной системы здравоохранения. *Пробл. соц. гигиены, здравоохран. и ист. медицины.* 2013. (6). 24–28.

Shchepin V.O. Provision of Russian Federation population with the main human resource of the state health care system. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdavookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine.* 2013. (6). 24–28. [In Russian].

11. Щепин О.П. О развитии здравоохранения Российской Федерации. *Пробл. соц. гигиены, здравоохран. и ист. медицины.* 2013. (5). 3–7.

Shchepin O.P. On the development of health care in the Russian Federation. *Problemy sotsial'noi gigieny, zdavookhraneniya i istorii meditsiny = Problems of Social Hygiene, Public Health and History of Medicine.* 2013. (5). 3–7. [In Russian].

Сведения об авторах:

Чернышев В.М., д.м.н., профессор, e-mail: chernyshevladimir@yandex.ru

Воевода М.И., д.м.н., проф., академик РАН, ORCID: 0000-0001-9425-413X, e-mail: office@iimed.ru

Мингазов И.Ф., e-mail: mif2050@mail.ru

Information about authors:

Chernyshev V.M., doctor of medical sciences, professor, e-mail: chernyshevladimir@yandex.ru

Voevoda M.I., doctor of medical sciences, professor, academician of RAS, ORCID: 0000-0001-9425-413X, e-mail: office@iimed.ru

Mingazov I.F., e-mail: mif2050@mail.ru