

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

БСМ

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

BSM



Том 19

№ 4. 2020

ПРОФЕССОР СИБГМУ ВПЕРВЫЕ В РОССИИ ВОШЛА В СОСТАВ РЕДКОЛЛЕГИИ ЗАРУБЕЖНОГО ЖУРНАЛА «PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES»



Заведующий кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, декан лечебного факультета СибГМУ, доктор медицинских наук, профессор Ольга Федорова стала членом редакционной коллегии зарубежного высокорейтингового журнала «PLOS Neglected Tropical Diseases» (Q1).

Приглашение присоединиться к команде PLoS Community Journals было направлено Ольге Сергеевне лично от главных редакторов журнала – Пола Бриндли и Шадэна Камхави. На сегодняшний день, профессор СибГМУ является единственным российским ученым в составе постоянной редакционной коллегии журнала.

Исследовательский коллектив Ольги Федоровой, который изучает эпидемиологию описторхоза, а также его взаимосвязь с хроническими неинфекционными заболеваниями, сотрудничает с научным журналом «PLOS NTD» на протяжении нескольких лет. За это время ученые СибГМУ неоднократно публиковали в данном журнале результаты своих исследований, выполненных совместно с зарубежными партнерами.

«Вхождение ученого СибГМУ в состав редколлегии авторитетного зарубежного высокорейтингового журнала – еще один шаг на пути к успешному позиционированию университета как международного научно-исследовательского центра и к повышению узнаваемости вуза на международной академической арене», - отметила ректор СибГМУ Ольга Кобякова.

Научный междисциплинарный журнал «PLOS ONE» является авторитетным зарубежным журналом первого квартиля (Q1). Журнал включен в международную реферативную базу данных и систему цитирования «Scopus». По данным на 2019 год, показатель журнала SJR равен 2.148, h-index журнала – 121. Журнал издается некоммерческой организацией Public Library of Science. Страна издательства – США. Среди основных предметных областей публикуемых статей: медицина, сельскохозяйственные и биологические науки, биохимия, генетика и молекулярная биология.

Официальный сайт журнала «PLOS Neglected Tropical Diseases».

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Выходит 4 раза в год

Том 19, № 4, 2020

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (online)

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ:

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный
медицинский университет» Минздрава России

Журнал основан в 2001 году
Зарегистрирован в Министерстве РФ
по делам печати, телерадиовещания
и средств массовых коммуникаций
Свидетельство регистрации ПИ
№ 77-7366 от 26.03.2001 г.

Журнал входит в Перечень ведущих
рецензируемых научных журналов и изданий,
выпускаемых в РФ, в которых должны быть
опубликованы основные научные результаты
диссертаций на соискание ученой степени
доктора и кандидата наук

Индексация:

Scopus
Web of Science (WoS (ESCI))
РИНЦ (Science Index)
RSCI
Ulrich's International Periodicals Directory
Cyberleninka
DOAS

Редакция:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.
Тел.: (382-2)-51-41-53.
<http://bulletin.tomsk.ru>
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Оригинал-макет:

Издательство СибГМУ.
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
Редакторы: Е.Е. Степанова, Ю.П. Готфрид
Перевод: М.Е. Орлова, Дж. Палацца
Электронная верстка, дизайн обложки
Л.Д. Кривцова

Отпечатано в ООО «Литбюро»,
634055, г. Томск, ул. Королёва, 4.

Подписано в печать 23.12.2020 г.
Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.

Бумага мелованная. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 31,25. Усл. печ. л. 30,5.
Тираж 500 экз. Заказ 703.

Цена – свободная.

Дата выхода в свет 26.12.2020.

Подписной индекс 10650 в Объединенном каталоге
«Пресса России» и интернет-каталоге
агентства «Книга-Сервис».

При перепечатке ссылка на
«Бюллетень сибирской медицины» обязательна.

Ответственность за достоверность информации,
содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Новицкий, академик РАН (Томск)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Л.М. Огородова, член-корреспондент РАН (Томск)
О.И. Уразова, член-корреспондент РАН (Томск)

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Калюжин, профессор, д-р мед. наук (Томск)

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

В.М. Алифирова, профессор, д-р мед. наук (Томск)
Л.И. Афанас, академик РАН (Новосибирск)
А.А. Баранов, академик РАН (Москва)
А.И. Венгеровский, профессор, д-р мед. наук (Томск)
Е.Г. Григорьев, член-корреспондент РАН (Иркутск)
А.М. Дыгай, академик РАН (Томск)
М.В. Завьялова, профессор, д-р мед. наук (Томск)
Л.В. Капилевич, профессор, д-р мед. наук (Томск)
С.И. Карась, профессор, д-р мед. наук (Томск)
Р.С. Карпов, академик РАН (Томск)
В.И. Киселев, член-корреспондент РАН (Барнаул)
Н.А. Корнетов, профессор, д-р мед. наук (Томск)
С.В. Логвинов, профессор, д-р мед. наук (Томск)
А.Д. Макацария, член-корреспондент РАН (Москва)
Л.С. Намазова-Баранова, академик РАН (Москва)
С.А. Некрылов, профессор, д-р ист. наук (Томск)
В.П. Пузырев, академик РАН (Томск)
В.И. Стародубов, академик РАН (Москва)
Е.А. Степовая, профессор, д-р мед. наук (Томск)
А.Т. Тепляков, профессор, д-р мед. наук (Томск)
В.А. Ткачук, академик РАН (Москва)
В.А. Труфакин, академик РАН (Новосибирск)
О.С. Федорова, профессор, д-р мед. наук (Томск)
И.А. Хлусов, профессор, д-р мед. наук (Томск)
Е.Л. Чойнзонов, академик РАН (Томск)
А.Г. Чучалин, академик РАН (Москва)
А.В. Шабров, академик РАН (Санкт-Петербург)
В.А. Шкурупий, академик РАН (Новосибирск)
М.С. Юсубов, профессор, д-р хим. наук (Томск)
A. Antsaklis, профессор (Греция)
F. Chervenak, профессор (США)
C. Dadak, профессор (Австрия)
Y. Dekhtyar, профессор (Латвия)
M. Erppl, профессор (Германия)
D. Gailani, профессор (США)
P. Odermatt (Швейцария)
J. Odland (Норвегия)
M. Poyurovsky, профессор (Израиль)
V. Zhdankin, профессор (США)

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

Peer-reviewed scientific-practical journal
Issued quarterly

Volume 19, No. 4, 2020

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (online)

FOUNDER AND PUBLISHER:

Siberian State Medical University, the Ministry
for Healthcare of the Russian Federation

Registered by the Ministry of the Russian Federation for
Affairs of the Press, Television and Radio Broadcasting and
Mass Communication Media
Certificate of registration PI No. 77-7366
dated to 26.03.2001

Bulletin of Siberian Medicine is included:
in the List of peer-reviewed scientific journals
and publications issued in the Russian Federation,
which should publish main scientific results
of doctor's and candidate's theses

Bulletin of Siberian Medicine is indexed:

Scopus
Web of Science (WoS (ESCI))
Science Index
RSCI
Ulrich's International Periodicals Directory
Cyberleninka
DOAS

Editorial Board Office:

107, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation
Telephone: +7-(382-2)-51-41-53.
<http://bulletin.tomsk.ru>
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Publisher: the Siberian State Medical University.
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050,
Russian Federation.

Editors: E.E. Stepanova, Yu.P. Gotfrid
Translate: M.E. Orlova, D. Palazza
Electronic makeup, cover design
L.D. Krivtsova

Printed in Litburo LLC,
4, Korolev Str., Tomsk, 634055, Russian Federation

Signed to print 23.12.2020
Format 60 × 84/8. Offset print.
Coated paper. Times New Roman' font.
P.l. 31,25. C.p.l. 30,5.
500 copies. Odder no 521.

The price – free.
Date of publication 26.12.2020.

Pass-through copyright.
Advertising providers are liable for the truthfulness
of information in advertising materials.

EDITOR-IN-CHIEF

V.V. Novitskiy, *Academician of RAS (Tomsk)*

DEPUTY-EDITORS-IN-CHIEF:

L.M. Ogorodova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*
O.I. Urazova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

SCIENCE EDITOR

V.V. Kalyuzhin, *Professor (Tomsk)*

EDITORIAL BOARD:

V.M. Alifirova, *Professor (Tomsk)*
L.I. Aftanas, *Academician of RAS (Novosibirsk)*
A.A. Baranov, *Academician of RAS (Moscow)*
A.I. Vengerovsky, *Professor (Tomsk)*
Ye.G. Grigoriyev, *Corresponding Member of RAS (Irkutsk)*
A.M. Dygai, *Academician of RAS (Tomsk)*
M.V. Zav'yalova, *Professor (Tomsk)*
L.V. Kapilevich, *Professor (Tomsk)*
S.I. Karas, *Professor (Tomsk)*
R.S. Karpov, *Academician of RAS (Tomsk)*
V.I. Kiselyov, *Corresponding Member of RAS (Barnaul)*
A.N. Kornetov, *Professor (Tomsk)*
S.V. Logvinov, *Professor (Tomsk)*
À.D. Makatsaria, *Corresponding Member of RAS (Moscow)*
L.S. Namazova-Baranova, *Academician of RAS (Moscow)*
S.A. Nekrylov, *Professor (Tomsk)*
V.P. Puzyryov, *Academician of RAS (Tomsk)*
V.I. Starodubov, *Academician of RAS (Moscow)*
Ye.A. Stepovaya, *Professor (Tomsk)*
A.T. Teplyakov, *Professor (Tomsk)*
V.A. Tkachuk, *Academician of RAS (Moscow)*
V.A. Trufakin, *Academician of RAS (Novosibirsk)*
O.S. Fedorova, *Professor (Tomsk)*
I.A. Khlusov, *Professor (Tomsk)*
Ye.L. Choinzonov, *Academician of RAS (Tomsk)*
A.G. Chuchalin, *Academician of RAS (Moscow)*
A.V. Shabrov, *Academician of RAS (St.-Petersburg)*
V.A. Shkurupiy, *Academician of RAS (Novosibirsk)*
M.S. Yusubov, *Professor (Tomsk)*
A. Antsaklis, *Professor (Greece)*
F. Chervenak, *Professor (USA)*
C. Dadak, *Professor (Austria)*
Y. Dekhtyar, *Professor (Latvia)*
M. Epple, *Professor (Germany)*
D. Gailani, *Professor (USA)*
P. Odermatt, *(Switzerland)*
J. Odland, *(Norway)*
M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*
V. Zhdankin, *Professor (USA)*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Байкенова М.Б., Черешнев В.А., Соколова К.В.,
Гетте И.Ф., Емельянов В.В., Данилова И.Г.

Инсулин-позитивные клетки печени и экзокринной части
поджелудочной железы у животных с экспериментальным
сахарным диабетом

Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Быков В.В.,
Смаглий Л.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Гусакова С.В.,
Попов О.С., Васильев В.Н.

Экспериментальная модель метаболического синдрома у
крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты

Ватазин А.В., Зулкарнаев А.Б., Степанов В.А.
Селекция пары «донор – реципиент» с учетом эпитопных
несоответствий при трансплантации почки

Вторушин С.В., Васильченко Д.В., Завьялова М.В.,
Крахмаля Н.В., Паталяк С.В.

Исследование факторов транскрипции GATA3, FOXA1,
ELF5 в оценке прогноза у больных люминальным раком
молочной железы

Галкин С.А., Пешковская А.Г., Рощина О.В., Кисель Н.И.,
Иванова С.А., Бохан Н.А.

Особенности мозговой активности при алкогольной зависи-
мости в задаче на ингибиторный контроль

Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргунов А.В., Малиновская Н.А.,
Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Салмина А.Б.

Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспе-
риментальной болезни Альцгеймера

Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Франциянц Е.М.,
Нескубина И.В., Немашколова Л.А., Медведева Д.Е.,
Маслов А.А.

Редокс формы глутатиона при злокачественном поражении
желудка разной степени агрессивности

Добнер С.Ю., Дубаков А.В., Порковский Я.В., Тузинов С.А.,
Миллер С.В., Родионов Е.О.

Изменение вентиляционной функции легких в процессе фор-
мирования хронической обструктивной болезни легких и при
ее сочетании с раком легкого

Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Генинг С.О.,
Антонеева И.И., Федотова А.Ю.

Параметры глутатионовой системы и тиоредоксина в плазме
крови и асците и полиморфизм гена *GSTP1 Ile105Val* как
факторы резистентности к платиносодержащей химиотера-
пии у больных раком яичников

Застрожин М.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А.,
Скрябин В.Ю., Копоров С.Г., Брюн Е.А., Сычев Д.А.

Полиморфизм 3435C>T гена *ABCB1* (rs1045642) не влияет
на профиль эффективности и безопасности мirtазапина у
пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными
с алкогольной зависимостью

Иванова А.А., Гуражева А.А., Акиншина Е.И.,
Максимова С.В., Малюткина С.К., Новоселов В.П.,
Родина И.А., Хамович О.В., Максимов В.Н.

Метилирование промотора гена *ABCA1* и внезапная сердеч-
ная смерть

ORIGINAL ARTICLES

Baykenova M.B., Chereshev V.A., Sokolova K.V.,
Gette I.F., Emelianov V. V., Danilova I.G.

Insulin-positive cells in liver and exocrine part of
pancreas in animals with experimental diabetes mellitus

Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Bykov V.V.,
Smaglyi L.V., Nosarev A.V., Petrova I.V., Gusakova S.V.,
Popov O.S., Vasilev V.N.

High-fat, high-carbohydrate diet-induced experimental
model of metabolic syndrome in rats

Vatazin A.V., Zulkarnaev A.B., Stepanov V.A.
Donor – recipient selection using epitope mismatches in
kidney transplantation

Vtorushin S.V., Vasilchenko D.V., Zavyalova M.V.,
Krakhmal' N.V., Patalyak S.V.

Studying GATA3, FOXA1, and ELF5 transcription
factors in the evaluation of prognosis in luminal breast
cancer patients

Galkin S.A., Peshkovskaya A.G., Roshchina O.V.,
Kisel N.I., Ivanova S. A., Bokhan N.A.

Features of brain activity in alcohol dependence in the
task of inhibitory control

Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Osipova E.D., Morgun A.V.,
Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Salmina A.B.

Aberrant angiogenesis in brain tissue in experimental
Alzheimer's disease

Goroshinskaya I.A., Surikova E.I., Frantsiyants E.M.,
Neskubina I.V., Nemashkalova L.A., Medvedeva D.E.,
Maslov A.A.

Redox forms of glutathione in malignant lesions of the
stomach with varying aggressiveness degrees

Dobner S.Yu., Dubakov A.V., Porovskiy Ya.V.,
Tuzikov S.A., Miller S.V., Rodionov E.O.

Changes in the ventilation function of the lungs during the
formation of chronic obstructive pulmonary disease and
its combination with lung cancer

Dolgova D.R., Gening T.P., Abakumova T.V.,
Gening S.O., Antoneeva I.I., Fedotova A.Yu.

Parameters of the glutathione system and thioredoxin
in blood plasma and ascites and *GSTP1 Ile105Val* gene
polymorphism as factors of resistance to platinum-
containing chemotherapy in ovarian cancer patients

Zastrozhin M.S., Grishina E.A., Ryzhikova K.A.,
Skryabin V.Yu., Kopyorov S.G., Bryun E.A., Sychev D.A.

Polymorphism 3435c> t of the *ABCB1* gene (rs1045642)
does not affect the mirtazapine efficiency and safety
profile in patients with depressive disorders comorbid
with alcohol use disorder

Ivanova A.A., Gurazheva A.A., Akinshina E.I.,
Maksimova S.V., Malyutina S.K., Novoselov V.P.,
Rodina I.A., Khamovich O.V., Maksimov V.N.

ABCA1 gene promoter methylation and sudden
cardiac death

Калинин Р.Е., Абаленихина Ю.В., Пшенников А.С.,
Виноградов С.А.

Роль восстановленных тиолов в адаптации венозного эндотелия при аутовенозной реконструкции артерий нижних конечностей

Кит О.И., Францянц Е.М., Бандовкина В.А.,
Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Трепитак Л.К.,
Черярина Н.Д., Котиева И.М.

Оказывает ли влияние изменение нейротрансмиттерного статуса мозга на рост перививной меланомы?

Краснова Н.М., Ефремова Е.Н., Егорова А.А.,
Филиппова О.И., Чертовских Я.В., Рудых З.А.,
Алексеева Е.А., Татаринова Т.Е., Сокогуртов Д.А.,
Валь Н.С., Винокурова М.К., Кравченко А.Ф.,
Венгеровский А.И., Сычев Д.А.

Сравнительный анализ результатов генотипирования гена N-ацетилтрансферазы 2 у пациентов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания, проживающих в Республике Саха (Якутия)

Крылова С.Г., Лопатина К.А., Зуева Е.П., Сафонова Е.А.,
Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Афанасьева О.Г.,
Кульпин П.В., Суслов Н.И., Кулагина Д.А., Сысолятин С.В.,
Жданов В.В.

Аналгетическое действие производного гексаазаизовюрцитана на моделях соматической боли, вызванной активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов

Лебедев С.М., Чистохин Д.М., Щаденко С.В., Дзюман А.Н.,
Николаева О.О., Митриченко Д.В., Просолов А.Б.,
Хлусов И.А.

Биоразлагаемые полимерные композиции с остеогенным потенциалом

Маянская С.Д., Гараева Л.А., Тепляков А.Т., Филипенко М.Л.,
Соколова Е.А., Кравцова О.А., Березикова Е.Н.

Особенности полиморфизма генов *FGB*, *TNFA*, *IL-1β*, *LPL*, *ITGB3* и *TGFB1* у пациентов с повторным инфарктом миокарда

Нарыжная Н.В., Мухомедзянов А.В., Цибульников С.Ю.,
Маслов Л.Н.

Рецепторный механизм инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии

Перекуча Н.А., Смолина П.А., Дёмин А.М., Краснов В.П.,
Першина А.Г.

Модификация макрофагов и моноцитов человека магнитными наночастицами *in vitro* для доставки, опосредованной клетками

Салчак С.М., Разуваева Я.Г., Торопова А.А., Аракчаа К.Д.,
Оленников Д.Н., Николаева И.Г.

Гастропротективное влияние *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov при экспериментальной этаноловой гастропатии

Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,
Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р.

Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток

Kalinin R.E., Abalenikhina Yu.V., Pshennikov A.S.,
Vinogradov S.A.

The role of recovered thiols in venous endothel adaptation in case of autovenous reconstruction of lower limb arteries

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A.,
Kapljeva I.V., Surikova E.I., Trepitaki L.K.,
Cheryarina N.D., Kotieva I.M.

Does change in neurotransmitter brain status affect the growth of transplantable melanoma?

Krasnova N.M., Efremova E.N., Egorova A.A.,
Filippova O.I., Chertovskikh Y.V., Rudykh Z.A.,
Aleksheeva E.A., Tatarinova T.E., Sokorutov D.A.,
Val N.S., Vinokurova M.K., Karvchenko A.F.,
Vengerovskii A.I., Sychev D.A.

Comparative analysis of N-acetyltransferase 2 genotyping results among patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis residing in the Sakha Republic (Yakutia)

Krylova S.G., Lopatina K.A., Zueva E.P., Safonova E.A.,
Povet'eva T.N., Nesterova Yu.V., Afanas'eva O.G.,
Kul'pin P.V., Suslov N.I., Kulagina D.A.,
Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V.

Analgesic action of hexaazaisowurtzitane derivative in somatic pain models caused by TRPA1 and TRPV1 Ion channels activation

Lebedev S.M., Chistokhin D.M., Shchadenko S.V.,
Dzuman A.N., Nikolaeva O.O., Mitrichenko D.V.,
Prosolov A.B., Khlusov I.A.

Biodegradable polymer composites with osteogenic potential

Mayanskaya S.D., Garaeva L.A., Teplyakov A.T.,
Filipenko M.L., Sokolova E.A., Kravtsova O.A.,
Berezikova E.N.

FGB, *TNFA*, *IL-1β*, *LPL*, *ITGB3*, and *TGFB1* genes polymorphism in patients with recurrent myocardial infarction

Naryzhnaya N.V., Mukhomedzyanov A.V.,
Tsibulnikov S.Yu., Maslov L.N.

Receptor mechanism of infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia

Perekucha N.A., Smolina P.A., Demin A.M.,
Krasnov V.P., Pershina A.G.

Modification of human monocytes and macrophages by magnetic nanoparticles *in vitro* for cell-based delivery

Salchak S.M., Razuvaeva Ya.G., Toropova A.A.,
Arakchaa K.D., Olennikov D.N., Nikolaev I.G.

Gastroprotective effect of *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov in ethanol-induced gastropath

Smetanenko E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A.,
Pasman N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Placental growth factor exerts modulatory effects on *in vitro* activated T cells

Уфимцева М.А., Изможерова Н.В., Гурковская Е.П.,
Бочкарев Ю.М.

Особенности полиморбидной патологии у больных аутоим-
мунными буллезными дерматозами

Худякова М.И., Черевко Н.А., Новиков П.С.,
Березовская К.В.

Особенности цитокинового профиля у детей с расстройством
аутистического спектра

Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И.,
Патышева М.Р., Новицкий В.В., Голубчиков П.Н.,
Степанова Е.П.

Экспрессия провоспалительных и костимулирующих моле-
кул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких

Эверт Л.С., Терещенко С.Ю., Зайцева О.И., Семенова Н.Б.,
Шубина М.В.

Интернет-зависимость у подростков Центральной Сибири:
анализ распространенности и структура потребляемого
контента

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Ватутин Н.Т., Игнатенко Г.А., Тарадин Г.Г., Ещенко Е.В.,
Гончарук М.С., Куликова С.О.

Поражение сердца при ожоговой болезни (обзор литературы)

Карась С.И., Аржаник М.Б., Кара-Сал Э.Э., Гракова Е.В.,
Васильцева О.Я., Усов В.Ю., Ваизов В.Х., Завадовский К.В.,
Гуляев В.М., Баев А.Е., Колганов С.О., Кочетков С.Б.,
Дацюк В.В., Корнеева Т.Б., Ноздрин Г.К.

Виртуальные пациенты как база проблемно ориентированной
подготовки врачей-кардиологов

Наумова Л.А., Стародумова В.А.

Экстрацеллюлярный матрикс как информационная клеточная
микросреда

Петенёва Е.С., Салмина А.Б., Бердников С.И., Салмин В.В.,
Абрамов В.Г., Медведева Н.Н., Семичев Е.В.

Пищевод Барретта и аденокарцинома пищевода: биомаркеры
пролиферации, апоптоза, аутофагии и ангиогенеза (обзор
литературы)

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Никитина М.А., Брагина Е.Ю., Гомбоева Д.Е.,
Назаренко М.С., Жукова Н.Г., Нуржанова К.Ф.,
Центр Н.В., Алифиров В.М.

Атипичное течение болезни Паркинсона с клиническими
проявлениями болезни Гентингтона у пациентки с аллелем
27 CAG-повторов в гене *HTT*

Шатов Д.В., Григорьев П.Е., Шаланин В.В.

Случай метастазирования рака мочевого пузыря в миокард

Именной указатель 19-го тома

Ufimtseva M.A., Izmozherova N.V., Gurkovskaya E.P.,
Bochkarev Yu.M.

Features of polymorbid pathology in patients with
autoimmune bullous dermatosis

Khudiakova M.I., Cherevko N.A., Novikov P.S.,
Berezovskaya K.V.

Features of the cytokine profile in children with autism
spectrum disorder

Churina E.G., Sitnikova A.V., Urazova O.I., Novitskiy V.V.,
Patyshcheva M.R., Golubchikov P.N.S., Stepanova E.P.

Expression of pro-inflammatory and co-stimulatory
molecules on the surface of macrophages *in vitro* in
patients with pulmonary tuberculosis

Evert L.S., Tereshchenko S.Yu., Zaitseva O.I.,
Semenova N.B., Shubina M.V.

Internet addiction in adolescents in Central Siberia:
analysis of prevalence and structure of consumed content

REVIEWS AND LECTURES

Vatutin N.T., Ignatenko G.A., Taradin G.G.,
Eshchenko E.V., Goncharuk M.S., Kulikova S.O.

Cardiac disorders in burn injury

Karas S.I., Arzhanik M.B., Kara-Sal E.E., Grakova E.V.,
Vasiltseva O.Y., Ussov W.Y., Vaizov V.Kh.,
Zavadovsky K.V., Gulyaev V.M., Baev A.E.,
Kolganov S.O., Kochetkov S.B., Datsuk V.V.,
Korneeva T.B., Nozdrin G.K.

Virtual patients as the basis for problem-based learning of
cardiologists

Naumova L.A., Starodumova V.A.

Extracellular matrix as a cellular information
microenvironment. Extracellular matrix as a cellular
information microenvironment

Peteniyova E.S., Salmina A.B., Berdnikov S.I., Salmin V.V.,
Abramov V.G., Medvedeva N.N., Semichev E.V.

Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma:
biomarkers of proliferation, apoptosis, autophagy and
angiogenesis

CASE CLINICAL PRACTICE

Nikitina M.A., Bragina E.Yu., Nazarenko M.S.,
Zhukova N.G., Gomboeva D.E., Nurzhanova K.F.,
Tsentr N.V., Alifirova V.M.

Atypical course of Parkinson's disease with clinical
manifestations of Huntington's disease in a patient with
an allele of 27 CAG repeats in the *HTT* gene

Shatov D.V., Grigoriev P.E., Shalanin V.V.

A case of myocardial metastasis of bladder cancer

Authors Index of the 19th Volume

УДК 616.379-008.64-021.6:611.36/.37.018.1:612.349.8]-092.9

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>

Инсулин-позитивные клетки печени и экзокринной части поджелудочной железы у животных с экспериментальным сахарным диабетом

Байкенова М.Б.^{1,2}, Черешнев В.А.¹, Соколова К.В.^{1,2}, Гетте И.Ф.¹, Емельянов В.В.², Данилова И.Г.¹

¹ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН) Россия, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

² Уральский федеральный университет (УФУ) имени первого Президента России Б.Н. Ельцина Россия, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: сопоставить количество инсулин-положительных (инсулин⁺) клеток печени и экзокринной части поджелудочной железы с концентрацией глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в крови, а также с количеством Pdx1-положительных (Pdx1⁺) клеток в этих органах при различных типах сахарного диабета в эксперименте.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 25 самцах крыс (линия Вистар, масса (303,0 ± 25,3) г), которые были разделены на три группы: 1-я – интактные животные, 2-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа, 3-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа. В работе осуществляли биохимический, иммуноферментный, иммуногистохимический и статистический анализы.

Результаты. В печени и экзокринной части поджелудочной железы крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го и 2-го типов обнаружены инсулин⁺ и Pdx1⁺-клетки. Наибольшее количество инсулин⁺-клеток в печени отмечается при сахарном диабете 2-го типа. Установлена корреляция между количеством инсулин⁺-клеток в печени и концентрацией HbA_{1c} в крови при сахарном диабете 1-го и 2-го типов.

Заключение. Инсулин⁺-клетки определяются в печени и экзокринной части поджелудочной железы интактных животных и крыс, у которых воспроизведена модель сахарного диабета 1-го и 2-го типов. Животные с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа характеризуются большим количеством инсулин⁺-клеток печени по сравнению с крысами с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа. В зависимости от типа сахарного диабета в печени меняется локализация инсулин⁺-клеток. При экспериментальном сахарном диабете 2-го типа инсулин⁺-клетки печени расположены во всех частях печеночной доли, тогда как у животных с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа эти клетки обнаруживаются преимущественно перипортально. Вероятно, экспрессия Pdx1⁺ в ацинарных клетках поджелудочной железы и клетках печени представляет собой механизм их перепрограммирования в инсулин⁺-клетки при экспериментальном сахарном диабете.

Ключевые слова: сахарный диабет, поджелудочная железа, печень, инсулин⁺-клетки, Pdx1⁺-клетки.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 16-1500039-П) и бюджетной темы ИИФ УрО РАН (№ АААА-А18-118020590108-7).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол No-d-TM-2016-20).

Для цитирования: Байкенова М.Б., Черешнев В.А., Соколова К.В., Гетте И.Ф., Емельянов В.В., Данилова И.Г. Инсулин-позитивные клетки печени и экзокринной части поджелудочной железы у животных с экспериментальным сахарным диабетом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 6–13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>.

Insulin-positive cells in liver and exocrine part of pancreas in animals with experimental diabetes mellitus

Baykenova M.B.^{1,2}, Chereshnev V.A.¹, Sokolova K.V.^{1,2}, Gette I.F.¹, Emelianov V.V.², Danilova I.G.¹

¹ Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (UB RAS) 106, Pervomaiskaya Str., Yekaterinburg, 620219, Russian Federation

² Ural Federal University (UrFU) named after the first President of Russia B.N. Yeltsin 19, Mira Str., Yekaterinburg, 620002, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To compare the number of insulin⁺ cells in the liver and exocrine part of the pancreas with the type of experimental diabetes, blood glucose and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) level and with the number of Pdx1⁺ cells.

Materials and methods. The experiment was carried out on 25 male Wistar rats (weighting (303.0 ± 25.3) g) that were divided into 3 groups: the first group consisted of intact animals, the second had animals with experimental diabetes type 1, and the third with animals with experimental diabetes type 2. Biochemical, immunohistochemical, ELISA methods and statistical analysis were used.

Results. Insulin⁺ and Pdx1⁺ cells of rats with experimental diabetes were found in the liver and exocrine part of pancreas. The highest number of insulin⁺ cells in the liver was detected in type 2 diabetes (T2D). A strong positive correlation between the number of insulin⁺ cells in the liver and level of glycosylated hemoglobin in the blood was revealed in both type 1 and type 2 diabetes.

Conclusion. Insulin⁺ cells are detected in the liver and acinar part of pancreas of both intact rats and rats with experimental diabetes. Group with T2D is characterized by the highest number of insulin⁺ cells in the liver compared with type 1 diabetes (T1D). The localization of insulin⁺ cells in the liver changes depending on the type of diabetes. In T2D insulin⁺ cells are located in all parts of liver acini, meanwhile in animals with T1D such cells are mainly detected in the periportal area. The expression of Pdx1⁺ in acinar cells of pancreas and liver cells is likely a mechanism for their reprogramming into insulin⁺ cells in experimental diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, pancreas, liver, insulin⁺ cells, Pdx1⁺ cells.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. This work was financially supported by the Russian Science Foundation, grant No. 16-1500039-П and the budget project No. AAAA-A18-118020590108-7 of the Institute of Immunology and Physiology UB RAS.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under the Institute of Immunology and Physiology UB RAS (Protocol No-d-TM-2016-20).

For citation: Baykenova M.B., Chereshnev V.A., Sokolova K.V., Gette I.F., Emelianov V.V., Danilova I.G. Insulin-positive cells in liver and exocrine part of pancreas in animals with experimental diabetes mellitus. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 6–13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-6-13>.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения сахарного диабета (СД) обусловлена его широким распространением, инвалидизацией и высоким уровнем смертности пациентов. В настоящее время в мире сахарный диабет диагностирован у 422 млн человек [1]. Экспоненциальное увеличение числа пациентов с СД требует новых терапевтических стратегий для снижения социально-экономического бремени этого заболевания [2]. СД – хроническое эндокринное заболевание, которое характеризуется перманентной гипергликемией, возникающей на фоне абсолютной или относительной недостаточности инсулина. Сахарный диабет 1-го (СД1) и 2-го типа (СД2) характеризуется неспособностью эндокринных клеток (β -клеток) панкреатических островков удовлетворять потребность организма в инсулине из-за своей почти полной потери или функционального дефицита β -клеток в условиях инсулинорезистентности. Дефицит β -клеток (~90% при длительно существующем СД1, ~65% при длительно существующем СД2) считается следствием гибели β -клеток [3].

Синтез инсулина является специфическим для β -клеток панкреатических островков и жестко контролируется на уровне транскрипции. Фактор транскрипции Pdx1 определяет скорость транскрипции и стабильность м-РНК инсулина. Pdx1 является как фактором дифференцировки β -клеток во время эмбриогенеза, так и регулятором инсулин-продуцирующей функции клеток панкреатических островков в постнатальном периоде развития [4]. В процессе дифференцировки β -клеток экспрессия Pdx1 усиливается, а в экзокринных эпителиоцитах ацинусов и выводных протоков поджелудочной железы экспрессия данного гена, напротив, постепенно снижается. Предполагают, что в постнатальном периоде экспрессия Pdx1 сохраняется у здоровых животных только в β -клетках [5]. Однако в настоящее время инсулин-положительные (инсулин⁺) клетки были обнаружены в экзокринной части поджелудочной железы, головном и костном мозге, селезенке, печени и жировой ткани животных [6, 7].

Паренхима печени и поджелудочная железа в онтогенезе имеют энтодермальное происхождение. Есть предположение, что оба органа включают единые плюрипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться как в гепатоциты, так и в β -клетки поджелудочной железы. Более того, гепатоциты и β -клетки поджелудочной железы экспрессируют большую группу специфических транскрипционных факторов, а также используют однотипную систему транспорта глюкозы в клетку (GLUT2) и

включают ее в метаболизм путем фосфорилирования глюкокиназой [8].

На основании вышеизложенного цель нашего исследования – сопоставить количество инсулин⁺-клеток печени и экзокринной части поджелудочной железы с концентрацией глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в крови, а также с количеством Pdx1⁺-клеток в этих органах при различных типах сахарного диабета в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 25 самцах крыс линии Вистар массой (303,0 ± 25,3) г, которые были распределены на три группы: 1-я – интактные животные ($n = 10$), 2-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа ($n = 8$), 3-я – животные с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа ($n = 7$). Моделирование СД1 производилось внутрибрюшинным введением аллоксана, разведенного в 0,85%-м растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 170 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [9]. СД2 моделировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина, разведенного в цитратном буфере, в дозе 65 мг/кг массы тела животного, с предварительным (за 15 мин) внутрибрюшинным введением водного раствора никотиамида в дозе 110 мг/кг массы тела животного [10]. Животных выводили из эксперимента на 30-е сут передозировкой эфирного наркоза. Предварительно у крыс брали кровь из хвостовой вены. После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали поджелудочную железу и печень. Фрагменты этих органов фиксировали в 10%-м водном растворе нейтрального формалина 24 ч. После промывки (8 ч) фрагменты органов подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы толщиной 3–4 мкм изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия).

Для верификации формирования модели СД в крови животных определяли концентрацию глюкозы, HbA_{1c} и инсулина. Концентрацию глюкозы и HbA_{1c} определяли с использованием стандартных наборов (Вектор Бест, Россия; Гликогемтест, Россия), инсулина – иммуноферментным методом с использованием набора Rat/Mouse Insulin ELISA (Millipore, США) и иммуноферментного автоматического анализатора LAZURITE (Dynex Technologies, США).

Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы и печени проводили с ис-

пользованием антител к инсулину и проинсулину (cloneINS04+INS05, Invitrogen, США) и антител к Pdx1⁺ (Abcam, США) по стандартным протоколам производителей антител. Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1 : 200 и инкубировали при 4 °С в течение 16 ч. Выявление инсулина велось с использованием авидин-биотин-пероксидазного комплекса, Pdx1⁺ – с помощью козьего иммуноглобулина (Ig) G (H + L) к антигенам мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США). Для проверки протокола и исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. Позитивным контролем для иммуногистохимического выявления инсулина и Pdx1⁺ являлись срезы поджелудочной железы intactных крыс [11, 12]. Негативный контроль окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [12, 13].

Подсчет инсулин⁺-клеток проводили на световом микроскопе Leica DM 2500 (Leica, Германия), анализ изображений выполняли в программе «Видео Тест-Морфология 5.0» (Видеотест, Россия), подсчет Pdx1⁺-клеток осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программы ZEN 2.0 (Carl Zeiss, Германия).

В экзокринной части поджелудочной железы подсчитывали количество инсулин⁺-клеток и Pdx1⁺-клеток в 1 мм² среза органа, в печени – количество инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток в печеночных пластинках во всех зонах печеночной долики, в синусоидных капиллярах – общее количество синусоидальных клеток на протяжении всей печеночной долики, а также общее количество инсулин⁺-синусоидальных клеток, расположенных во всех частях печеночной долики в 1 мм² среза печени. Функциональную активность инсулин⁺-клеток оценивали по оптической плотности их цитоплазмы.

Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0 (DELL, США), OriginPro 9.0 (Origin Lab, США) и Microsoft Excel 2003 (Microsoft, США). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок применялся непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни, а также критерий Краскела – Уоллиса. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm m$). Для выявления взаимосвязи числа инсулин⁺-клеток, Pdx1⁺-клеток и концентрации глюкозы, HbA_{1c} в крови рассчитывали коэффициент парной линейной корреляции (r) Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация глюкозы и HbA_{1c} в крови крыс при экспериментальном СД1 и СД2 по сравнению с аналогичными показателями intactных животных увеличена, тогда как концентрация инсулина в плазме крови крыс снижена только при СД1. При СД2 концентрация инсулина в плазме крови крыс выше аналогичного показателя животных группы СД1, что характерно для СД2 (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация глюкозы, HbA _{1c} и инсулина в крови крыс во всех группах, $M \pm m$			
Показатель	Группа 1 (intactные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
Глюкоза, ммоль/л	5,00 ± 0,30	10,88 ± 0,46*	10,90 ± 0,50*
HbA _{1c} , %	4,40 ± 0,30	6,73 ± 0,78*	6,58 ± 0,97*
Инсулин, мкг/л	1,28 ± 0,19	0,50 ± 0,09*	1,00 ± 0,13 #

* различие по сравнению с показателем контроля ($p < 0,05$); # различие по сравнению с показателем группы СД1 ($p < 0,05$) (здесь и в табл. 2–4).

Иммуногистохимический анализ показал наличие инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток в экзокринной части поджелудочной железы и печени во всех зонах печеночной долики экспериментальных животных (рис.).

Количество инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток в экзокринной части поджелудочной железы при СД1 и СД2 не отличается от их содержания у intactных животных. Количество инсулин⁺-клеток в печени у животных с СД1 и СД2 выше, чем у intactных животных. При СД1 инсулин⁺-клетки в печени локализованы преимущественно в периферической зоне печеночной долики, при СД2 данные клетки встречаются во всех зонах печеночной долики. Подсчет общего количества инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток осуществлялся на всем протяжении печеночной долики. Также отдельно приведены данные количества инсулин⁺-клеток в периферической зоне печеночной долики. Количество Pdx1⁺-клеток в печени крыс с экспериментальным СД увеличено по сравнению с intactными животными. Данный показатель у крыс группы СД1 выше аналогичного показателя intactных животных (табл. 2).

Оптическая плотность цитоплазмы инсулин⁺-клеток в печени и поджелудочной железе при СД1 меньше, чем у intactных животных. У животных с экспериментальным СД1, в отличие от крыс с экспериментальным СД2, возрастает продукция инсулина в инсулин⁺-синусоидальных клетках, поскольку величина оптической плотности цитоплазмы этих клеток выше по сравнению с аналогичными показателями у intactных животных и крыс с экспериментальным СД2 (табл. 3).

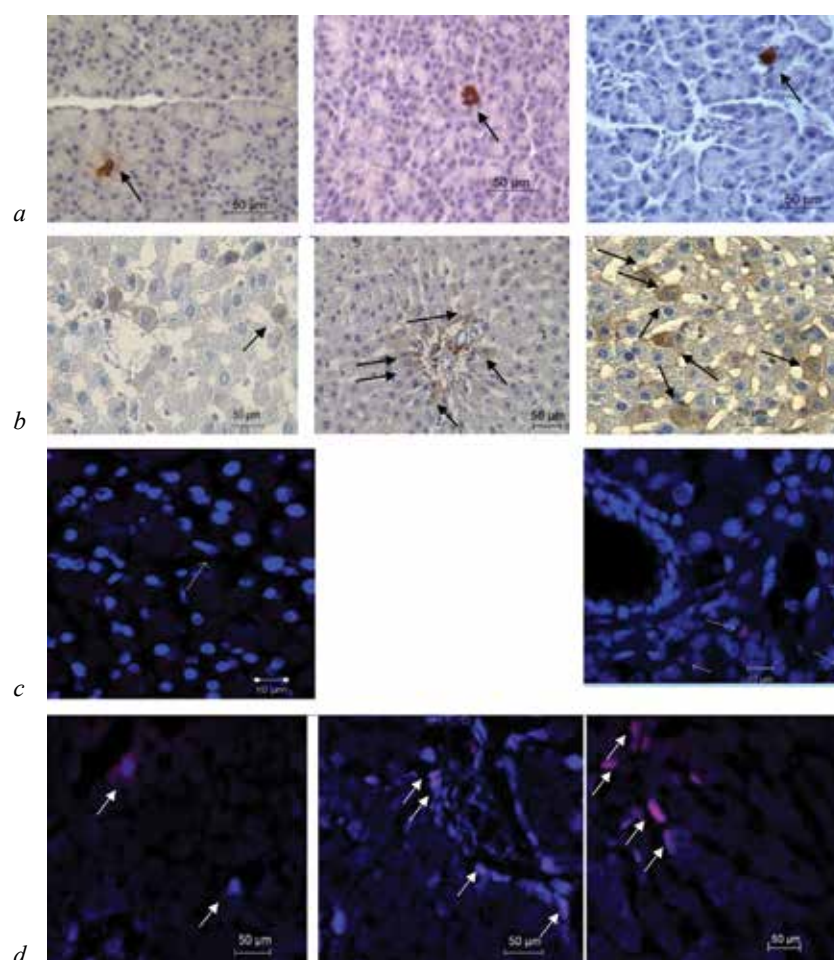


Рисунок. Поджелудочная железа (a, c) и печень (b, d) intactных животных, животных с СД1 и СД2; иммуногистохимическое окрашивание на инсулин (a, b) и иммунофлуоресцентное окрашивание на Pdx1⁺ (c, d): стрелками показаны инсулин⁺- и Pdx1⁺-клетки, $\times 400$

Таблица 2

Количество инсулин ⁺ - и Pdx1 ⁺ -клеток в печени и экзокринной части поджелудочной железы крыс, шт./мм ² среза органа, $M \pm m$			
Показатель	Группа 1 (интактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
Количество инсулин ⁺ -клеток в экзокринной части поджелудочной железы	$3,50 \pm 0,54$	$3,67 \pm 0,73$	$3,15 \pm 0,34$
Количество Pdx1 ⁺ -клеток в экзокринной части поджелудочной железы	$27,34 \pm 4,92$	—	$21,54 \pm 3,22$
Количество инсулин ⁺ -клеток в печеночных пластинках печени	$14,26 \pm 0,84$	$24,86 \pm 2,36^*$	$151,50 \pm 7,34^{* \#}$
Количество инсулин ⁺ -клеток в печеночных пластинках в периферической зоне	0	$13,58 \pm 3,08^*$	$41,10 \pm 4,93^{* \#}$
Количество Pdx1 ⁺ -клеток в печени	$32,11 \pm 2,14$	$42,72 \pm 1,59^*$	$34,09 \pm 2,46$

Таблица 3

Оптическая плотность (ОП) цитоплазмы инсулин ⁺ -клеток в печени и экзокринной части поджелудочной железы крыс, усл. ед., $M \pm m$			
Показатель	Группа 1 (интактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
ОП цитоплазмы инсулин ⁺ -клеток в экзокринной части поджелудочной железы	$0,44 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,02^*$	$0,42 \pm 0,02$
ОП цитоплазмы инсулин ⁺ -клеток в печеночных пластинках	$0,20 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,012^*$	$0,19 \pm 0,01$
ОП цитоплазмы инсулин ⁺ -синусоидальных клеток	$0,29 \pm 0,24$	$0,35 \pm 0,01^*$	$0,30 \pm 0,01^{\#}$

Число инсулин⁺-синусоидальных клеток увеличено при разных типах СД по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных. Наибольшее

значение этот показатель достигает у крыс с экспериментальным СД2, при этом локализованы данные клетки во всех зонах печеночной долики (табл. 4).

Таблица 4

Количество синусоидальных и инсулин ⁺ -синусоидальных клеток в печени крыс, шт./мм ² среза печени, $M \pm m$			
Показатель	Группа 1 (интактные животные)	Группа 2 (животные с СД1)	Группа 3 (животные с СД2)
Общее количество синусоидальных клеток	387,11 ± 14,19	645,22 ± 33,95*	713,15 ± 33,47*#
Общее количество инсулин ⁺ -синусоидальных клеток	13,82 ± 0,63	19,19 ± 0,89*	37,80 ± 3,39*#
Количество инсулин ⁺ -синусоидальных клеток в периферической зоне печеночной долики	0,63 ± 0,03 (4,6 ± 0,02%)	5,64 ± 0,32* (29,7 ± 2,80%)*	17,91 ± 2,71*# (48,1 ± 7,70%)*#

Для определения связи между количеством инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток печени с концентрацией глюкозы в крови крыс использовался коэффициент парной линейной корреляции. Полученные результаты демонстрируют сильную положительную корреляцию между количеством инсулин⁺-клеток печени и концентрацией HbA_{1c} в крови, что свидетельствует о гипергликемии в течение месяца как при СД1, так и при СД2. В то же время имеется слабая положительная корреляция между количеством инсулин⁺-клеток печени и концентрацией глюкозы в крови крыс, измеренной на 30-е сут, при СД1 и положительная корреляция средней силы – при СД2. Установлено, что между количеством инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток печени имеется слабая обратная корреляция (табл. 5). Так, при СД1 количество инсулин⁺-клеток печени меньше, чем при СД2, однако количество Pdx1⁺-клеток увеличено по сравнению с СД2. Взаимосвязь между концентрацией HbA_{1c} и количеством Pdx1⁺-клеток при СД1 и СД2 слабо выражена. Коэффициент парной линейной корреляции между концентрацией глюкозы и количеством Pdx1⁺-клеток при СД1 – относительно высокий, при этом СД2 характеризуется более низкой взаимосвязью этих параметров.

Таблица 5

Коэффициент парной линейной корреляции между количеством инсулин ⁺ -клеток и Pdx1 ⁺ -клеток и концентрацией глюкозы и HbA _{1c} в крови, а также между количеством инсулин ⁺ - и Pdx1 ⁺ -клеток в печени у крыс			
Тип клеток	Глюкоза	HbA _{1c}	Pdx1 ⁺ клетки
Инсулин ⁺ -клетки печени при СД1	0,13	0,84	–0,49
Инсулин ⁺ -клетки печени при СД2	0,58	0,98	–0,25
Pdx1 ⁺ -клетки печени при СД1	0,84	0,47	–
Pdx1 ⁺ -клетки печени при СД2	0,26	0,41	–

ОБСУЖДЕНИЕ

Недостаточное количество и дисфункция инсулин-продуцирующих β-клеток панкреатических островков являются основной причиной гипергликемии и связанных с ней осложнений, возникающих

при СД1 и СД2 [14]. Поиск методов, направленных на увеличение количества и повышение функциональной активности сохранившихся β-клеток при СД, является перспективной стратегией для лечения обоих типов диабета. Инсулин⁺-клетки, обнаруженные в различных органах, привлекают все большее внимание исследователей, поскольку могут частично компенсировать повреждение β-клеток панкреатических островков при СД [15]. В работе были изучены количество и локализация инсулин⁺-клеток в печени и экзокринной части поджелудочной железы в зависимости от типа экспериментального СД.

Инсулин⁺-клетки обнаруживаются в паренхиме печени и поджелудочной железы (вне панкреатических островков) в небольшом количестве у интактных животных. В поджелудочной железе крыс количество этих клеток остается постоянным при СД1 и СД2. Оптическая плотность цитоплазмы этих клеток также не отличается в условиях моделирования СД1 и СД2.

Увеличение количества инсулин⁺-клеток у крыс с экспериментальной моделью СД1 и СД2 выявляется только в печени. Существуют различия не только в количестве инсулин⁺-клеток в зависимости от типа диабета (при СД2 типа их число почти в 5 раз больше, чем в печени животных с СД1), но и в локализации этих клеток. При СД2 инсулин⁺-клетки расположены во всех частях печеночной долики, тогда как у животных группы СД1 эти клетки обнаруживаются преимущественно в периферической зоне. По структуре, размерам и расположению инсулин⁺-клетки в печени соответствуют гепатоцитам.

Синусоидальные клетки печени (СКП) расположены вдоль печеночных синусоидов и составляют около 33% клеток паренхимы печени. К СКП относят эндотелиальные клетки, звездчатые макрофаги (клетки Купфера) [16], перисинусоидальные липоциты (клетки Ито), pit-клетки и дендритные клетки. СКП обладают способностью к фагоцитозу и пиноцитозу и участвуют в широком спектре иммунологических реакций [17].

При анализе количества СКП было установлено, что их число увеличивается при обоих типах СД, но в большей степени при СД2. Нами обнаружено, что при СД2 количество инсулин⁺-синусоидальных клеток больше, чем при СД1. Подсчет количества инсулин⁺-синусоидальных клеток в периферической зоне печеночной дольки необходим для сравнения данного показателя с количеством инсулин⁺-клеток в печеночных пластинках (предположительно гепатоциты), расположенных в аналогичной зоне. Имеются данные [6], что инсулин⁺-гепатоциты локализуются преимущественно в первой (периферической) зоне печеночной дольки. В связи с этим количество инсулин⁺-синусоидальных клеток, расположенных в промежуточной (второй) зоне, не указано. Инсулин⁺-гепатоциты характеризуются в целом более низкой оптической плотностью цитоплазмы по сравнению с β -клетками поджелудочной железы, что свидетельствует об относительно небольшом содержании инсулина в этих клетках и отражает их низкую функциональную активность. Увеличение количества клеток данного типа может быть как результатом синтеза инсулина в самих клетках, так и их способности к эндоцитозу внеклеточного инсулина [18].

Панкреатический и дуоденальный белок Pdx1 является ключевым фактором в развитии, пролиферации и функционировании β -клеток панкреатических островков [19]. Он способен связываться с промотором гена инсулина, GLUT-2, глюкокиназой и другими, регулируя экспрессию генов этих белков [20]. Считается, что Pdx1 может перепрограммировать любые клетки, стимулируя в них синтез инсулина [21]. Мы наблюдали различия в изменении количества Pdx1⁺-клеток печени на экспериментальных моделях СД: при СД1 их количество значимо увеличивается, при СД2 их количество не изменяется. Коэффициент парной линейной корреляции свидетельствует о сильной связи числа Pdx1⁺-клеток печени с концентрацией HbA_{1c} в крови, отражающего выраженность гипергликемии в течение эксперимента. Вероятно, при моделировании СД1 инсулин-продуцирующие клетки печени не компенсируют недостаток инсулина, поэтому требуется дополнительная продукция Pdx1. Напротив, у животных с СД2 нормализация концентрации инсулина в крови не требует дальнейшего перепрограммирования гепатоцитов в инсулин-продуцирующие клетки. Также нельзя исключить, что причиной выявленных различий между животными с СД1 и СД2 может быть участие в дифференцировке инсулин-продуцирующих клеток других транскрипционных факторов, в частности Nkx 6.1 [5]. Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о существовании обратной связи

между концентрацией инсулина в крови и продукцией Pdx1 в гепатоцитах как механизма компенсации гипоинсулинемии при СД.

Таким образом, при экспериментальном СД1 и СД2 недостаток инсулина может быть восполнен увеличением количества клеток, продуцирующих инсулин, в печени и экзокринной части поджелудочной железы. В качестве механизма получения большего количества инсулин-продуцирующих клеток может рассматриваться перепрограммирование дифференцированных клеток, таких как гепатоциты, в инсулин⁺-клетки. Новые подходы в лечении СД, направленные на увеличение экспрессии Pdx1 и количества инсулин⁺-клеток в различных органах, представляются чрезвычайно перспективными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что при экспериментальном СД1 и СД2 в печени крыс увеличивается количество инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток. У животных с экспериментальным СД1 инсулин⁺-клетки печени обнаруживаются преимущественно в периферической зоне печеночной дольки. При экспериментальном СД2 инсулин⁺-клетки расположены во всех частях печеночной дольки, а количество Pdx1⁺-клеток не отличается от такового у интактных животных. Выявлена сильная положительная корреляция количества инсулин⁺-клеток печени от концентрации HbA_{1c} в крови как при СД1, так и при СД2. Корреляция между количеством инсулин⁺-клеток печени и концентрацией глюкозы в крови крыс на 30-е сут эксперимента положительная, слабая при СД1 и средняя при СД2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harris-Hayes M., Schootman M., Schootman J.C., Hastings M.K. The Role of physical therapists in fighting the type 2 diabetes epidemic. *J. Orthop. Sports. Phys. Ther.* 2020; 50 (1): 5–16.
2. Salinno C., Cota P., Bastidas-Ponce A., Tarquis-Medina M., Lickert H, Bakhti M. β -Cell maturation and identity in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019; 20 (21): 5417–5422.
3. Moin A.S.M., Butler A.E. Alterations in betacell identity in type 1 and type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports.* 2019; 19 (9): 83. DOI: 10.1007/s11892-019-1194-6.
4. Hui H., Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *European Journal of Endocrinology.* 2002; 146 (2): 129–141. DOI: 10.1530/eje.0.1460129.
5. Oster A., Jensen J., Serup P., Galante P., Madsen O.D., Larsson L.I. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *Histochem. Cytochem.* 1998; 46 (6): 707–715.
6. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. Extrapancreatic insulin producing cells in multiple

- organs in diabetes. *PNAS*. 2004; 101 (8): 2458–2463. DOI: 10.1073/pnas.0308690100.
7. Beamish C.A., Strutt B.J., Arany E.J., Hill D.J. Insulin-positive, Glut2-low cells present within mouse pancreas exhibit lineage plasticity and are enriched within extra-islet endocrine cell clusters. *Islets*. 2016; 8 (3): 65–82. DOI: 10.1080/19382014.2016.1162367.
 8. Dong-Sik H., Juyoung S., Ji-Won K., Heon-Seok P., Jae-Hyoun C., Kun-Ho Y. Generation of functional insulin-producing cells from neonatal porcine liver-derived cells by PDX1/VP16, BETA2/NeuroD and MafA. *PLoS One*. 2013; 8 (11): 76–79.
 9. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение № 2534411; 2014.
 10. Спасов А.А., Воронкова М.П., Сингур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина*. 2011; (3): 12–18.
 11. Hewitt S.M., Baskin D.G., Frevert C.W., Stahl W.L., Rosa-Molinari E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J. Histochem. Cytochem.* 2014; 62 (10): 693–697. DOI: 10.1369/0022155414545224.
 12. Seeberger K.L., Anderson S.J., Ellis C.E., Yeung T.Y., Korbitt G.S. Identification and differentiation of PDX1 β -cell progenitors within the human pancreatic epithelium. *World J. Diabetes*. 2014; 5 (1): 59–68. DOI: 10.4239/wjd.v5.i1.59.
 13. Иммуногистохимические методы: руководство; пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П. Г. Малькова. М., 2011: 224.
 14. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 311–335.
 15. Kojima H., Fujimiya M., Terashima T., Kimura H., Chan L. Extrapancratic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: Is history repeating itself? *Endocr. J.* 2006; 53 (6): 715–722.
 16. Okada T., Kimura A., Kanki K., Nakatani S., Nagahara Y., Hiraga M. et al. Liver Resident macrophages (Kupffer cells) share several functional antigens in common with endothelial cells. *Scandinavian Journal of Immunology Experimental Immunology*. 2016; 83: 139–150.
 17. Банин В.В., Белоусова Т.А., Быков В.Л. и др. Terminologia histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов: справочное пособие; под ред. В.В. Банина, В.Л. Быкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009: 272.
 18. Vekemans K., Braet F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 1 (33): 5095–5102. DOI: 10.3748/wjg.v11.i33.5095.
 19. Chakrabarti S.K., James J.C., Mirmira R.G. Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, PDX1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 13286–13293.
 20. Andrali S., Smapley M., Vanderford N., Ozcan S. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Biochemical Journal*. 2008; 415 (1): 1–10.
 21. Koblas T., Leontovyc I., Loukotova S., Kosinova L., Saudek F. Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J into insulin-producing cells using mRNAs for PDX1, Ngn3, and MafA transcription Factors. *Official Journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*. 2016; 5: 1–12.

Вклад авторов

Байкенова М.Б., Соколова К.В. – работа с экспериментальными животными, выполнение лабораторной части исследования, статистическая обработка результатов исследования. Черешнев В.А. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Гетте И.Ф. – разработка концепции и дизайна исследования, постановка эксперимента, моделирование СД. Емельянов В.В., Данилова И.Г. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи.

Сведения об авторах

Байкенова Мадина Багатчановна, мл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН; аспирант, УФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-5697-0370.

Черешнев Валерий Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, гл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0002-5777-8097.

Соколова Ксения Викторовна, мл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН; аспирант, УФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0002-7024-4110.

Гетте Ирина Федоровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0003-3012-850X.

Емельянов Виктор Владимирович, канд. мед. наук, доцент, кафедра иммунохимии, кафедра медицинской биохимии и биологии, УФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург.

Данилова Ирина Георгиевна, д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией морфологии и биохимии, ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-6841-1197.

(✉) **Байкенова Мадина Багатчановна**, e-mail: m.b.baikenova@urfu.ru.

Поступила в редакцию 18.02.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Экспериментальная модель метаболического синдрома у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты

Бирулина Ю.Г.¹, Иванов В.В.¹, Буйко Е.Е.^{1,2}, Быков В.В.^{1,3}, Смаглий Л.В.¹, Носарев А.В.¹, Петрова И.В.¹, Гусакова С.В.¹, Попов О.С.¹, Васильев В.Н.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

³ ООО «Инновационные фармакологические разработки»
Россия, 634021, г. Томск, ул. Елизаровых, 79/4

РЕЗЮМЕ

Цель. Разработать экспериментальную модель метаболического синдрома (МС) у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 20 самцах крыс линии Вистар, которые были распределены на контрольную и опытную группы. Крысы контрольной группы находились на стандартной диете. Крысы опытной группы в течение 12 нед получали высокожировую и высокоуглеводную диету, содержащую животный жир (17%), фруктозу (17%) и 20%-й раствор фруктозы вместо питьевой воды. В конце исследования у животных измеряли массу тела, артериальное давление (АД), проводили глюкозотолерантный (ГТТ) и инсулинотолерантный (ИТТ) тесты. В плазме крови определяли отдельные показатели липидного обмена, в печени – содержание триацилглицеролов (ТАГ) и холестерина (ХС).

Результаты. Содержание животных на высокожировой и высокоуглеводной диете в течение 12 нед приводило к повышению АД, увеличению удельной массы висцеральной жировой ткани. Выполнение ГТТ и ИТТ позволило выявить у крыс с МС гипергликемию, нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентность. Было обнаружено увеличение концентрации ТАГ в плазме крови крыс опытной группы, при этом уровень общего ХС не отличался от контроля. У крыс с МС наблюдалось увеличение удельной массы печени, а также содержания в ней ТАГ и ХС.

Заключение. Полученная экспериментальная модель диет-индуцированного метаболического синдрома воспроизводит большинство типичных признаков МС у человека и может быть полезна в изучении патофизиологических основ развития МС и методов его профилактики и лечения.

Ключевые слова: метаболический синдром, высокожировая и высокоуглеводная диета, ожирение, дислипидемия, гипергликемия, инсулинорезистентность.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта № 19-415-703015 (№ 18-44-700009, 18-44703008) и Совета по грантам президента Российской Федерации (МК-143.2020.4).

Соответствие принципам этики. Исследование выполнено с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7793 от 27.05.2019).

Для цитирования: Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Быков В.В., Смаглий Л.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Гусакова С.В., Попов О.С., Васильев В.Н. Экспериментальная модель метаболического синдрома у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 14–20. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-14-20>.

High-fat, high-carbohydrate diet-induced experimental model of metabolic syndrome in rats

Birulina J.G.¹, Ivanov V.V.¹, Buyko E.E.^{1,2}, Bykov V.V.^{1,3}, Smaglyi L.V.¹, Nosarev A.V.¹, Petrova I.V.¹, Gusakova S.V.¹, Popov O.S.¹, Vasilev V.N.¹

¹ *Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation*

² *National Research Tomsk Polytechnic University
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation*

³ *Innovative Pharmacology Research
79/4, Elizarovikh Str., Tomsk, 634021, Russian Federation*

ABSTRACT

Purpose. The study is focused on development of high-fat, high-carbohydrate diet-induced experimental model of metabolic syndrome (MS) in rats.

Materials and methods. The 6-week old Wistar rats ($n = 20$) were used for study. Rats were separated into control and *experimental* groups. The rats from the control group were fed standard rat chow. The rats from the experimental group had a high-fat, high-carbohydrate diet rich in lard (17%) and fructose (17%) and drank 20% fructose solution. At the end of the study, body weight and blood pressure (BP) were assessed. After 12 weeks of a diet load, an oral glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were carried out. Lipid and protein biochemical parameters in plasma were analyzed. Adipose tissue and liver were measured at the end of the study. The levels of triacylglycerol (TAG) and cholesterol (Ch) in the liver were determined by enzymatic methods.

Results. High-fat, high-carbohydrate diet feeding in rats for 12 weeks led to BP elevation and increase in the adipose tissue/body weight ratio. Hyperglycemia, impaired glucose tolerance and insulin resistance were found in rats with MS by means of GTT and ITT. Elevation of plasma TAG level was observed in the experimental group, although plasma total Ch and HDL-Ch did not differ from those of controls. Liver/body weight ratio and the level of TAG and Ch in the liver were elevated in rats with MS.

Conclusion. Experimental rat model of diet-induced MS reproduces many aspects of MS in humans. This model may be useful for studying the pathophysiology of MS and methods for its prevention and treatment.

Key words: metabolic syndrome, high-fat, high-carbohydrate diet, obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, insulin resistance.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. The study was funded by RFBR and Tomsk region according to the research project No. 19-415-703015 (No. 18-44-700009, 18-44703008) and by The Council for Grants of the President of the Russian Federation (CS-143.2020.4).

Conformity with the principles of ethics. The study was carried out in compliance with the principles of humanity set out in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki. The study was approved by the ethics committee at SSMU (Protocol No. 7793 of 27.05.2019).

For citation: Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Bykov V.V., Smaglyi L.V., Nosarev A.V., Petrova I.V., Gusakova S.V., Popov O.S., Vasilev V.N. High-fat, high-carbohydrate diet-induced experimental model of metabolic syndrome in rats. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 14–20. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-14-20>.

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность метаболического синдрома (МС) в современном обществе стремительно увеличивается в течение последних лет, что становится причиной повышенной заболеваемости и смертности населения. По данным Международной федерации диабета (International Diabetes Federation, IDF), 25–68% людей во всем мире страдают МС [1, 2]. Наиболее значимыми факторами развития МС считаются абдоминальное ожирение и инсулинорезистентность [3, 4]. IDF определяет МС как состояние, включающее висцеральное ожирение и по крайней мере два из следующих параметров: высокий уровень триацилглицеролов (ТАГ), низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), повышенное артериальное давление (АД) и гипергликемию [1]. Таким образом, МС представляет собой сложный комплекс метаболических, гормональных и гемодинамических нарушений, увеличивающих риск развития сахарного диабета 2-го типа, неалкогольной жировой болезни печени и сердечно-сосудистых заболеваний [3, 5, 6].

Для изучения патофизиологических механизмов развития МС и методов его профилактики и терапии необходима разработка доступных экспериментальных моделей [7–9]. Одним из подходов является использование животных с генетическим дефектом, вызывающим развитие различных патологических изменений, характерных для МС у людей. Также существуют разработки по индукции этих нарушений с помощью специальных диет [7]. В последние годы все большее распространение приобретает комбинированная высокожировая диета с повышенным содержанием углеводов (также именуемая как западная диета, диета кафетерия) [10–12]. Показано, что животные жиры (лярд или говяжий жир) в этом случае оказываются более эффективными для моделирования МС по сравнению с растительными жирами [11], тогда как в качестве добавляемых в рацион углеводов можно использовать глюкозу [12], фруктозу [13, 14] или сахарозу [15]. Такая диета наиболее приближена к питанию современного человека и считается максимально адекватной для моделирования метаболического синдрома и воспроизведения патогенетических факторов и феноменологии метаболических нарушений при МС.

В связи с этим целью исследования явилась разработка экспериментальной модели МС у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модель МС воспроизведена на самцах крыс линии Вистар (20 животных массой 200–250 г, возраст 6 нед). Исследование выполнено с соблюдением

принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Животные содержались в стандартных условиях вивария с 12-часовой продолжительностью светового дня и свободным доступом к пище и воде. Случайным образом крысы были распределены на контрольную и экспериментальную группы (по 8 и 12 животных соответственно). Крысы контрольной группы содержали на стандартной диете (корм «Дельта Фидс», Биопроект, Россия, общая калорийность 3 000 ккал/кг). Крысы экспериментальной группы в течение 12 нед получали рацион, содержащий стандартный корм (66%) с добавлением животного жира (лярд, 17%), фруктозы (17%), а питьевая вода была заменена на 20%-й раствор фруктозы (общая калорийность 4 400 ккал/кг, 54% энергии за счет жиров).

Перед началом и в конце исследования у животных измеряли массу тела и АД (система неинвазивного измерения АД «Систола», Нейроботикс, Россия). На последней неделе эксперимента проводили глюкозотолерантный (ГТТ) и инсулинотолерантный (ИТТ) тесты [11, 16]. С этой целью животным натощак (лишение корма на 12 ч) внутрижелудочно вводили раствор глюкозы в дозе 2 г/кг (D-глюкоза, Sigma-Aldrich, США) или подкожно делали инъекцию инсулина короткого действия в дозе 0,75 МЕ/кг («НовоРапид Пенфил», Дания). В полученной из хвостовой вены крыс крови спектрофотометрически ферментативным методом с помощью набора реагентов «Глюкоза-Ново В-8054» (Вектор-Бест, Россия) определяли концентрацию глюкозы через 0, 15, 30, 60, 90 и 120 мин. Константу скорости утилизации глюкозы по данным ИТТ ($K_{ИТТ}$, % глюкозы/мин) рассчитывали по формуле $K_{ИТТ} = (0,693/t_{1/2}) \times 100$, где $t_{1/2}$ – время снижения концентрации глюкозы в плазме крови в 2 раза после введения инсулина [17]. Плазму крови получали путем центрифугирования цельной крови (4 °C, 8 000 g, 6 мин) и хранили при –20 °C для последующего анализа. Содержание ТАГ, общего холестерина (ХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) в плазме крови животных определяли на биохимическом анализаторе (RX Imola, Randox, Япония).

Животных выводили из эксперимента CO_2 -асфиксией. Методом диссекции получали и взвешивали на аналитических весах висцеральную жировую ткань и печень, рассчитывали их удельную массу. Концентрацию ТАГ и ХС в печени (в мг/г ткани) определяли после экстракции из навесок печени (50 мг) липидной фракции смесью хлороформ – метанол (2 : 1) по методу J. Folch и соавт. [18]. Содержание ТАГ и ХС в экстрагированных липидах определяли ферментативными методами с помощью наборов

(Chronolab, Испания). Перед проведением анализа к хлороформной фазе добавляли 20%-й раствор детергента Thesit (Sigma-Aldrich, США) в хлороформе. Хлороформ удаляли потоком азота, эмульгированные липиды растворяли в дистиллированной воде. К полученной водной эмульсии добавляли рабочие реагенты из соответствующих наборов для определения ТАГ и ХС. Рассчитывали атерогенный индекс плазмы (Atherogenic Index of Plasma, AIP) [19].

Статистический анализ данных выполняли в программе IBM SPSS Statistics 23. Определяли соответствие полученных количественных показателей нормальному закону распределения с помощью *W*-критерия Шапиро – Уилка. Поскольку данные подчинялись нормальному закону распределения, результаты представлены как среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$), анализ различий между выборками выполняли при помощи *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные модели МС направлены на воспроизведение большинства характерных признаков синдрома у человека, таких как избыточный вес, висцеральное ожирение, резистентность к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, дислипидемия, артериальная гипертензия [8, 9].

Содержание животных на высокожировой и высокоуглеводной диете в течение 12 нед приводило к повышению систолического и диастолического артериального давления, увеличению удельной массы жировой ткани и печени (табл. 1).

Таблица 1

Влияние высокожировой и высокоуглеводной диеты на физиологические параметры крыс контрольной и экспериментальной группы, $M \pm SD$

Параметр	Группа	
	Контроль, $n = 8$	Метаболический синдром, $n = 12$
Масса тела, г	$425,8 \pm 25,6$	$463,1 \pm 22,4$ ($p = 0,101$)
САД, мм рт. ст.	$124,1 \pm 9,2$	$136,2 \pm 8,3$ ($p = 0,007$)
ДАД, мм рт. ст.	$87,4 \pm 10,2$	$100,3 \pm 13,6$ ($p = 0,036$)
Удельная масса жировой ткани, г	$2,4 \pm 0,3$	$4,9 \pm 1,3$ ($p = 0,001$)
Удельная масса печени, г	$2,7 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,3$ ($p = 0,002$)
Потребление пищи, г/день/группа	$130,2 \pm 8,4$	$101,7 \pm 9,8$ ($p = 0,005$)
Потребление жидкости, мл/день/группа	$249,5 \pm 11,9$	$347,5 \pm 12,6$ ($p = 0,011$)

Примечание. САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, p – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем (здесь и в табл. 2).

Одной из типичных особенностей МС является центральное ожирение. Однако манипуляции с диетой у животных не всегда приводят к достоверному увеличению массы тела, и в этом отношении данные литературы разнятся [11, 12, 20]. В нашем эксперименте кормление животных специальной диетой не вызывало увеличения масса тела крыс опытной группы. Возможным объяснением полученных результатов является тот факт, что животные потребляли меньше пищи, обогащенной жиром и фруктозой, вероятно, из-за ее более высокой калорийности.

В то же время у экспериментальных крыс более чем в 2 раза увеличилась удельная масса абдоминального жира, включающего мезентериальную, эпидидимальную и забрюшинную жировую клетчатку, что также является важным симптомом МС. Полученные данные свидетельствуют о возникновении ожирения у крыс опытной группы (см. табл. 1) и согласуются с данными других диет-индуцированных моделей МС [12, 14, 21].

У животных, содержащихся на высокожировой и высокоуглеводной диете, через 12 нед развивалась гипергликемия, о чем свидетельствует повышенный уровень глюкозы в плазме крови натощак (табл. 2). По данным ГТТ, через 30 мин после глюкозной нагрузки у крыс опытной группы уровень глюкозы в крови превышал уровень в контрольной группе на 25,2% ($p = 0,005$). Через 60 мин уровень глюкозы в крови крыс контрольной и экспериментальной групп начинал постепенно снижаться, оставаясь высоким в группе крыс с МС: разница составила 32,4% ($p = 0,003$). Через 2 ч уровень глюкозы в контрольной группе практически вернулся к исходному, тогда как в экспериментальной группе он оставался повышенным на 10% ($p = 0,093$), рис. 1, *a*. Площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» (AUC_{0-120}) в экспериментальной группе составила $809,9 \pm 81,9$ ммоль/л $\times$ 120 мин, что превышало значение в контрольной группе ($585,5 \pm 53,1$ ммоль/л $\times$ 120 мин, $p = 0,001$), рис. 1, *b*.

Известно, что ИТТ позволяет выявить нарушение реакции клеток-мишеней на инсулин, которое может быть вызвано снижением чувствительности или числа рецепторов инсулина [5, 22]. После подкожного введения инсулина наблюдалось постепенное снижение концентрации глюкозы в крови животных контрольной и опытной групп. Однако ее уровень оставался высоким у крыс экспериментальной группы через 30 мин после инъекции инсулина, разница составила 30,1% ($p = 0,002$), через 60 мин – 32,5% ($p = 0,001$), через 2 ч – 25,7% ($p = 0,011$), рис. 2, *a*. Площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» (AUC_{0-120}) в экспериментальной группе составила

440,9 ± 57,4 ммоль/л × 120 мин и превышала таковую в контрольной группе (307,1 ± 31,1 ммоль/л × 120 мин, $p = 0,004$). Развитие инсулинорезистентности у животных с МС подтверждается данными по изучению $K_{итг}$.

Установлено, что КИТТ у крыс, получавших высокожировую и высокоуглеводную диету, составила

1,3 ± 0,7% глюкозы/мин, что на 36,5% ниже этого показателя у животных контрольной группы (2,1 ± 0,7% глюкозы/мин, $p = 0,001$), рис. 2, б. Таким образом, выявленные гипергликемия, нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентность свидетельствуют о развитии у животных МС.

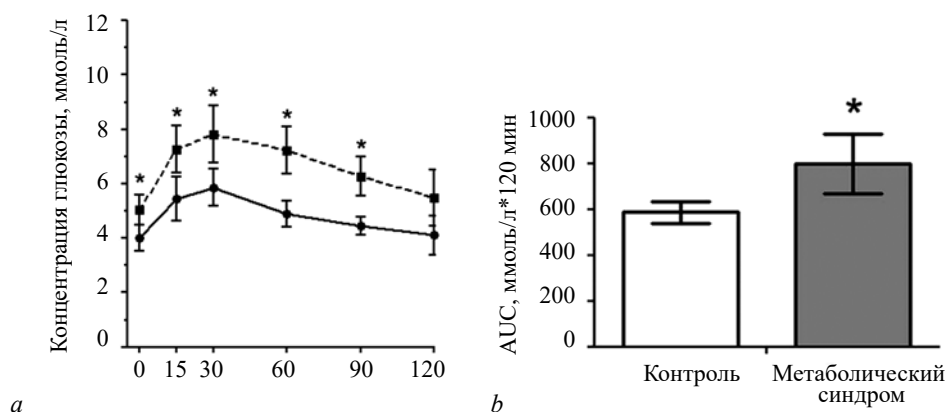


Рис. 1. Динамика концентрации глюкозы в крови крыс (а) и площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» (б) в глюкозотолерантном тесте. Здесь и на рис. 2: сплошная линия – контрольная группа, пунктирная линия – экспериментальная группа. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

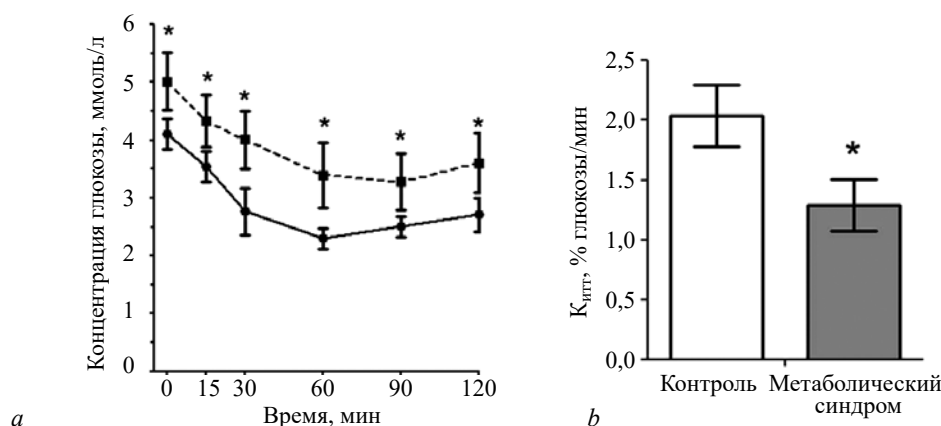


Рис. 2. Динамика инсулин-стимулированного снижения концентрации глюкозы в крови крыс (а) и константа скорости утилизации глюкозы (б) в инсулинотолерантном тесте

Таблица 2

Влияние высокожировой и высокоуглеводной диеты на биохимические показатели крыс контрольной и экспериментальной группы, ммоль/л, $M \pm SD$					
Группа	Глюкоза натощак	ТАГ	Общий ХС	ХС-ЛПВП	ХС-ЛПНП
Контроль, $n = 8$	4,0 ± 0,5	1,8 ± 0,8	2,4 ± 0,5	0,9 ± 0,3	1,3 ± 0,3
Метаболический синдром, $n = 12$	5,3 ± 0,6 $p = 0,021$	3,7 ± 0,9 $p = 0,001$	2,8 ± 0,7 $p = 0,062$	0,8 ± 0,1 $p = 0,201$	1,9 ± 0,5 $p = 0,044$

Дислипидемия при МС характеризуется как количественными, так и качественными изменениями в составе липопротеинов крови. Наиболее характерным проявлением дислипидемии являются: повышение уровня ТАГ в липопротеинах очень низкой плотности (ХС-ЛПОНП), которые являются основными транспортерами синтезированного в печени эндогенного жира. При этом увеличивается уровень

ХС в липопротеинах низкой плотности (ХС-ЛПНП), а также снижается в ЛПВП (ХС-ЛПВП) [4].

В нашем исследовании у крыс экспериментальной группы наблюдалось увеличение ТАГ плазмы крови в 2,1 раза по сравнению с контролем. Подобное увеличение содержания ТАГ в плазме крови может быть обусловлено тем, что чрезмерное употребление фруктозы в составе диеты, приводит

к активации липогенеза в печени [13, 23]. Уровень общего ХС у животных на фоне кормления диетой с высоким содержанием жиров и углеводов статистически значимо не увеличивался. В то же время у крыс опытной группы повышалось содержание атерогенного ХС-ЛПНП, при этом уровень ХС-ЛПВП не изменялся (табл. 2).

Данные по изменению уровней ХС и ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП в крови в моделях диет-индуцированного МС у крыс значительно различаются. В некоторых работах отмечается повышение содержания общего ХС в плазме крови, например в диетах, богатых фруктозой или жирами и фруктозой [10, 24], или отсутствие изменения его уровня [12]. Сведения относительно ХС-ЛПВП также варьируют, с преобладанием данных об их уменьшении [15]. Рассчитанный АПР у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров и углеводов, увеличивался в 3 раза ($0,2 \pm 0,1$ в контрольной против $0,6 \pm 0,2$ в опытной группе, $p = 0,001$). Данный показатель используется в клинической медицине при оценке сердечно-сосудистого риска у пациентов и рассматривается в качестве потенциального биомаркера при ранней диагностике сердечно-сосудистых заболеваний [25].

Известно, что кормление животных высокожировой [14] или высокожировой и высокоуглеводной [21, 26] диетой приводит к метаболическим изменениям в печени по типу неалкогольного стеатогепатоза. В нашем эксперименте наблюдалось увеличение удельной массы печени у животных с МС, а также повышение уровня в печени ТАГ в 1,8 раза ($4,3 \pm 1,5$ мг/г в контрольной против $7,8 \pm 3,4$ мг/г в опытной, $p = 0,005$) и ХС в 2,4 раза ($1,1 \pm 0,4$ мг/г в контрольной против $2,6 \pm 0,6$ мг/г в опытной, $p = 0,020$). Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что высокожировая и высокоуглеводная диета может способствовать развитию жировой дистрофии печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании установлено, что использование предложенной высокожировой и высокоуглеводной диеты у крыс воспроизводит большинство типичных особенностей МС: ожирение, повышение АД, гипергликемию, снижение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность, дислипидемию с преобладанием триглицеридемии. Использованная диета максимально приближена к высококалорийному питанию современного человека. Данная модель диет-индуцированного МС может быть полезна в изучении причин развития и прогрессирования метаболических и гемодинамических нарушений при МС, а также в исследовании потенциальных подходов к его профилактике и лечению.

ЛИТЕРАТУРА

- Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* 2006; 23 (5): 469–480. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x.
- Saklayen M.G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018; 20 (2): 12. DOI: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Aydin S., Aksoy A., Aydin S., Kalayci M., Yilmaz M., Kuloglu T., Citil C., Catak Z. Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition.* 2014; 30 (1): 1–9. DOI: 10.1016/j.nut.2013.05.013.
- Potenza M.V., Mechanick J.I. The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr. Clin. Pract.* 2009; 24 (5): 560–577. DOI: 10.1177/0884533609342436.
- Fowler M.J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes.* 2008; 26 (2): 77–82. DOI: 10.2337/diaclin.26.2.77.
- Ройтберг Г.Е. Метаболический синдром. М.: МЕД-М54 пресс-информ, 2007: 224.
- Кравчук Е.Н., Галагудза М.М. Экспериментальные модели метаболического синдрома. *Артериальная гипертензия.* 2014; 20 (5): 377–383. DOI: 10.18705/1607-419X-2014-20-5-377-383.
- Байрашева В.К., Пчелин И.Ю., Егорова А.Э., Василькова О.Н., Корнюшин О.В. Экспериментальные модели алиментарного ожирения у крыс. *Juvenis Scientia.* 2019; 9–10: 8–13. DOI: 10.32415/jscientia.2019.09-10.02.
- Kwitek A.E. Rat models of metabolic syndrome. *Methods Mol. Biol.* 2019; 2018: 269–285. DOI: 10.1007/978-1-4939-9581-3_13.
- Panchal S.K., Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 351982. DOI: 10.1155/2011/351982.
- Gancheva S., Zhelyazkova-Savova M., Galunska B., Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scientifica Medica.* 2015; 47 (2): 23–30. DOI: 10.14748/ssm.v47i2.1145.
- Moreno-Fernández S., Garcés-Rimón M., Vera G., Astier J., Landrier J.F., Miguel M. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients.* 2018; 10 (10): 1502. DOI: 10.3390/nu10101502.
- Lim J.S., Mietus-Snyder M., Valente A., Schwarz J.M., Lustig R.H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 7: 251–264. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.41.
- Panchal S.K., Poudyal H., Iyer A., Nazer R., Alam A., Diwan V., Kauter K., Sernia C., Campbell F., Ward L., Gobe G., Fenning A., Brown L. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011; 57 (5): 611–624. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31821b1379.
- Sadowska J., Brzuskowska M. Comparing the effects of sucrose and high-fructose corn syrup on lipid metabolism and the risk of cardiovascular disease in male rats. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2017; 16 (2): 231–240. DOI: 10.17306/J.AFS.0482.
- Dupas J., Feray A., Goanvec C., Guernec A., Samson N., Bougaran P., Guerrero F., Mansourati J. Metabolic syndrome and hypertension resulting from fructose enriched diet in

- Wistar rats. *Biomed. Res. Int.* 2017; 2017: 2494067. DOI: 10.1155/2017/2494067.
17. Patarrao R.S., Lauth W.W., Macedo M.P. Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity. *Rev. Port. Endocrinol. Diabetes Metab.* 2014; 9 (1): 65–73. DOI: 10.1016/j.rpedm.2013.10.004.
18. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226 (1): 497–509.
19. Dobiášová M., Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin. Biochem.* 2001; 34 (7): 583–588. DOI: 10.1016/S0009-9120(01)00263-6.
20. Nagai Y., Yonemitsu S., Erion D.M., Iwasaki T., Stark R., Weismann D., Dong J., Zhang D., Jurczak M.J., Löffler M.G., Cresswell J., Yu X.X., Murray S., Bhanot S., Monia B.P., Bogan J.S., Samuel V., Shulman G.I. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2009; 9 (3): 252–264. DOI: 10.1016/j.cmet.2009.01.011.
21. Dos Santos Lacerda D., Garbin de Almeida M., Teixeira C., De Jesus A., Da Silva Pereira J.E., Martins Bock P., Pegas Henriques J.A., Gomez R., Dani C., Funchal C. Biochemical and physiological parameters in rats fed with high-fat diet: the protective effect of chronic treatment with purple grape juice (Bordo Variety). *Beverages.* 2018; 4 (4): 100. DOI: 10.3390/beverages4040100.
22. Ткачук В.А., Воротников А.В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. *Сахарный диабет.* 2014; 2: 29–40. DOI: 10.14341/DM2014229-40.
23. Schaefer E.J., Gleason J.A., Dansinger M.L. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J. Nutr.* 2009; 139 (6): 1257–1262. DOI: 10.3945/jn.108.098186.
24. Alam M.A., Kauter K., Brown L. Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. *Nutrients.* 2013; 5 (3): 637–650. DOI: 10.3390/nu5030637.
25. Fernández-Macias J.C., Ochoa-Martínez A.C., Varela-Silva J.A., Pérez-Maldonado I.N. Atherogenic index of plasma: novel predictive biomarker for cardiovascular illnesses. *Arch. Med. Res.* 2019; 50 (5): 285–294. DOI: 10.1016/j.arcmed.2019.08.009.
26. Basaranoglu M., Basaranoglu G., Sabuncu T., Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2013; 19 (8): 1166–1172. DOI: 10.3748/wjg.v19.i8.1166.

Вклад авторов

Бирулина Ю.Г., Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна, написание рукописи. Смаглий Л.В., Васильев В.Н., Попов О.С. – анализ и интерпретация данных. Носарев А.В., Петрова И.В., Гусакова С.В. – обоснование рукописи, утверждение рукописи для публикации. Буйко В.В., Быков В.В. – выполнение экспериментальной части исследования.

Сведения об авторах

Бирулина Юлия Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-1237-9786.

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9348-4945.

Буйко Евгений Евгеньевич, лаборант, Центр доклинических исследований ЦНИЛ, СибГМУ; аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6714-1938.

Быков Владимир Валерьевич, аспирант, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ; начальник отдела фармакологических исследований, ООО «Инновационные фармакологические разработки», г. Томск. ORCID 0000-0002-5145-2184.

Смаглий Людмила Вячеславовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-5263-027X.

Носарев Алексей Валерьевич, д-р мед. наук, профессор, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0119-9707.

Петрова Ирина Викторовна, д-р биол. наук, профессор, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9034-4226.

Гусакова Светлана Валерьевна, д-р мед. наук, зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5047-8668.

Попов Олег Сергеевич, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры общей хирургии, СибГМУ, г. Томск.

Васильев Владимир Николаевич, д-р биол. наук, профессор, кафедра физической культуры и здоровья, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Бирулина Юлия Георгиевна, e-mail: birulina20@yandex.ru.

Поступила в редакцию 03.03.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Селекция пары «донор – реципиент» с учетом эпитопных несоответствий при трансплантации почки

Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Степанов В.А.

Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского)
Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, к. 6

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить потенциал селекции пары «донор – реципиент» с учетом количества эпитопных несовпадений.

Материалы и методы. Проведено обсервационное ретроспективное когортное исследование, в которое включено 824 совершеннолетних реципиента трупной почки, совместимых по группе крови. Конечной точкой считали утрату трансплантата. В случае смерти реципиента с функционирующим трансплантатом наблюдение подвергали цензурированию. Подсчет количества эпитопных несовпадений (ЕрММ) проводили с использованием информации из общедоступных ресурсов о популяционной частоте гаплотипов и репертуаре эпитопов с подтвержденной иммуногенностью. Составлялись все возможные сочетания генотипов донора и реципиента, подчитывали вероятность каждого сочетания. Затем для каждого сочетания с ненулевой вероятностью определяли количество эпитопов донора, отсутствующих у реципиента. После этого вычисляли взвешенное среднее ЕрММ, где весовым коэффициентом была нормированная вероятность появления каждого сочетания.

Результаты. Все пары «донор – реципиент» имели HLA несовместимости (HLA ММ): 1,9% – 1 HLA ММ, 6,7% – 2 HLA ММ, 29,9% – 3 HLA ММ, 38,5% – 4 HLA ММ, 18,1% – 5 HLA ММ, 4,9% – 6 HLA ММ. Различия в HLA ММ влияли на выживаемость трансплантатов: log-rank test $p < 0,0001$, Breslow test $p < 0,0001$. Медиана (Me) и интерквартильный размах [Q_1 ; Q_3] ЕрММ составили 6 [4; 7], 12 [7,74; 17,25], 18 [14; 22], 24 [20; 30], 30,5 [25; 37] и 36 [26,5; 44,5] для 1, 2, 3, 4, 5 и 6 HLA ММ соответственно. Увеличение HLA ММ было связано с ростом риска появления донор-специфических анти-HLA антител (ДСА). Отношение рисков (HR) = 1,21 [95%-й доверительный интервал (95%-й ДИ) 0,7; 1,9], 1,71 [95%-й ДИ 1,22; 2,36], 2,04 [95%-й ДИ 1,42; 2,73], 2,25 [95%-й ДИ 1,63; 2,96], 2,59 [95%-й ДИ 2,03; 3,29] при 2, 3, 4, 5 и 6 HLA ММ соответственно по отношению к HLA ММ = 1. Увеличение ЕрММ также было связано с ростом риска появления ДСА. HR = 1,66 [95%-й ДИ 1,09; 2,47], 2,1 [95%-й ДИ 1,46; 2,91], 2,41 [95%-й ДИ 1,86; 3,03], 2,61 [95%-й ДИ 2,12; 3,12], 2,77 [95%-й ДИ 2,26; 3,33] при 10–19, 20–29, 30–39, 40–49 и >50 ЕрММ соответственно по отношению к ЕрММ < 10. Увеличение HLA ММ было связано с ростом риска утраты трансплантата. HR = 1,24 [95%-й ДИ 0,7; 2,15], 1,48 [95%-й ДИ 0,86; 2,33], 1,88 [95%-й ДИ 1,32; 2,52], 2,41 [95%-й ДИ 2; 2,93], 2,98 [95%-й ДИ 2,59; 3,46] при 2, 3, 4, 5 и 6 HLA ММ соответственно по отношению к HLA ММ = 1. Для демонстрации эффективности учета ЕрММ мы проанализировали выживаемость трансплантатов у пациентов с HLA ММ = 4. Выживаемость при 10–24 и 25–43 ЕрММ различалась статистически значимо, но только на поздних этапах посттрансплантационного периода: log-rank test $p = 0,0067$, Breslow test $p = 0,0982$. Медиана выживаемости для ЕрММ 10–24 составила 10,33 [95%-й ДИ 9,05; 11,61] лет, для ЕрММ 22–43 – 8,67 [95%-й ДИ 7,68; 9,66] лет, HR = 1,537 [95%-й ДИ 1,114; 2,12]. При этом главным образом увеличивалась не медиана выживаемости, а доля больных с функционирующим трансплантатом: при 10–24 ЕрММ через 15 лет 18,28% [95%-й ДИ 8,2; 31,67] трансплантатов функционировало, тогда как при 25–43 ЕрММ – только 4,75% [95%-й ДИ 0,94; 13,64].

Заключение. В рутинной практике трансплантационного центра с небольшим, обособленным листом ожидания учет эпитопных несоответствий может улучшить результаты трансплантации почки: снизить риск появления донор-специфических анти-HLA антител и повысить выживаемость трансплантатов. Применение этого метода позволяет дополнительно ранжировать кандидатов на трансплантацию в зависимости от количества эпитопных несовпадений в рамках фиксированного количества HLA несовпадений и выбрать

оптимального. Вместе с тем существует теоретическая возможность использования этого метода в качестве альтернативы традиционной оценке тканевой совместимости донора и реципиента. Необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: трансплантация почки, HLA, эпитоп, эплет, тканевая совместимость, выбор реципиента, донор-специфичные антитела, анти-HLA антитела.

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

Источник финансирования. Работы были выполнены с использованием средств гранта президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (№ МД-2253.2018.7). Данный источник финансирования не участвовал в определении структуры исследования, сборе, анализе и интерпретации данных, а также принятии решения опубликовать полученные результаты.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 9 от 12.10.2017).

Для цитирования: Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Степанов В.А. Селекция пары «донор – реципиент» с учетом эпитопных несоответствий при трансплантации почки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 21–29. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-21-29>.

Donor – recipient selection using epitope mismatches in kidney transplantation

Vatazin A.V., Zulkarnaev A.B., Stepanov V.A.

Moscow Regional Research and Clinical Institute

Build. 6, 61/2, Schepkina Str., 129110, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose. To evaluate the potential option of selecting donor–recipient pairs by using the number of epitope mismatches.

Materials and methods. An observational cohort study was carried out, which included 824 adult recipients of ABO compatible deceased donor kidneys. The end point was a transplant loss. If a recipient with a functioning graft died, the observation was censored. The number of epitope mismatches (EpMM) was calculated using open source information on the population frequency of haplotypes and the repertoire of epitopes with confirmed immunogenicity. All possible combinations of the donor and recipient genotypes were compiled, and the probability of each combination was calculated. After that, the number of donor epitopes absent in the recipient was calculated for each combination with a non-zero probability, whereupon the weighted mean EpMM was calculated, where the weight coefficient was the normalized probability of occurrence of each combination.

Results. All of the donor – recipient pairs had HLA-mismatches (HLA MM): 1.9% of recipients had 1 HLA MM, 6.7% had 2 HLA MM, 29.9% had 3 HLA MM, 38.5% had 4 HLA MM, 18.1% had 5 HLA MM, and 4.9% had 6 HLA MM. The HLA MM impacted graft survival was determined: log-rank test $p < 0.0001$, Breslow test $p < 0.0001$. The median values and the interquartile ranges of EpMM were 6 [4; 7], 12 [7.74; 17.25], 18 [14; 22], 24 [20; 30], 30.5 [25; 37] and 36 [26.5; 44.5] for the cases of 1, 2, 3, 4, 5 and 6 HLA MMs, respectively. An increase in HLA MM resulted in a higher risk of developing donor-specific anti-HLA antibodies (DSA). Hazard ratio (HR) = 1.21 [95% confidence interval (CI): 0.7; 1.9], 1.71 [95% CI: 1.22; 2.36], 2.04 [95% CI: 1.42; 2.73], 2.25 [95% CI: 1.63; 2.96], 2.59 [95% CI: 2.03; 3.29] for 2, 3, 4, 5, and 6 HLA MM, respectively, versus HLA MM = 1. An increase in EpMM also resulted in a higher risk of developing DSA. HR = 1.66 [95% CI: 1.09; 2.47], 2.1 [95% CI: 1.46; 2.91], 2.41 [95% CI: 1.86; 3.03], 2.61 [95% CI: 2.12; 3.12], 2.77 [95% CI: 2.26; 3.33] for 10–19, 20–29, 30–39, 40–49 and > 50 EpMM, respectively, versus EpMM < 10 . An increase in HLA MM was associated with an increased risk of transplant loss. HR = 1.24 [95% CI 0.7; 2.15], 1.48 [95% CI 0.86; 2.33], 1.88 [95% CI 1.32; 2.52], 2.41 [95% CI 2; 2.93], 2.98 [95% CI 2.59; 3.46] at 2, 3, 4, 5, and 6 HLA MM, respectively, versus HLA MM = 1. An increase in EpMM also was associated with an increased risk of transplant loss. HR = 1.71 [95% CI 1.1; 2.49], 2.11 [95% CI 1.59; 2.68], 2.4 [95% CI 1.96; 2.86], 2.59 [95% CI 2.17; 3.04], 2.71 [95% CI 2.31; 3.15] at 10–19, 20–29, 30–39, 40–49 and > 50 EpMM, respectively, versus EpMM < 10 . In order to demonstrate the effectiveness

of EpMM accounting, we analyzed graft survival among the patients with 4 HLA MM. With the number of EpMM in the range from 10 to 24 and from 25 to 43 the difference in survival rates was statistically significant, but only at the late stages of the post-transplant period: log-rank test $p = 0.0067$, Breslow test $p = 0.0982$. The median survival for EpMM 10–24 was 10.33 [95% CI 9.05; 11.61] years, for EpMM 22–43 – 8.67 [95% CI 7.68; 9.66] years, HR 1.537 [95% CI 1.114; 2.12]. At the same time, it was not the median of survival that increased, but the proportion of patients with a functioning graft: at 10–24 EpMM after 15 years, 18.28% [95% CI 8.2; 31.67] grafts functioned, while at 25–43 EpMM only 4.75% [95% CI 0.94; 13.64] functioned.

Conclusion. In the routine practice of a transplantation center with a short waiting list of its own, it might be possible to improve the kidney transplant survival as a result of considering epitope mismatches, thus reducing the risk of developing donor-specific anti-HLA antibodies and ensuring a higher graft survival rate. This method can be used for additional ranking of transplantation candidates depending on the number of epitope mismatches within the fixed number of HLA-mismatches and thus select the optimal one. Besides, it is theoretically possible to use this method as an alternative to the traditional donor/recipient histocompatibility evaluation. Additional research is required.

Key words: kidney transplantation, HLA, epitope, eplet, tissue compatibility, recipient selection, donor-specific antibodies, anti-HLA antibodies.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. The funds of the grant of the President of the Russian Federation for the state support of young Russian scientists (No. MD-2253.2018.7) were used for this study. This source of funding was not involved in determining the structure of the study, data collection, analysis and interpretation, as well as the decision to publish the results.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Moscow Regional Research and Clinical Institute (Protocol No. 9 of 12.10.2017).

For citation: Vatazin A.V., Zulkarnaev A.B., Stepanov V.A. Donor – recipient selection using epitope mismatches in kidney transplantation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 21–29. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-21-29>.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении всей истории клинической трансплантологии гистосовместимость донора и реципиента остается одним из главных факторов, определяющих выживаемость почечного аллотрансплантата (ПАТ). Известно, что чем меньше количество несовпадений по HLA (HLA-MM – HLA mismatch), тем лучше выживаемость ПАТ. Это было доказано и при трансплантации трупных почек [1], и при трансплантации почек, полученных от прижизненных доноров [2]. Несмотря на то, что с годами величина эффекта данного фактора постепенно снижалась, это актуально и для эры современной иммуносупрессивной терапии.

Каждый антиген HLA несет на себе уникальный репертуар эпитопов. При этом некоторые из них уникальны и свойственны только конкретному аллельному варианту молекулы (частные эпитопы), а некоторые являются общими для нескольких молекул HLA [3]. Факт наличия общих эпитопов определяет возможность использования этой информации при селекции пары «донор – реципиент».

Цель исследования – оценить потенциал селекции пары «донор – реципиент» с учетом количества эпитопных несовпадений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования и пациенты. Проведено наблюдательное ретроспективное когортное исследование, в которое включено 824 совершеннолетних реципиента. Всем пациентам была выполнена трансплантация трупной почки, совместимой по группе крови. Конечной точкой считали утрату трансплантата. В случае смерти реципиента с функционирующим трансплантатом наблюдение подвергалось цензурированию.

Во всех случаях было проведено HLA-типирование по локусам A, B и DR. До 2003 г. типирование выполнялось серологическим методом (уровень сплит-антигенов), позднее – HLA-генотипирование на низком разрешении методами SSO или SSP (уровень аллельных групп). Перекрестная проба, реализуемая в виде комплемент-зависимого лимфоцитотоксического теста, была отрицательна во всех случаях. Скрининг на анти-HLA антитела проводили при помощи мультиплексной технологии на платформе Luminex с реактивами LIFECODES Lifescreen Deluxe (Immucor, США), идентификация антител с наборами LIFECODES LSA. Данные пациентов представлены в таблице.

Т а б л и ц а

Характеристика пациентов	
Показатель	Значение
Пол реципиентов (М/Ж), %	58/42
Возраст реципиентов, лет, $Me [Q_1; Q_3]$	43 [27; 50]
Время на диализе до АТП, мес, $Me [Q_1; Q_3]$	34 [14; 42]
Повторная трансплантация, %	9
Предсуществующие антитела (PRA* $\geq 10\%$)	12,8
Возраст доноров, лет, $Me [Q_1; Q_3]$	38,1 [31,2; 51,8]
Донор со смертью головного мозга/«асистолический» донор, %	46/54
Время консервации, ч, $Me [Q_1; Q_3]$	8,4 [6; 14]
Период наблюдения, лет, $Me [Q_1; Q_3]$	8,1 [4,8; 10,4]

* panel-reactive antibody – панель-реактивные антитела.

Расчет количества эпитопных несовпадений на основе HLA-типирования на низком разрешении. Для подсчета количества эпитопных несовпадений (ЕрММ) на основе нефазированных генотипов донора и реципиента мы составляли все возможные варианты гаплотипов донора и реципиента, все возможные варианты их фазированных генотипов, а затем перекрестно – все возможные варианты их возможных сочетаний. Вероятность конкретного сочетания генотипов определяли путем каскадных вычислений, в основе которых лежали данные о популяционной частоте гаплотипов европеоидной популяции (european caucasian), полученные из общедоступных источников [4, 5]. Полученные оценки с ненулевой вероятностью нормировали на единицу. Для каждого сочетания генотипов определяли репертуар эпитопов с использованием общедоступной информации [6]. Затем подсчитывали сумму эпитопов донора, отсутствующих у реципиента для каж-

дого сочетания генотипов. После этого вычисляли взвешенное среднее, где весовым коэффициентом была нормированная вероятность появления каждого сочетания.

Статистический анализ. Нескорректированную выживаемость пациентов оценивали по методу Каплана – Мейера с построением кривых выживаемости и вычислением несимметричного 95%-го доверительного интервала (95%-й ДИ). Значимость различий оценивали при помощи критериев log-rank (отдаленный период) и Breslow (ближайший период). Получали скорректированную оценку выживаемости и проводили анализ факторов риска при помощи регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса. Соблюдение условия о пропорциональности рисков проверяли при помощи анализа остатков Шенфельда (Schoenfeld residuals). Проверку линейности связи предикторов и логарифма функции риска проводили при помощи анализа мартингальных остатков (martingale residuals). Графики этих остатков анализировали на предмет выбросов (outliers) совместно с анализом DFBETAs для идентификации влиятельных наблюдений. Проверку на коллинеарность предикторов проводили при помощи анализа корреляционной матрицы. Диагностика модели показала ее приемлемое качество. Статистическую обработку проводили в программах Stata v. 15 и GraphPad Prism v. 8. Оценивали двусторонний уровень значимости. Значения p -value менее 0,05 считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Реципиенты имели разную степень несовместимости с донорской почкой (рис. 1).

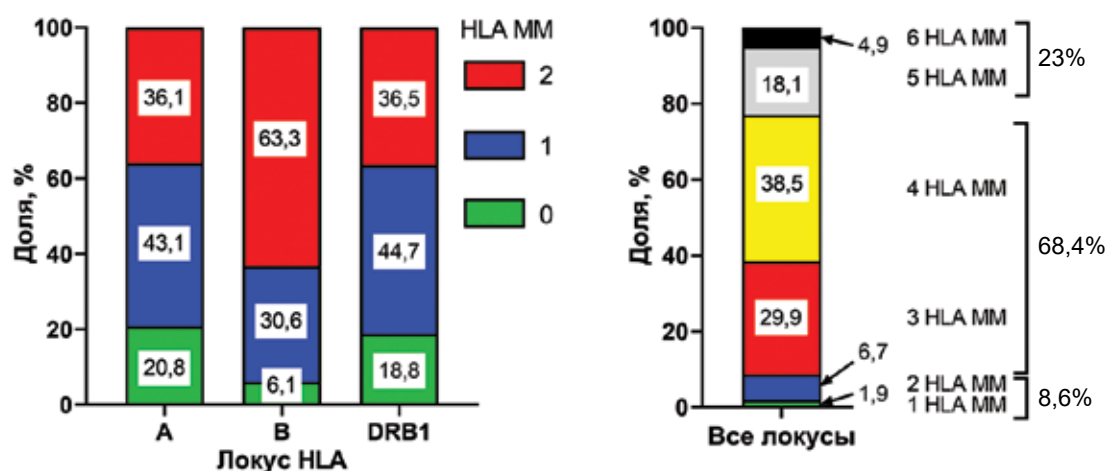


Рис. 1. Частота несовместимости по различным локусам HLA: HLA MM – количество антигенов донора, отсутствующих у реципиента (здесь и на рис. 3, 4)

При этом несовместимость по HLA остается важным параметром, определяющим долгосрочную выживаемость трансплантатов (рис. 2).

Различия в совместимости по А-локусу в целом значимо влияли на выживаемость трансплантатов: log-rank test $p = 0,0005$, Breslow test $p = 0,0049$.

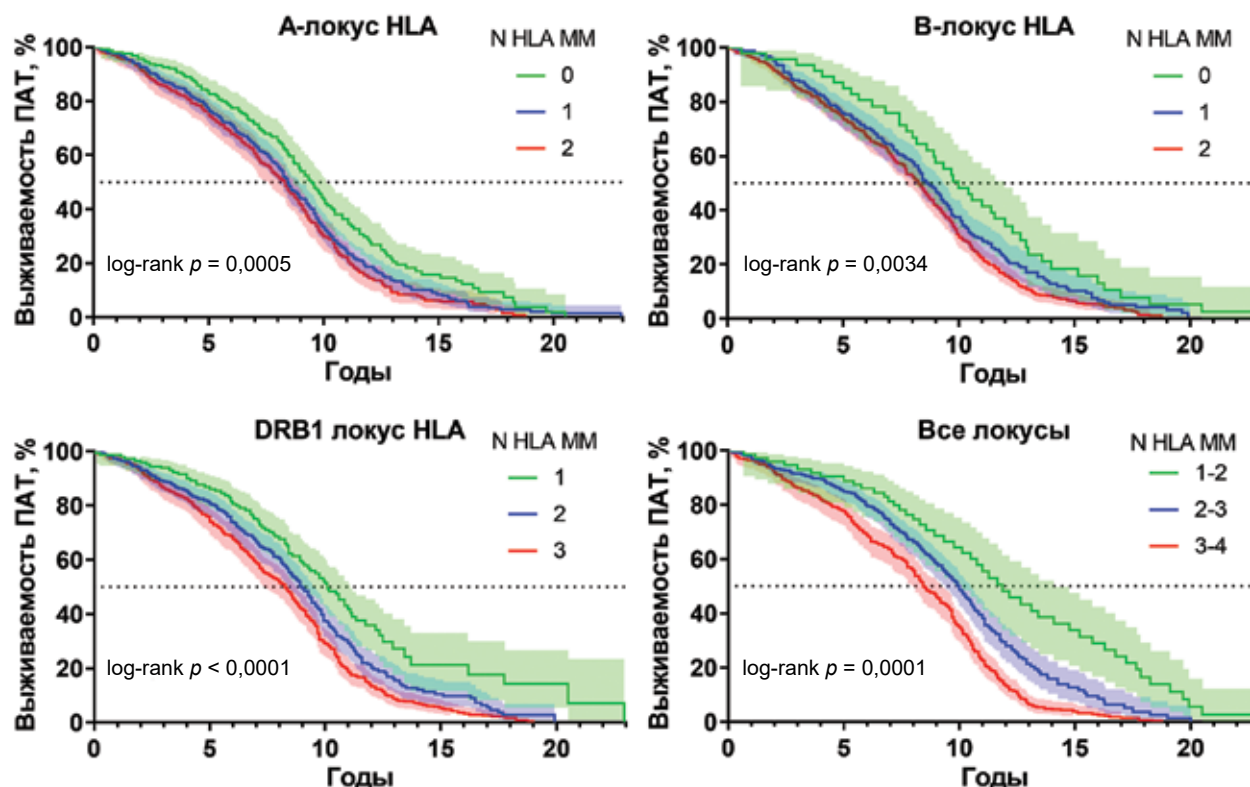


Рис. 2. Выживаемость трансплантатов: в случае смерти реципиента с функционирующим трансплантатом наблюдение подвергалось цензурированию; указаны оценки различий по критерию log-rank для трех кривых

Медиана выживаемости для HLA MM 0, 1 и 2 составила 9,5 [95%-й ДИ 8,77; 10,23], 8,42 [95%-й ДИ 8; 8,87] и 8,33 [95%-й ДИ 7,71; 8,96] лет соответственно. Попарные сравнения: 0–1 – log-rank $p = 0,0092$, Breslow test $p = 0,0107$, HR = 1,32 [95%-й ДИ 1,079; 1,615]; 1–2 – log-rank $p = 0,2157$, Breslow test $p = 0,3156$, HR = 1,114 [95%-й ДИ 0,936; 1,326]; 0–2 log-rank $p = 0,0003$, Breslow test $p = 0,0012$, HR = 1,485 [95%-й ДИ 1,204; 1,831].

Различия в совместимости по В-локусу в целом значимо влияли на выживаемость трансплантатов: log-rank test $p = 0,0034$, Breslow test $p = 0,0008$. Медиана выживаемости для HLA MM 0, 1 и 2 составила 9,99 [95%-й ДИ 8,38; 11,6], 8,67 [95%-й ДИ 8,1; 9,26] и 8,25 [95%-й ДИ 7,81; 8,69] лет соответственно. Попарные сравнения: 0–1 – log-rank $p = 0,0656$, Breslow test $p = 0,0632$, HR = 1,353 [95%-й ДИ 0,997; 1,836]; 1–2 – log-rank $p = 0,0424$, Breslow test $p = 0,1363$, HR = 1,19 [95%-й ДИ 1,009; 1,404]; 0–2 log-rank $p = 0,0031$, Breslow test $p = 0,0076$, HR = 1,582 [95%-й ДИ 1,213; 2,062].

Различия в совместимости по DRB1-локусу в целом значимо влияли на выживаемость трансплантатов: log-rank test $p < 0,0001$, Breslow test $p < 0,0001$. Медиана выживаемости для HLA MM 0, 1 и 2 составила 10,08 [95%-й ДИ 9,15; 11,02], 9 [95%-й ДИ 8,47; 9,53] и 8,25 [95%-й ДИ 7,58; 8,92] лет соответственно. Попарные сравнения: 0–1 – log-rank $p = 0,0021$, Breslow test $p = 0,0152$, HR = 1,472 [95%-й ДИ 1,166; 1,858]; 1–2 – log-rank $p = 0,0038$, Breslow test $p = 0,0146$, HR = 1,283 [95%-й ДИ 1,084; 1,52]; 0–2 log-rank $p < 0,0001$, Breslow test $p < 0,0001$, HR = 1,888 [95%-й ДИ 1,532; 2,237].

Различия в совместимости по всем локусам в целом значимо влияли на выживаемость трансплантатов: log-rank test $p < 0,0001$, Breslow test $p < 0,0001$. Медиана выживаемости для HLA MM 1–2, 3–4 и 5–6 составила 11,85 [95%-й ДИ 9,93; 13,78], 10 [95%-й ДИ 9,4; 10,6] и 8,42 [95%-й ДИ 7,82; 9,02] лет соответственно. Попарные сравнения: 1–2 и 3–4 – log-rank $p = 0,001$, Breslow test $p = 0,041$, HR = 1,617 [95%-й ДИ 1,233; 2,121]; 3–4 и 5–6 – log-rank

$p < 0,0001$, Breslow test $p < 0,0001$, HR = 1,531 [95%-й ДИ 1,286; 1,824]; 1–2 и 5–6 log-rank $p < 0,0001$, Breslow test $p < 0,0001$, HR = 2,365 [95%-й ДИ 1,863; 3,002].

Мы подсчитали среднее количество эпитопных несоответствий при каждом количестве несоответствий по HLA (рис. 3). Увеличение количества HLA несоответствий и эпитопных несоответствий зна-

чительно увеличивает риск появления антидонорских анти-HLA антител, а также утраты трансплантата (рис. 4). Для демонстрации возможности практического применения метода селекции пары «донор – реципиент» с учетом эпитопных несоответствий мы проанализировали выживаемость трансплантатов при четырех несоответствиях по HLA (самый распространенный вариант в нашем центре), рис. 5.

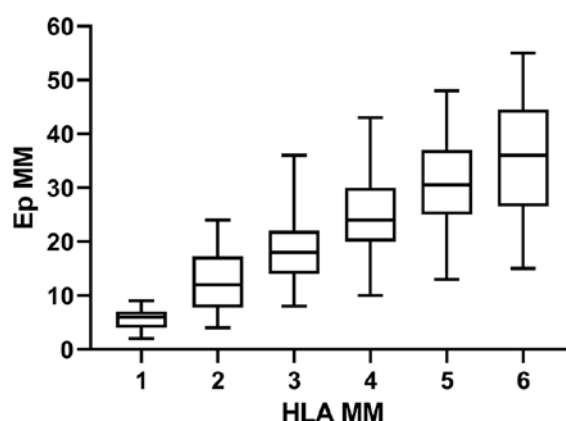


Рис. 3. Соответствие HLA MM и расчетного количества EpMM: EpMM – количество эпитопов донора, отсутствующих у реципиента (здесь и на рис. 4, 5), Me [Q_1 ; Q_3], Min–Max

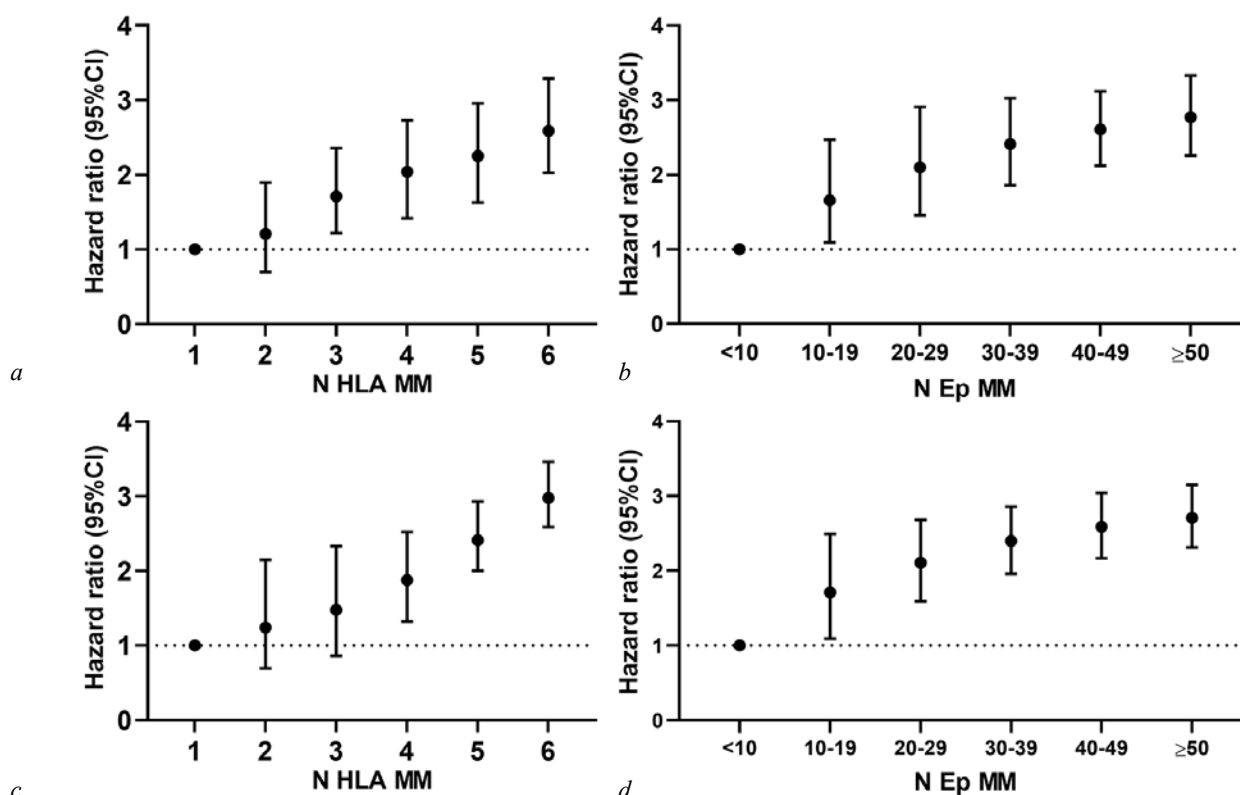


Рис. 4. Зависимость риска: появления донор-специфичных анти-HLA антител (ДКА) от HLA MM (a) и EpMM (b), утраты трансплантата от HLA MM (c) и EpMM (d)

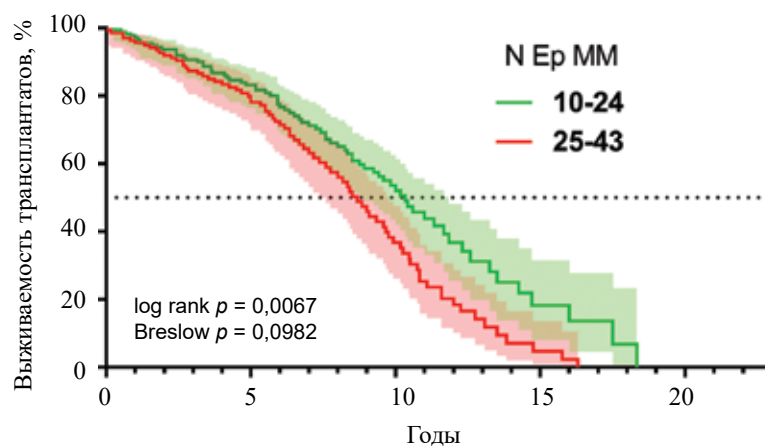


Рис. 5. Выживаемость трансплантатов у пациентов с четырьмя HLA-несовпадениями: в случае смерти реципиента с функционирующим трансплантатом наблюдение подвергалось цензурированию; *Me* EpMM при уровне HLA MM, равном 4, составила 24

Пациентов разделили на две группы: меньше или равно среднему количеству (медиане) EpMM и больше этого значения.

Выживаемость при 10–24 и 25–43 EpMM различалась статистически значимо, но только на поздних этапах посттрансплантационного периода: log-rank test $p = 0,0067$, Breslow test $p = 0,0982$. Медиана выживаемости для EpMM 10–24 составила 10,33 [95%-й ДИ 9,05; 11,61] лет, для EpMM 25–43 – 8,67 [95%-й ДИ 7,68; 9,66] лет, HR = 1,537 [95%-й ДИ 1,114; 2,12].

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время (по данным на август 2019 г.) современная номенклатура HLA включает 28 серологически идентифицируемых антигенов А-локуса, 62 антигена В-локуса, 24 антигена DRB1-локуса [7]. Если принять во внимание огромное количество потенциально возможных сочетаний, становится очевидно, что для выбора оптимального реципиента лист ожидания должен включать тысячи или десятки тысяч кандидатов на трансплантацию. Формирование общего листа ожидания реализовано в Европе (Eurotransplant) и США (United Network for Organ Sharing). В России каждый трансплантологический центр имеет собственный обособленный лист ожидания, что в значительной степени препятствует подбору оптимального (с точки зрения тканевой совместимости) реципиента. Большая доля реципиентов (по данным нашего центра – 68,4%) получает трансплантат, несущий 3–4 несовпадающих антигена, а ожидание лучшего «совпадения» может значительно увеличивать срок ожидания. Как мы показали ранее [8], длительное ожидание трансплантации на диализе сопровождается ухудшением

коморбидного фона, что в свою очередь снижает вероятность трансплантации и увеличивает риск смерти. Однако вопрос об относительной значимости таких факторов, как коморбидный фон и тканевая совместимость на различных сроках ожидания, не решен. Вместе с тем актуальность гистосовместимости остается высокой. Мы показали, что чем меньше количество HLA несовместимостей, тем лучше выживаемость трансплантатов и зависимость эта статистически значима.

Тем не менее примечательно, что даже с учетом общего количества несовпадений по трем локусам медиана выживаемости увеличивается, но в небольших пределах (11,85 [95%-й ДИ 9,93; 13,78] лет при 1–2 несовпадениях и 8,42 [95%-й ДИ 7,82; 9,02] лет при 5–6 несовпадениях). Клиническая интерпретация этого факта неоднозначна. С одной стороны, это может свидетельствовать об эффективности иммуносупрессивной терапии, что приводит к уменьшению значимости тканей совместимости. С другой – о ее недостаточной эффективности на поздних сроках посттрансплантационного периода. Хорошая тканевая совместимость сопровождается скорее не увеличением среднего срока функционирования трансплантата, а значительным увеличением доли больных с функционирующим трансплантатом в позднем периоде. Так, через 15 лет у 33,8% [95%-й ДИ 20,6; 47,41] пациентов с 1–2 HLA трансплантат функционировал. При 3–4 несовпадениях трансплантат функционировал у 12,8% [95%-й ДИ 7,76; 19,2] пациентов, а при 5–6 несовпадениях – только у 3,6% [95%-й ДИ 1,84; 6,21].

Большая часть реципиентов получает трансплантаты, имеющие четыре HLA несовместимости (с учетом только А, В и DRB1 локусов). При этом

каждый из них рассматривается как абсолютно эквивалентный кандидат на трансплантацию с точки зрения тканевой совместимости. Возможность дополнительно ранжировать кандидатов в рамках фиксированного значения HLA несоответствий с учетом ЕрММ представляется нам перспективной. Одним из основных вопросов остается целесообразность применения такого подхода к селекции пары «донор – реципиент».

Одной из основных причин утраты трансплантата в позднем периоде является гуморальное отторжение: на его долю приходится примерно 50% [9]. При этом известно, что увеличение количества HLA несоответствий сопряжено с увеличением риска появления *de novo* ДСА [10]. Мы также получили убедительные свидетельства в пользу этого факта (рис. 4, а). И увеличение HLA ММ, и увеличение ЕрММ значимо повышало риск появления *de novo* ДСА. При этом интенсивность увеличения риска несколько различалась: увеличение риска по мере увеличения HLA ММ линейно ($r^2 = 0,9873$). В то же время связь риска и ЕрММ достаточно хорошо описывается логарифмической аппроксимацией ($r^2 = 0,9991$).

Иными словами, увеличение количества HLA ММ равномерно увеличивает «антигенную нагрузку» и риск появления антител, тогда как связь этого риска Ер ММ, по-видимому, более сложна. Мы не отметили значимого увеличения риска при двух HLA ММ по сравнению с одним HLA ММ. В связи с этим стремление к учету эпитопных несоответствий в рамках фиксированного значения HLA ММ (дополнение к традиционному подходу к селекции пары «донор – реципиент») представляется нам перспективным способом снижения «антигенной нагрузки». Увеличение ЕрММ с >10 до 10–19 значительно увеличивает риск появления ДСА. Это важный аспект в контексте нашего исследования, поскольку, как следует из рис. 3, количество ЕрММ 10–19 может соответствовать как 2, так и 6 HLA ММ. Это в свою очередь определяет потенциальную возможность использования селекции пары «донор – реципиент» с учетом эпитопных несоответствий не в дополнение, а в качестве альтернативы традиционному подходу. Для оценки правомочности этой гипотезы требуются дополнительные исследования.

Четыре и более HLA ММ сопровождалось значительным риском утраты трансплантата. Учитывая это, нужно признать, что большинство наших реципиентов изначально имеют неблагоприятный «иммунологический фон», обусловленный плохой тканевой совместимостью доноров и реципиентов. Учитывая современную конъюнктуру трансплантологической помощи, надо полагать, что это актуально для абсо-

лютного большинства трансплантологических центров в нашей стране. Форма зависимости риска утраты трансплантата и HLA ММ хорошо описывается экспоненциальной аппроксимацией ($r^2 = 0,9978$). При этом увеличение ЕрММ более 10 сопряжено со значительным увеличением риска утраты трансплантата, при этом зависимость также хорошо описывается логарифмической аппроксимацией ($r^2 = 0,9976$). Вместе с тем преимущества использования селекции пары «донор – реципиент» становятся очевидны только при длительном наблюдении: мы отметили статистически значимые различия только в отдаленном периоде. При том, что данный способ приводит к умеренному увеличению медианы выживаемости (с 8,67 до 10,33 лет, см. рис. 5), он позволяет значительно увеличить долю реципиентов, не утративших функцию трансплантата в отдаленном периоде: при 10–24 ЕрММ через 15 лет 18,28% [95%-й ДИ 8,2; 31,67] трансплантатов функционировало, тогда как при 25–43 ЕрММ – только 4,75% [95%-й ДИ 0,94; 13,64].

Наше исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, оно носило ретроспективный характер. Во-вторых, включало большой объем клинического материала, собранного в течение длительного периода времени (около 30 лет). В своем анализе мы не учитывали такой фактор, как иммуносупрессивная терапия. Вместе с тем очевидно, что подходы к иммуносупрессивной терапии за этот период значительно эволюционировали [1, 2]. В-третьих, знания о антигенности и иммуногенности эпитопов постоянно дополняются, мы использовали базу [10], актуальную на август 2019 г. Не исключено, что если провести расчеты по более поздней модифицированной базе, результаты будут несколько иные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышеизложенное, мы можем заключить, что в рутинной практике одного трансплантационного центра с небольшим, обособленным листом ожидания, учет эпитопных несоответствий может улучшить результаты трансплантации почки: снизить риск появления донор-специфичных анти-HLA антител и повысить выживаемость трансплантатов. Применение этого метода позволяет дополнительно ранжировать кандидатов на трансплантацию в зависимости от количества эпитопных несоответствий в рамках фиксированного количества HLA несоответствий и выбрать оптимального. Вместе с тем существует теоретическая возможность использования этого метода в качестве альтернативы традиционной оценке тканевой совместимости донора и реципиента. Необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shi X., Lv J., Han W., Zhong X., Xie X., Su B., Ding J. What is the impact of human leukocyte antigen mismatching on graft survival and mortality in renal transplantation? A meta-analysis of 23 cohort studies involving 486,608 recipients. *BMC Nephrol.* 2018; 19 (1): 116. DOI: 10.1186/s12882-018-0908-3.
2. Williams R.C., Opelz G., Weil E.J., McGarvey C.J., Chakera H.A. The risk of transplant failure with HLA mismatch in first adult kidney Allografts 2: living donors, summary, guide. *Transplant Direct.* 2017; 3 (5): e152. DOI: 10.1097/TXD.0000000000000664.
3. Rodey G.E., Fuller T.C. Public epitopes and the antigenic structure of the HLA molecules. *Crit. Rev. Immunol.* 1987; 7 (3): 229–267.
4. The National Marrow Donor Program Database. URL: <https://bioinformatics.bethematchclinical.org/>
5. The Allele Frequency Net Database. URL: <http://www.allele-frequencies.net>
6. HLA Epitope Registry Database. URL: <https://www.epregistry.com.br/>
7. HLA nomenclature website. URL: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>
8. Ватазин А.В., Зулькарнаев А.Б., Степанов В.А. Анализ выживаемости пациентов в листе ожидания трансплантации почки с позиции конкурирующих рисков. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2019; 21 (1): 35–45. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-35-45.
9. Gaston R.S., Cecka J.M., Kasiske B.L. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation.* 2010; 90 (1): 68–74. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181e065de.
10. Campos A., Malheiro J., Tafulo S., Santos S., Dias L., Martins S., Almeida M., Pedroso S., Henriques A.C., Cabrita A. Increase of allosensitization after a kidney graft failure: Predictors and effect on retransplantation outcomes. *Nefrologia.* 2017; 37 (4): 397–405. DOI: 10.1016/j.nefro.2016.11.020.

Сведения об авторах

Ватазин Андрей Владимирович, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, хирургическое отделение трансплантации почки, МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, г. Москва. ORCID 0000-0001-8497-0693.

Зулькарнаев Алексей Батыргараевич, д-р мед. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, хирургическое отделение трансплантации почки, МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, г. Москва. ORCID 0000-0001-5405-7887.

Степанов Вадим Анатольевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, хирургическое отделение трансплантации почки, МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, г. Москва. ORCID 0000-0002-0881-0599.

(✉) Зулькарнаев Алексей Батыргараевич, e-mail: 7059899@gmail.com.

Поступила в редакцию 04.09.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Исследование факторов транскрипции GATA3, FOXA1, ELF5 в оценке прогноза у больных люминальным раком молочной железы

Вторушин С.В.^{1,2}, Васильченко Д.В.^{1,2}, Завьялова М.В.^{1,2}, Крахмаль Н.В.¹, Паталяк С.В.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Выявление предсказательных молекулярных маркеров люминального рака молочной железы (РМЖ) позволит оценить риск развития отдаленных метастазов и определить персонализированный подход к прогнозированию течения заболевания при проведении гормонотерапии.

Цель. Изучить взаимосвязь транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 в опухоли с возникновением отдаленных метастазов у больных люминальным подтипом РМЖ при проведении адъювантной гормонотерапии.

Материалы и методы. В исследование включена 101 больная РМЖ (возраст от 30 лет до 81 года, средний возраст $(54,8 \pm 10,3)$ года), стадии T₁₋₄N₁₋₃M₀. Срок наблюдения составил не менее 5 лет. Критериями включения в исследование явились: люминальный молекулярно-генетический подтип опухоли, отсутствие предоперационного лечения. Критерий исключения – IV стадия заболевания. Исследование транскрипционных факторов проводилось иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител фирмы Flarebio (Австрия) к GATA3, FOXA1 и ELF5.

Результаты. Выявлено значимое снижение процента экспрессии FOXA1 и ELF5 в опухоли при развитии отдаленных метастазов ($p = 0,000015$ и $p = 0,000002$ соответственно). Кроме того, показано, что большая частота развития гематогенных метастазов сопряжена с гетерогенной экспрессией в опухоли FOXA1 ($\chi^2 = 6,42$; $p = 0,01$) и ELF5 ($\chi^2 = 14,46$; $p = 0,0001$). Подобных отличий в отношении экспрессии GATA3 не обнаружено.

Заключение. Уровень и характер экспрессии транскрипционных факторов FOXA1 и ELF5 в первичной опухоли могут рассматриваться в качестве потенциальных молекулярных маркеров в оценке риска гематогенного метастазирования у больных люминальным подтипом карциномы молочной железы.

Ключевые слова: люминальный рак молочной железы, факторы транскрипции GATA3, FOXA1, ELF5, прогноз, отдаленные метастазы.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента НШ-2701.2020.7 «Разработка новых подходов к прогнозированию течения карцином молочной железы и легких с учетом морфологической и молекулярно-генетической гетерогенности опухоли».

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Работа проведена согласно принципам добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288) на основании разрешения локального комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 4994 от 27.10.2016).

Для цитирования: Вторушин С.В., Васильченко Д.В., Завьялова М.В., Крахмаль Н.В., Паталяк С.В. Исследование факторов транскрипции GATA3, FOXA1, ELF5 в оценке прогноза у больных люминальным раком молочной железы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 30–37. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-30-37>.

Studying GATA3, FOXA1, and ELF5 transcription factors in the evaluation of prognosis in luminal breast cancer patients

Vtorushin S.V.^{1,2}, Vasilchenko D.V.^{1,2}, Zavyalova M.V.^{1,2}, Krakhmal' N.V.^{1,2}, Patalyak S.V.²

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Background. The identification of predictive molecular markers of luminal breast cancer will help to assess the risk of developing distant metastases and determine a personalized approach to predicting the outcome of the disease during hormone therapy.

The aim of the study was to investigate the relationship between the transcription factors GATA3, FOXA1, and ELF5 in the tumor and the occurrence of distant metastases in patients with luminal subtype of breast cancer during adjuvant hormone therapy.

Materials and methods. The study included 101 patients with breast cancer (aged from 30 years to 81 years, average age (54.8 ± 10.3) years), with stages $T_{1-4}N_{1-3}M_0$ of the disease. The follow-up period was at least 5 years. The inclusion criteria for the study were luminal molecular genetic subtype of the tumor and lack of preoperative treatment. The exclusion criterion was stage IV disease. The study of transcription factors was carried out by the immunohistochemical method using polyclonal antibodies to GATA3, FOXA1, and ELF5, manufactured by Flarebio (Austria).

Results. Low expression of FOXA1 and ELF5 in the tumor was associated with the development of distant metastases ($p = 0.000015$ and $p = 0.000002$, respectively). In addition, it was found that high incidence of hematogenous metastases was associated with heterogeneous expression of FOXA1 ($\chi^2 = 6.42$; $p = 0.01$) and ELF5 ($\chi^2 = 14.46$; $p = 0.0001$) in the tumor. No similar differences were found in the study of GATA3 expression.

Conclusion. The level of expression of transcription factors FOXA1 and ELF5 and their distribution in the primary tumor can be considered as potential molecular markers in assessing the risk of hematogenous metastasis in patients with luminal breast cancer.

Key words: luminal breast cancer, transcription factors GATA3, FOXA1, ELF5, prognosis, distant metastases.

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the Presidential Grant NSh-2701.2020.7 “Development of new approaches to predicting the course of breast and lung carcinomas taking into account the morphological and molecular genetic heterogeneity of the tumor”.

Compliance with the principles of ethics. All patients signed informed consent to participate in the study. The work was carried out in accordance with the principles of voluntariness and confidentiality in accordance with the “Fundamentals of the legislation of the Russian Federation on the protection of public health” (Decree of the President of the Russian Federation of December 24, 1993 No. 2288) on the basis of the permission of the local committee on biomedical ethics of the Research Institute of Oncology of the Tomsk Scientific Research Center (Protocol No. 4994 of 27.10.2016).

For citation: Vtorushin S.V., Vasilchenko D.V., Zavyalova M.V., Krakhmal' N.V., Patalyak S.V. Studying GATA3, FOXA1, and ELF5 transcription factors in the evaluation of prognosis in luminal breast cancer patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 30–37. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-30-37>.

ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия общий уровень заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) у женщин остается стабильно высоким, при этом отмечается незначительное увеличение общей пятилетней выживаемости. В России РМЖ является ведущей онкологической патологией у женского населения и составляет 20,9%, занимая наибольший удельный вес в возрастной группе 30–59 лет [1, 2]. В последнее время наибольший интерес вызывают транскрипционные факторы (ТФ) как значимые предикторы течения первичного рака молочной железы.

GATA-связывающий белок 3 (GATA3) является транскрипционным фактором семейства цинковых пальцев, который в норме регулирует пролиферацию и дифференцировку люминальных клеток молочной железы [3]. Мутация данного транскрипционного фактора играет важную роль в канцерогенезе РМЖ, занимая 3-е место после мутаций TP53 и PIK3CA [4]. Группа исследователей (METABRIC Group) провела анализ 2 433 и 2 000 образцов ткани карциномы молочной железы на наличие значимых мутаций, обнаружив, что мутантные опухоли GATA3 в подгруппе больных с ER + РМЖ отличались низкой степенью злокачественности и, соответственно, благоприятным прогнозом и лучшей общей 10-летней выживаемостью [5]. Позитивная экспрессия в карциноме молочной железы GATA3 при иммуногистохимическом исследовании также сопряжена с лучшим прогнозом и выживаемостью, а потеря экспрессии характеризуется противоположными эффектами [6].

Имеющиеся в литературе данные о связи данного фактора транскрипции с развитием метастазов также противоречивы и неоднозначны. В одном из исследований было обнаружено несоответствие уровня экспрессии описанного транскрипционного фактора в первичной опухоли и в пораженных метастазами лимфатических узлах. Авторы показали, что в части случаев позитивная экспрессия GATA3 отмечалась в пораженных лимфатических узлах при отрицательной экспрессии маркера в первичной опухоли молочной железы и наоборот [7]. В ряде других исследований авторы, оценив экспрессионные характеристики GATA3 в гематогенных метастазах карциномы молочной железы различной локализации, обнаружили, что при развитии метастатических очагов в легких экспрессия изучаемого ТФ была значительно ниже в сравнении с параметрами его экспрессии в метастазах других органов и тканей. Полученные данные могут говорить о возможном участии GATA3 в механизмах, препятствующих метастазированию [8, 9].

Forkhead box A1 (FOXA1), или печеночный ядерный фактор 3α (HNF3α), как и GATA3, является транскрипционным фактором, который не только играет ключевую роль в эмбриональном развитии различных органов и тканей, но также участвует в онкогенезе РМЖ [10]. Имеющиеся в литературе данные позволяют говорить о возможном значимом потенциале ТФ GATA3 в оценке прогноза и ответа на проводимую гормонотерапию [11, 12]. По данным ряда авторов, пациентки с РМЖ, у которых первичные опухоли характеризовались позитивной экспрессией FOXA1 при ER+/PR+ статусе, имели более продолжительную общую и безрецидивную выживаемость [13, 14]. Прогноз заболевания у пациенток, в первую очередь, обусловлен тем, что фактор FOXA1 участвует в процессах эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), взаимодействуя с ключевыми транскрипционными факторами Twist1 и Slug, что приводило к снижению общей выживаемости [15].

E74-подобный фактор 5 (ELF5) – транскрипционный фактор семейства E26 (ETS) – участвует в развитии ткани молочной железы, при этом первоочередное значение ТФ играет в формировании альвеол и трансформации клеток предшественников в зрелые ацинарные клетки [16]. Важное значение ТФ отводится к механизмам его участия в ЭМП, в частности показано ингибирующее влияние ELF5 на ЭМП при раке молочной железы [17]. На моделях мышей линии MCF-7 также было показано, что экспрессия указанного маркера в опухоли может быть сопряжена с резистентностью к гормонотерапии [18].

Таким образом, имеющиеся в литературе данные остаются противоречивыми, что позволяет говорить о необходимости изучения транскрипционных факторов ELF5, FOXA1 и GATA3 у пациенток с РМЖ с целью уточнения механизмов опухолевой прогрессии и рассмотрения исследуемых маркеров в отношении возможной оценки прогноза для создания персонализированного подхода к лечению заболевания.

Цель исследования – изучить взаимосвязь экспрессионных особенностей транскрипционных факторов GATA3, FOXA1, ELF5 в опухоли с возникновением отдаленных метастазов у больных люминальным подтипом рака молочной железы при проведении адъювантной гормонотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование была включена 101 больная раком молочной железы (возраст от 30 лет до 81 года, средний возраст $(54,8 \pm 10,3)$ года), стадии T₁₋₄N₁₋₃M₀. Все пациентки находились на лечении в НИИ онкологии ТНИМЦ. Диагноз рака молочной железы устанавливался на основании исследования core-

биопсии опухоли в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения (2012). Молекулярно-биологический подтип новообразования оценивался иммуногистохимическим методом с окрашиванием антителами к ER (клон 1D5, Dako, Германия), PR (клон PgR636, Dako, Германия), Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Германия), Her2/neu (поликлональное, c-erB-2, Dako, Германия).

Предоперационного лечения пациентки не получали. В плане хирургического лечения всем женщинам была проведена операция в объеме радикальной мастэктомии либо органосохраняющего лечения в объеме секторальной резекции. У 33% пациенток на момент установления диагноза была сохранена менструальная функция, у 68% имело место состояние менопаузы. После этапа хирургического лечения все пациентки получали гормонотерапию тамоксифеном или ингибиторами ароматазы. Срок наблюдения составил не менее 5 лет. Анализировались первичные документы – истории болезни и амбулаторные карты, оценивалось наличие местного рецидива заболевания, наличие и локализация отдаленных метастазов опухоли. Критериями включения в исследование явились люминальный молекулярно-генетический подтип опухоли, отсутствие предоперационного лечения. Критерий исключения – IV стадия заболевания.

При исследовании операционного материала проводилась оценка размера опухолевого узла, ткани молочной железы вне образования, состояния краев резекции, а также всех удаленных аксиллярных лимфатических узлов на предмет наличия метастатического поражения. Степень злокачественности опухоли определялась по Ноттингемской шкале (Bloom-Richardson в модификации Elston). В строме опухоли оценивалась выраженность инфильтрации иммунными клетками в баллах (1 балл – нет или слабо выраженная, 2 балла – умеренно выраженная, 3 балла – резко выраженная).

Иммуногистохимическое исследование транскрипционных факторов проводилось по стандартной методике. Были использованы поликлональные кроличьи антитела фирмы Flarebio (Австрия) к GATA3 (титр 1 : 200), FOXA1 (титр 1 : 200) и ELF5 (титр 1 : 150). Интерпретация результатов окрашивания включала учет следующих признаков: наличие экспрессии маркера (позитивная экспрессия либо негативная), интенсивность экспрессии изучаемого маркера (по шкале от 1 до 3 баллов). Подсчитывали долю (%) опухолевых клеток с позитивным иммунным окрашиванием (подсчет производили на 1 000 клеток в 10 полях зрения при $\times 40$). Дополнительно оценивали характер распределения экспрессии исследуемых факторов транскрипции в опухоли.

В случае равномерного окрашивания в опухолевых клетках, независимо от степени интенсивности экспрессии маркера, экспрессию считали гомогенной. Наличие в срезе опухоли очагов с позитивной и негативной экспрессией, а также очагов с различной степенью выраженности интенсивности окрашивания оценивали как гетерогенный вариант.

Статистический анализ данных производили с помощью программы Statistica 10 с применением дисперсионного анализа, критерия χ^2 , непараметрического U -критерия Манна – Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1 \div Q_3)$. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами был проведен анализ частоты экспрессии изучаемых транскрипционных факторов в опухоли и возможные варианты сочетания данных маркеров у больных с люминальным РМЖ. Частота встречаемости позитивного окрашивания была следующей: у 96 (95,1%) пациенток отмечалась позитивная ядерная экспрессия маркера GATA3, в 5 (4,9%) случаях экспрессия маркера была негативной. Позитивная экспрессия FOXA1 определялась у 91 (90,1%) больной, негативная – у 10 (9,9%) пациенток. При этом позитивная экспрессия фактора ELF5 была отмечена в 89 (88,1%) случаях, в 12 (11,9%) наблюдениях данный фактор в опухоли обнаружен не был.

Анализ сочетания экспрессии всех трех изучаемых факторов транскрипции показал достаточно высокую вариабельность их коэкспрессии. Фенотип GATA3+FOXA1+ELF5+ был доминирующим в исследуемой группе пациенток и составил 78,2% (79/101). В восьми случаях в опухоли отмечалось позитивное окрашивание только с антителами к GATA3 и FOXA1 (GATA3+FOXA1+ELF5-), в четырех – опухолевые клетки имели фенотип GATA3-FOXA1+ELF5+. В трех наблюдениях новообразование имело фенотип GATA3+FOXA1-ELF5-, у пяти пациенток – GATA3+FOXA1-ELF5+. Следует подчеркнуть, что один случай в исследованной группе характеризовался наличием только позитивной экспрессии ELF5 (GATA3-FOXA1-) и еще один имел негативную экспрессию всех трех исследуемых маркеров в первичной опухоли (GATA3-FOXA1-ELF5-).

Проведенный нами анализ показал, что частота позитивной экспрессии, вариант сочетания экспрессии всех трех изучаемых транскрипционных факторов не имели каких-либо статически значимых различий в зависимости от следующих клинико-морфологических признаков: возраст пациенток,

менструальный статус, вариант люминального подтипа (A, B1, B2), стадия онкологического заболевания. Показано, что процент позитивно окрашенных опухолевых клеток к GATA3, FOXA1 и ELF5 статистически не отличался в зависимости от приведенных выше клинико-морфологических параметров.

Ранее нами показано, что имеется связь экспрессии маркеров ELF5 и FOXA1 с таким важным параметром, как размер первичной опухоли. Кроме того, было обнаружено, что характер экспрессии GATA3 и ELF5 был сопряжен с частотой возникновения лимфогенных метастазов [19].

На этапах динамического наблюдения у 9 (8,9%) пациенток были диагностированы локальные рецидивы опухоли. В 8 (88,9%) случаях местные рецидивы опухоли развивались в области послеоперационного рубца, в 1 (11,1%) наблюдении – в оставшейся ткани молочной железы после органосохраняющего лечения. В 7 (77,8%) наблюдениях рецидив опухоли был представлен единичным узлом, в 2 (22,2%) случаях отмечалось множественное опухолевое поражение. Оценка зависимости экспрессии факторов транскрипции в опухоли не выявила существенных статистически значимых закономерностей с частотой развития локальных рецидивов в исследованной группе пациенток.

Отдаленные метастазы были диагностированы у 15 (14,8%) пациенток. Оценивалась локализация метастатических очагов и срок их возникновения после операции. Изолированные метастазы в кости были обнаружены в 9 (60%) из 15 случаев, в 6 (40%) наблюдениях отмечалось множественное опухолевое поражение костей и висцеральных органов. Представляло интерес изучение клинико-морфологических и молекулярных характеристик опухоли у больных люминальным РМЖ в зависимости от развития гематогенной диссеминации. Частота развития отдаленных метастазов была сопряжена с размером первичной опухоли ($p = 0,002$), наличием лимфогенных метастазов в регионарных лимфатических узлах ($\chi^2 = 10,9$; $p = 0,00095$). Отмечалась отчетливая тенденция к большей частоте гематогенной диссеминации при нарастании степени злокачественности опухоли ($\chi^2 = 4,9$; $p = 0,08$). Однако развитие отдаленных метастазов не было сопряжено с показателем пролиферативной активности Ki67 в опухоли ($p = 0,8$) и вариантом люминального подтипа новообразования ($p = 0,6$). При этом были выявлены существенные различия в экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона. Так, в группе больных с наличием гематогенных метастазов экспрессия (%) обоих типов рецепторов была значимо ниже (табл. 1).

Таблица 1

Показатели экспрессии рецепторов половых гормонов в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ, Me ($Q_1 \div Q_3$)		
Рецепторы половых гормонов в опухоли	Экспрессия в опухоли, %	
	Отсутствие гематогенных метастазов	Наличие гематогенных метастазов
ER	94,7 (70÷100)	69,3 (51,5÷93) $p_{1-2} = 0,02$
PR	83 (59,5÷98)	49 (32÷74,4) $p_{1-2} = 0,038$

Анализ связи экспрессии изучаемых транскрипционных факторов в опухоли в группах больных в зависимости от наличия или отсутствия гематогенных метастазов выявил значимые различия в проценте экспрессии FOXA1 и ELF5. Обнаружено, что при развитии отдаленных метастазов процент экспрессии FOXA1 и ELF5 в клетках первичной опухоли достоверно ниже в сравнении с теми случаями, в которых признаки прогрессии болезни отсутствовали. Подобные отличия в отношении экспрессии маркера GATA3 не регистрировались (табл. 2).

Таблица 2

Показатели экспрессии транскрипционных факторов в опухоли в зависимости от наличия отдаленных метастазов у больных люминальным РМЖ, Me ($Q_1 \div Q_3$)		
Транскрипционный фактор	Экспрессия в опухоли, %	
	Отсутствие гематогенных метастазов	Наличие гематогенных метастазов
GATA3	100 (98÷100)	100 (100÷100)
FOXA1	100 (90,3÷100)	70 (42÷76) $p_{1-2} = 0,000015$
ELF5	100 (100÷100)	76 (65÷100) $p_{1-2} = 0,000002$

Исследование показало наличие зависимости между характером распределения экспрессии изучаемых маркеров и частотой гематогенного метастазирования.

Наиболее часто гематогенные метастазы наблюдались при гетерогенной экспрессии в опухоли факторов FOXA1 (рис. 1) ($\chi^2 = 6,42$; $p = 0,01$) и ELF5 ($\chi^2 = 14,46$; $p = 0,0001$) (табл. 3).

При исследовании характера распределения экспрессии GATA3 в опухоли (рис. 2) с частотой развития гематогенных метастазов не выявлены статистически значимые различия. Инфильтрация опухоли клетками иммунной системы является важным компонентом микроокружения, влияющим на процессы пролиферации, ангиогенеза, инвазии, и может определять особенности опухолевой прогрессии, поскольку вовлечена в механизмы метастатического каскада.

Таблица 3

Частота гематогенного метастазирования в зависимости от характера распределения экспрессии маркеров FOXA1 и ELF5 у больных люминальным РМЖ		
Характер распределения экспрессии маркера в первичной опухоли	Гематогенные метастазы, абс. число (%)	
	Отсутствие гематогенных метастазов	Наличие гематогенных метастазов
	FOXA1	
Гомогенный, $n = 45$	44 (97%)	1 (3%)
Гетерогенный, $n = 46$	36 (78,2%)	10 (21,8%)
	ELF5	
	Отсутствие гематогенных метастазов	Наличие гематогенных метастазов
	ELF5	
Гомогенный, $n = 56$	54 (96,4%)	2 (3,6%)
Гетерогенный, $n = 33$	21 (63,6%)	12 (36,4%)

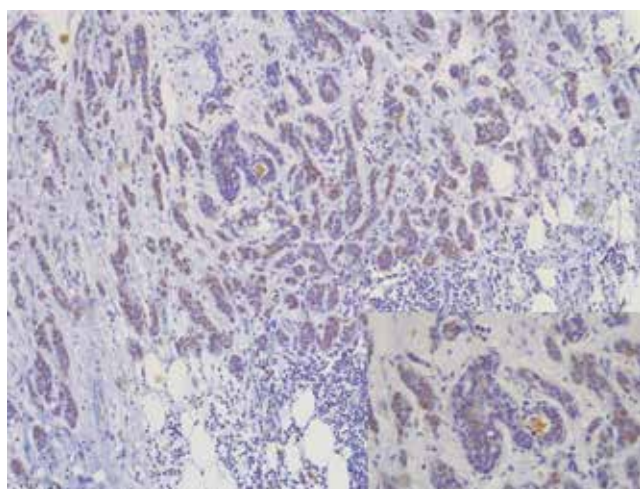


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование: умеренно выраженная гетерогенная ядерная экспрессия фактора FOXA1 в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы, $\times 100$. В нижнем углу справа показано наличие опухолевых клеток с позитивной и негативной экспрессией, $\times 400$

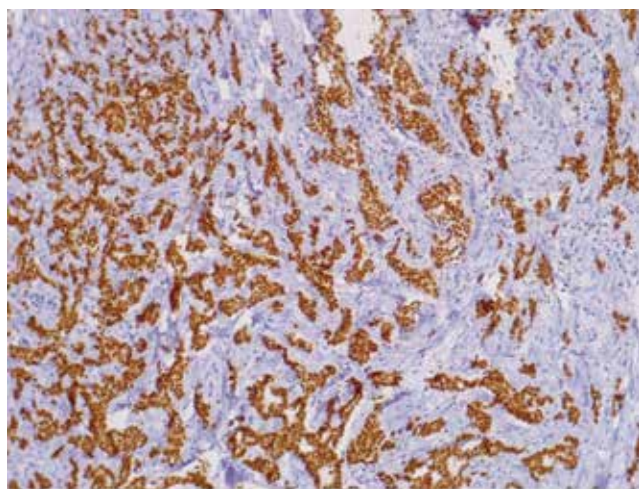


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование: позитивная гомогенная ядерная экспрессия фактора GATA3 в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы, $\times 100$

Проведен анализ экспрессии изучаемых факторов транскрипции в опухоли в зависимости от степени воспалительной инфильтрации в строме новообразования. Исследование показало, что экспрессия GATA3, FOXA1, ELF5 не отличается в опухолях с различной степенью инфильтрации иммунокомпетентными клетками, последняя, в свою очередь, не была значимо сопряжена с частотой развития отдаленных метастазов ($p = 0,57$).

Проведенное исследование транскрипционных факторов GATA3, FOXA1 и ELF5 в первичной опухоли у больных люминальным подтипом РМЖ позволило показать отчетливую зависимость с развитием такой формы опухолевой прогрессии, как гематогенное метастазирование. Обнаруженные связи между низким уровнем экспрессии ELF5 и FOXA1 и частотой гематогенного метастазирования можно объяснить с разных позиций.

С одной стороны, выявленные закономерности могут быть обусловлены патогенетическим влиянием указанных факторов на процессы пролиферации опухолевых клеток и ангиогенез, являясь, в первую очередь, проявлением активации эпителиально-мезенхимального перехода как ключевого механизма в развитии гематогенного прогрессирования. Известно, что факторы транскрипции ELF5 и FOXA1 оказывают супрессорное воздействие на ЭМП, в связи с этим снижение уровня их экспрессии в опухоли может способствовать активации важных факторов Twist1 и Slug. Однако данные аспекты требуют дальнейшего изучения. С другой стороны, гематогенное прогрессирование в группе больных с низким уровнем экспрессии факторов FOXA1 и ELF5 при гетерогенном характере их распределения в опухоли в совокупности с низким уровнем экспрессии ER и PR могут определять развитие резистентности к проводимой гормональной терапии, а следовательно, становится патогенетической основой ее неэффективности и прогрессии заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования демонстрируют клиническую значимость транскрипционных факторов FOXA1 и ELF5 в оценке риска гематогенного метастазирования у больных люминальным подтипом РМЖ и могут быть использованы для прогноза течения заболевания при выборе тактики ведения данной категории пациенток. Анализ данных факторов транскрипции в опухоли может быть выполнен на дооперационном этапе при проведении стандартного иммуноморфологического исследования и учтен в качестве дополнительных параметров опухоли при планировании тактики лечения пациентки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rebecca L., Kimberly D., Ahmedin J. Cancer statistics. 2020. *Ca: Cancer J. Clin.* 2020; 70 (1): 7–30. DOI: 10.3322/caac.21590.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Статистика злокачественных новообразований в России в 2018 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019.
3. Shaoxian T., Baohua Y., Xiaoli X., Yufan C., Xiaoyu T., Hongfen L., Rui B., Xiangjie S., Ruohong S., Wentao Y. Characterisation of GATA3 expression in invasive breast cancer: differences in histological subtypes and immunohistochemically defined molecular subtypes. *J. Clin. Pathol.* 2017; 70 (11): 926–934. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-204137.
4. Koboldt D., Fulton R., McLellan M. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2012; 490 (7418): 61–70. DOI: 10.1038/nature11412.
5. Pereira B., Chin S.F., Rueda O.M., Vollen H.K., Provenzano E., Bardwell H.A., Pugh M., Jones L., Russell R., Sammut S.J., Tsui D.W., Liu B., Dawson S.J., Abraham J., Northen H., Peden J.F., Mukherjee A., Turashvili G., Green A.R., McKinney S., Oloumi A., Shah S., Rosenfeld N., Murphy L., Bentley D.R., Ellis I.O., Purushotham A., Pinder S.E., Borresen-Dale A.L., Earl H.M., Pharoah P.D., Ross M.T., Aparicio S., Caldas C. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Comm.* 2016; 7: 11479. DOI: 10.1038/ncomms11479.
6. Liu J., Prager-van der Smitten W.J., Look M.P., Sieuwerts A.M., Smid M., Meijer-van Gelder M.E., Foekens J.A., Hollestelle A., Martens J.W. GATA3 mRNA expression, but not mutation, associates with longer progression-free survival in ER-positive breast cancer patients treated with first-line tamoxifen for recurrent disease. *Cancer Letters*. 2016; 376 (1): 104–109. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.038.
7. Calvo J., Sanchez-Cid L., Munoz M., Lozano J.J., Thomson T.M., Fernandez P.L. Infrequent loss of luminal differentiation in ductal breast cancer metastasis. *PLoS One*. 2013; 8 (10): e78097. DOI: 10.1371/journal.pone.0078097.
8. McCleskey B.C., Penedo T.L., Zhang K., Hameed O., Siegal G.P., Wei S. GATA3 expression in advanced breast cancer: prognostic value and organ-specific relapse. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015; 144 (5): 756–763. DOI: 10.1309/AJCP5MMR1FJVVPK.
9. Soni A., Ren Z., Hameed O., Chanda D., Morgan C.J., Siegal G.P., Wei S. Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015; 143 (4): 471–478. DOI: 10.1309/AJCPYOSFSV3UPEXS.
10. Rakha E.A., Pareja F.G. New advances in molecular breast cancer pathology. *Semin. Cancer Biol.* 2020; S1044-579X (20): 30080–30088. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.03.014.
11. Fu X., Pereira R., De Angelis C., Veeraraghavan J., Nanda S., Qin L., Cataldo M.L., Sethunath V., Mehravaran S., Gutierrez C., Chamness G.C., Feng Q., O'Malley B.W., Selenica P., Weigelt B., Reis-Filho J.S., Cohen O., Wagle N., Nardone A., Jeselsohn R., Brown M., Rimawi M.F., Osborne C.K., Schiff R. FOXA1 upregulation promotes enhancer and transcriptional reprogramming in endocrine-resistant breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2019. 116 (52): 26823–26834. DOI: 10.1073/pnas.1911584116.
12. Forma E., Jozwiak P., Ciesielski P., Zaczek A., Starska K., Brys M., Krzeslak A. Impact of OGT deregulation on EZH2 target genes *FOXA1* and *FOXC1* expression in breast cancer cells *PLoS One*. 2018; 13 (6): e0198351. DOI: 10.1371/journal.pone.0198351.
13. He K., Zeng H., Xu X., Li A., Cai Q., Long X. Clinicopathological significance of forkhead box protein A1 in breast cancer: a meta-analysis. *Exper. Ther. Med.* 2016; 11 (6): 2525–2530. DOI: 10.3892/etm.2016.3229.
14. Shou J., Lai Y., Xu J., Huang J. Prognostic value of FOXA1 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Breast*. 2016; 27: 35–43. DOI: 10.1016/j.breast.2016.02.009.
15. Xu Y., Qin L., Sun T., Wu H., He T., Ya Z., Mo Q., Liao L., Xu J. Twist1 promotes breast cancer invasion and metastasis by silencing Foxa1 expression. *Oncogene*. 2017; 36 (8): 1157–1166. DOI: 10.1038/ncr.2016.286.
16. Oakes S.R., Naylor M.J., Asselin-Labat M.L., Blazek K.D., Gardiner-Garden M., Hilton H.N., Kazlauskas M., Pritchard M.A., Chodosh L.A., Pfeffer P.L., Lindeman G.J., Visvader J.E., Ormandy C.J. The ets transcription factor *Elf5* specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev.* 2008; 22 (5): 581–586. DOI: 10.1101/gad.1614608.
17. Chakrabarti R., Hwang J., Andres Blanco M., Wei Y., Lukacisin M., Romano R.A., Smalley K., Liu S., Yang Q., Ibrahim T., Mercatali L., Amadori D., Haffty B.G., Sinha S., Kang Y. *Elf5* inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing *Snail2*. *Nature Cell Biology*. 2012; 14 (11): 1212–1222. DOI: 10.1038/ncb2607.
18. Kalyuga M., Gallego-Ortega D., Lee H.J., Roden D.L., Cowley M.J., Caldon C.E., Stone A., Allerdice S.L., Valdes-Mora F., Launchbury R., Statham A.L., Armstrong N., Alles M.C., Young A., Egger A., Au W., Piggin C.L., Evans C.J., Ledger A., Brummer T., Oakes S.R., Kaplan W., Gee J.M., Nicholson R.I., Sutherland R.L., Swarbrick A., Naylor M.J., Clark S.J., Carroll J.S., Ormandy C.J. *ELF5* suppresses estrogen sensitivity and underpins the acquisition of antiestrogen resistance in luminal breast cancer. *PLoS Biol.* 2012; 10 (12): e1001461. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001461.
19. Вторушин С.В., Васильченко Д.В., Крахмаль Н.В., Паталяк С.В. Связь GATA3, FOXA1, ELF5 с клинико-морфологическими параметрами люминального рака молочной железы. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019; (4): 62–74. DOI: 10.31549/2542-1174-2019-4-62-74.

Вклад авторов

Вторушин С.В. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных. Васильченко Д.В. – анализ и интерпретация данных, обзор публикаций по теме рукописи. Завьялова М.В. – анализ и интерпретация данных. Крахмаль Н.В. –

проведение иммуногистохимического исследования, анализ данных. Паталяк С.В. – подбор случаев для исследования, работа с медицинской документацией, анализ данных.

Сведения об авторах

Вторушин Сергей Владимирович, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии, СибГМУ; руководитель отделения общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1195-4008.

Васильченко Дмитрий Владимирович, ассистент, кафедра патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-9780-0770.

Завьялова Марина Викторовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии, СибГМУ; вед. науч. сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9429-9813.

Крахмаль Надежда Валерьевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1909-1681.

Паталяк Станислав Викторович, канд. мед. наук, зав. онкологическим отделением дневного стационара, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-9468-1980.

(✉) **Вторушин Сергей Владимирович**, e-mail: wtorushin@rambler.ru.

Поступила в редакцию 29.05.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Особенности мозговой активности при алкогольной зависимости в задаче на ингибиторный контроль

Галкин С.А.¹, Пешковская А.Г.¹, Рощина О.В.¹, Кисель Н.И.¹, Иванова С.А.^{1,2},
Бохан Н.А.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634014, Томск, ул. Алеутская, 4

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить нейрофизиологические корреляты ингибиторного контроля для определения особенностей процессов торможения при алкогольной зависимости.

Материалы и методы. Обследованы 77 пациентов (42 мужчины и 35 женщин) с алкогольной зависимостью (F10.2 по МКБ-10). Пациенты обследованы с помощью теста для оценки ингибиторного контроля – Go/No – go. По результатам этого теста пациенты были разделены на две группы: группа 1 – без нарушения ингибиторного контроля, группа 2 – с нарушением ингибиторного контроля. Во время выполнения теста проводилась запись электроэнцефалограммы по системе «10–20». Анализировались значения спектральной мощности и когерентности θ -, α - и β -ритмов. Статистическая обработка проводилась с применением непараметрического U -критерия Манна – Уитни и W -критерия Вилкоксона.

Результаты. У пациентов с нарушенным ингибиторным контролем происходило снижение спектральной мощности α -ритма во фронтальной коре головного мозга ($p = 0,003$), тогда как у пациентов без нарушений ингибиторного контроля – в центральной коре ($p = 0,036$). Пациенты с нарушенным ингибиторным контролем реагировали повышением β -мощности на когнитивный стимул в затылочной ($p = 0,014$), левой височной ($p = 0,009$) и правой височной ($p = 0,008$) коре, при этом у пациентов без нарушений ингибиторного контроля наблюдалось повышение β -мощности только в затылочной ($p = 0,007$) и левой височной ($p = 0,002$) коре. По данным когерентности, у пациентов с нарушением ингибиторного контроля наблюдается большая вовлеченность мозговых структур во время выполнения теста Go/No – go во всех частотных диапазонах.

Заключение. Пациенты с нарушением и без нарушения ингибиторного контроля имеют региональные различия в изменениях биоэлектрической активности головного мозга в процессе выполнения теста Go/No – go.

Ключевые слова: алкогольная зависимость, ингибиторный контроль, электроэнцефалография, диагностика.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Администрации Томской области и гранта РФФИ (№ 19-413-703007).

Соответствие принципам этики. Все участники исследования подписали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол № 114 от 22.10.2018).

Для цитирования: Галкин С.А., Пешковская А.Г., Рощина О.В., Кисель Н.И., Иванова С.А., Бохан Н.А. Особенности мозговой активности при алкогольной зависимости в задаче на ингибиторный контроль. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 38–45. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-38-45>.

Features of brain activity in alcohol dependence in the task of inhibitory control

Galkin S.A.¹, Peshkovskaya A.G.¹, Roshchina O.V.¹, Kisel N.I.¹, Ivanova S.A.^{1,2}, Bokhan N.A.^{1,2}

¹ Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences 4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

² Siberian State Medical University 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Objective. To study neurophysiological correlates of inhibitory control to determine the features of inhibition processes in alcohol dependence.

Materials and methods. 77 patients with alcohol dependence were examined (42 men and 35 women) (F10.2 according to ICD-10). Patients were examined using a test to assess inhibitory control – Go/No – go. According to the task performance, patients were divided into two groups: group 1 – without inhibitory control impairments, group 2 – with impaired inhibitory control. During execution of test, electroencephalogram recordings were made according to the 10–20 system. The values of spectral power and coherence of θ -, α - and β -rhythms were analyzed. Statistical processing was carried out using nonparametric Mann–Whitney *U*-test and Wilcoxon *W*-test.

Results. In patients with impaired inhibitory control, there was a decrease in the spectral power of the α -rhythm in the frontal cortex ($p = 0.003$), whereas in patients without inhibitory control disorders – in the Central cortex ($p = 0.036$). Patients with impaired inhibitory control responded by increasing β -power to cognitive stimulus in the occipital ($p = 0.014$), left temporal ($p = 0.009$) and right temporal ($p = 0.008$) cortex, while patients without inhibitory control disorders showed an increase in β -power only in the occipital ($p = 0.007$) and left temporal ($p = 0.002$) cortex. According to coherence data, patients with impaired inhibitory control have greater involvement of brain structures during the “Go/No – go” test in all frequency ranges.

Conclusions. Patients with and without impaired inhibitory control have regional differences in changes in brain bioelectric activity during the “Go/No – go” test.

Key words: alcohol dependence, inhibitory control, electroencephalography, diagnostics.

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

Source of financing. The study was supported by the Tomsk Region Administration and Russian Foundation for Basic Research grant 19-413-703007.

Conformity with the principles of ethics. All the participants of the study had signed the informed consent. The study approved by the local ethics committee under Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 114 of 22.10.2018).

For citation: Galkin S.A., Peshkovskaya A.G., Roshchina O.V., Kisel N.I., Ivanova S.A., Bokhan N.A. Features of brain activity in alcohol dependence in the task of inhibitory control. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-38-45>.

ВВЕДЕНИЕ

Понимание психологических и нейронных процессов, ведущих к расстройствам, связанным с употреблением алкоголя, является актуальной задачей как в здравоохранении, так и в нейробиологии [1, 2]. Современные исследования связывают неспособность воздерживаться от употребления алкоголя, а также поддерживать продолжительную ремиссию с нарушениями когнитивных функций, обеспечивающих регуляцию поведения, в частности ослабленным исполнительным контролем [1, 3]. Ингибирующие (тормозные) процессы являются важными компонентами в контроле поведения [3]. Адаптивное ингибирующее функционирование отражает способность останавливать потенциальный поведенческий ответ на внешний стимул [4].

Тест Go/No – go широко используется для оценки процессов торможения в исполнительном функционировании высшего порядка [5]. Ряд исследований показали снижение подавления реакции (response inhibition) у пациентов с алкогольной зависимостью (АЗ) на сигнал No – go [1, 6, 7]. Считается, что употребление алкоголя влияет как на подавление реакции на стимул, так и на его обработку, что приводит у актуализации ошибочной реакции (response error) на сигнал No – go [6, 7]. Тем не менее некоторые исследователи не обнаружили различий в задаче Go / No – go между пациентами с АЗ и умеренно выпивающими здоровыми людьми [6, 8]. Ряд авторов склоняются к мнению, что далеко не всегда при алкогольной зависимости наблюдается дефицит ингибиторного контроля [3]. Таким образом, вопрос о нарушении ингибиторного контроля у лиц с алкогольной зависимостью до сих пор остается открытым.

Запись и анализ биоэлектрической активности головного мозга являются одним из самых доступных инструментов изучения нейрофизиологических основ нарушений психической деятельности [9, 10]. Наиболее широко в исследованиях используется спектральный и когерентный анализ основных ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Считается, что изменения спектральных характеристик (амплитуды, мощности) ЭЭГ связаны с перестройкой нейромедиаторных систем в ЦНС [11]. Когерентность электрических сигналов является количественным показателем синхронности вовлечения различных корковых отделов в какой-либо процесс [9].

Использование метода оценки биоэлектрической активности головного мозга в психиатрии и наркологии может расширить имеющиеся данные о нейрофизиологическом профиле пациентов с АЗ. Тем не менее, несмотря на высокую доступность и

информативность ЭЭГ, исследований нейрофизиологических коррелятов нарушения ингибиторного контроля при АЗ недостаточно. Таким образом, цель нашего исследования – изучить нейрофизиологические корреляты ингибиторного контроля для определения особенностей процессов торможения при алкогольной зависимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборка. Исследование проводилось на базе отделения клиники НИИ психического здоровья (отделение аддиктивных состояний) Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол № 114 от 22.10.2018).

Обследованы 77 пациентов (42 мужчины, 35 женщин, возраст 45 [38; 51] лет) с диагнозом: психические расстройства и расстройства поведения, связанные с употреблением психоактивных веществ, синдромом алкогольной зависимости (F10.2 по МКБ-10), после детоксикации. Исходя из литературных данных о различных профилях электрофизиологических показателей у правшей и левшей, в группу участников исследования отбирались правши по опроснику латеральных признаков. Диагностическая оценка и клиническая квалификация расстройства осуществлялись с применением диагностических критериев МКБ-10, анамнестических сведений о пациентах и набором стандартизированных психометрических инструментов. Критерии включения: верифицированный диагноз аддиктивного расстройства (алкогольной зависимости) по МКБ-10, добровольное согласие на участие в исследовании, нормальное или скорректированное до нормального зрение, возраст 18–55 лет. Критерии исключения: наличие хронических соматических заболеваний в стадии обострения, эпилепсии, выраженных органических поражений головного мозга, черепно-мозговых травм любой тяжести, умственной отсталости, отказ от участия в исследовании.

Методика. В качестве психометрических инструментов была использована шкала тревоги Гамильтона (The Hamilton Anxiety Rating Scale, HARS) и шкала общего клинического впечатления (Clinical Global Impression Scale, CGI-s). Данные о давности заболевания АЗ, образовании, количестве госпитализаций и количестве потребления алкоголя были взяты из истории болезни пациентов.

Оценка ингибиторного контроля осуществлялась с помощью компьютеризированного теста Go / No – go (рис. 1).

Пациенты должны были нажимать на кнопку при появлении на экране компьютера сигнала зеленого цвета (сигнал Go) и не нажимать на кнопку при появлении сигнала красного цвета (сигнал No – go). Сигналы предъявлялись в случайном порядке. Время предъявления сигнала составляло 500 мс, интервал между сигналами – 800 мс.

Запись и оценка биоэлектрической активности головного мозга проводились на 16-канальном электроэнцефалографе «Неврополиграф» (Neurocor Company, Россия) по международной системе «10–20»

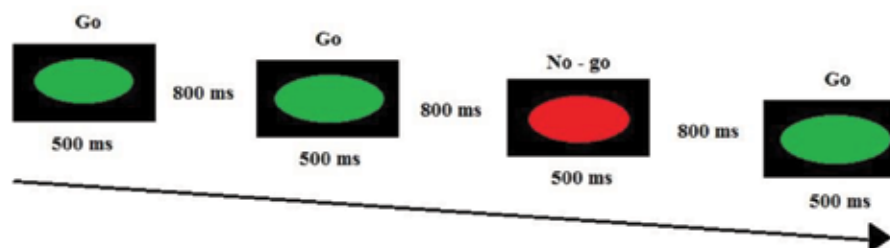


Рис. 1. Тест Go / No – go

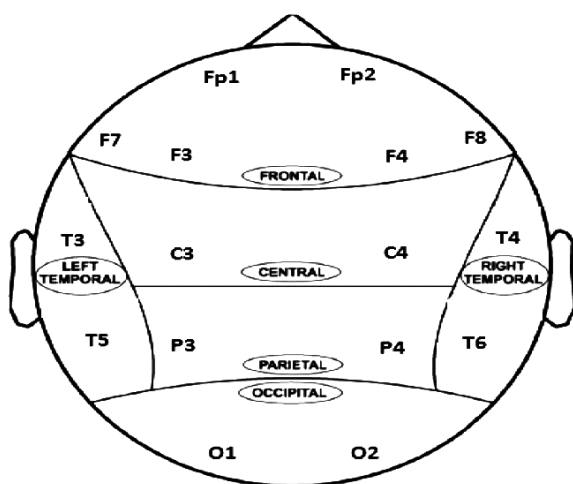


Рис. 2. Электроэнцефалограмма: схема отведений

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica 10.0. Статистические данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1; Q_3]$. Проверка согласия с нормальным законом распределения проводилась с помощью критерия Шапиро – Уилка. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения. Использовался непараметрический U -критерий Манна – Уитни для оценки различий между двумя независимыми выборками (группа 1 против группы 2) и критерий Вилкоксона для оценки различий между двумя связанными выборками (фон ЭЭГ против теста ЭЭГ). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

(рис. 2). Частота среза фильтров верхних и нижних частот составляли 30 и 1,5 Гц. Процедура исследования включала в себя регистрацию фоновой ЭЭГ в условиях покоя с открытыми глазами (1 мин), после чего пациенты выполняли тест Go / No – go с одновременной регистрацией ЭЭГ. На полученных ЭЭГ удалялись артефактные фрагменты. Сигналы обрабатывались с помощью быстрого преобразования Фурье, анализировались значения абсолютной спектральной мощности (мкВ^2) и когерентности для θ -ритма (4–7 Гц), α -ритма (8–13 Гц) и β -ритма (14–30 Гц).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно полученным данным теста Go / No – go, пациенты были разделены на две группы: пациенты, которые не совершали ошибки на сигнал No – go (группа 1), и пациенты с ошибками на сигнал No – go (группа 2) (табл. 1).

Таблица 1

Ответы на задание Go / No – go, $Me [Q_1; Q_3]$			
Показатель	Группа 1, $n = 30$	Группа 2, $n = 47$	p
Количество ошибок на сигнал Go	10 [7; 13]	8 [3; 13]	0,092
Количество ошибок на сигнал No – go	–	4 [3; 7]	–
Время реакции, мс	461 [455; 498]	489 [466; 500]	0,015

Примечание. Уровень статистической значимости при сравнении групп с использованием критерия Манна – Уитни – p (здесь и в табл. 2).

У пациентов из группы 2 наблюдается меньшее количество ошибок на сигнал Go по сравнению с пациентами из группы 1, однако статистически значимых различий не обнаружено ($p > 0,05$). Тем не менее пациенты из группы 2 имели статистически значимо более высокие значения времени реакции ($p < 0,05$).

Демографические и клинические характеристики исследуемых групп пациентов представлены в табл. 2. Статистически значимых различий по полу, возрасту, уровню образования, давности заболевания, шкалам CGI-s (средняя оценка общего состояния здоровья после детоксикации соответствует показателю «умеренно выраженное расстройство»)

и HARS (симптомы тревоги в обеих группах) не выявлено ($p > 0,05$). По сравнению с пациентами из группы 1 (без нарушения ингибиторного контроля) у пациентов из группы 2 обнаружено статистически значимо большее количество госпитализаций за всю историю болезни ($p = 0,024$) и потребления алкоголя (дней в неделю) за последние 6 мес ($p = 0,032$).

Таблица 2

Демографические и клинические характеристики пациентов, Ме [Q_1 ; Q_3]			
Показатель	Группа 1, $n = 30$	Группа 2, $n = 47$	p
Количество мужчин; женщин	18; 12	24; 23	0,43; 0,35
Возраст, лет	44 [39; 50]	44 [36; 51]	0,915
Образование, лет	13 [11; 14]	13 [11; 15]	0,501
Давность заболевания, лет	10 [4; 13]	9 [5; 12]	0,119
Количество госпитализаций	1 [1; 2]	3 [2; 4]	0,024
Количество потребления алкоголя за последние 6 мес (дней в неделю)	2 [1; 4]	4 [2; 4]	0,032
CGI-s	4 [4; 5]	4 [4; 5]	0,522
HARS	19 [10; 25]	19 [12; 23]	0,702

По данным фоновых значений спектральной мощности и когерентности α -, β - и θ -ритмов ЭЭГ, пациенты с ошибками на ингибиторный сигнал No –

го статистически значимо не различались от пациентов без ошибок ($p > 0,05$). Качественно разделить пациентов удалось только по изменениям на ЭЭГ во время выполнения теста Go / No – go. Так, внутригрупповой анализ перестроек биоэлектрической активности головного мозга у пациентов из группы 2 выявил статистически значимое снижение спектральной мощности α -ритма во фронтальной коре ($p = 0,003$) и снижение α -когерентности в Fp1-Fp2 ($p = 0,021$), T3-T4 ($p = 0,003$), Fp1-T3 ($p = 0,003$), T3-O1 ($p = 0,002$) и C3-O1 ($p = 0,034$) во время выполнения теста Go / No – go. Тогда как у пациентов из группы 1 было получено статистически значимое снижение спектральной мощности α -ритма в центральной коре ($p = 0,036$) и α -когерентности в Fp1-Fp2 ($p = 0,014$), C3-C4 ($p = 0,018$), T3-T4 ($p = 0,004$) и T3-O1 ($p = 0,012$) во время выполнения теста Go / No – go (рис. 3).

Пациенты из группы 2 реагировали повышением β -мощности на когнитивный стимул в затылочной ($p = 0,014$), левой височной ($p = 0,009$) и правой височной ($p = 0,008$) коре головного мозга, а также снижением β -когерентности в Fp1-Fp2 ($p = 0,001$), F3-F4 ($p = 0,001$), F7-F8 ($p = 0,006$), C3-C4 ($p = 0,001$), P3-P4 ($p = 0,001$), T3-T4 ($p = 0,001$), T5-T6 ($p = 0,004$), Fp1-T3 ($p = 0,045$), Fp2-T4 ($p = 0,037$), T3-O1 ($p = 0,004$), T4-O2 ($p = 0,001$) и C3-O1 ($p = 0,005$).

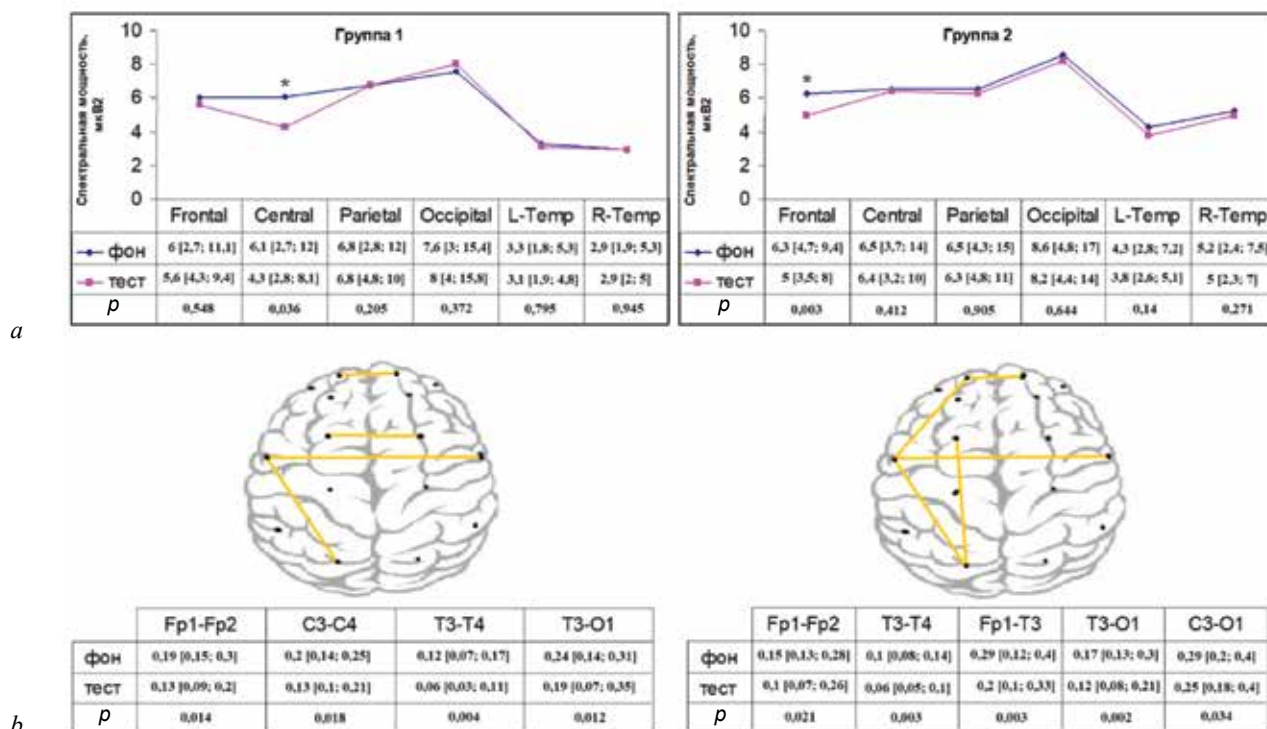


Рис. 3. Спектральная мощность (а) и когерентность (б) α -ритма ЭЭГ во время выполнения теста Go / No – go, Ме [Q_1 ; Q_3]:

* уровень статистической значимости при сравнении групп с использованием критерия Вилкоксона при $p < 0,05$ (здесь и на рис. 4, 5)

При этом у пациентов из группы 1 наблюдалось повышение β -мощности только в затылочной ($p = 0,007$) и левой височной ($p = 0,002$) коре головного мозга, а также снижение β -когерентности в Fp1-Fp2 ($p = 0,001$), F3-F4 ($p = 0,002$), F7-F8 ($p = 0,009$), C3-C4 ($p = 0,003$), P3-P4 ($p = 0,04$), T3-T4 ($p = 0,002$), T3-O1 ($p = 0,02$), T4-O2 ($p = 0,02$) и C3-O1 ($p = 0,03$) (рис. 4).

Изменения ритма медленно волнового диапазона (θ -ритм) в исследуемых группах пациентов с АЗ во

время выполнения теста Go / No – go представлены на рис. 5. У пациентов из группы 2 наблюдалось статистически значимое снижение когерентности θ -ритма в Fp1-Fp2 ($p = 0,018$), F7-F8 ($p = 0,009$), T3-T4 ($p = 0,043$), Fp1-T3 ($p = 0,001$), Fp1-C3 ($p = 0,021$), T3-O1 ($p = 0,001$), T4-O2 ($p = 0,001$), C3-O1 ($p = 0,009$) и C4-O2 ($p = 0,004$) во время выполнения теста, тогда как у пациентов из группы 1 обнаружено снижение когерентности θ -ритма только в F7-F8 ($p = 0,026$), O1-O2 ($p = 0,007$) и T3-T4 ($p = 0,04$).

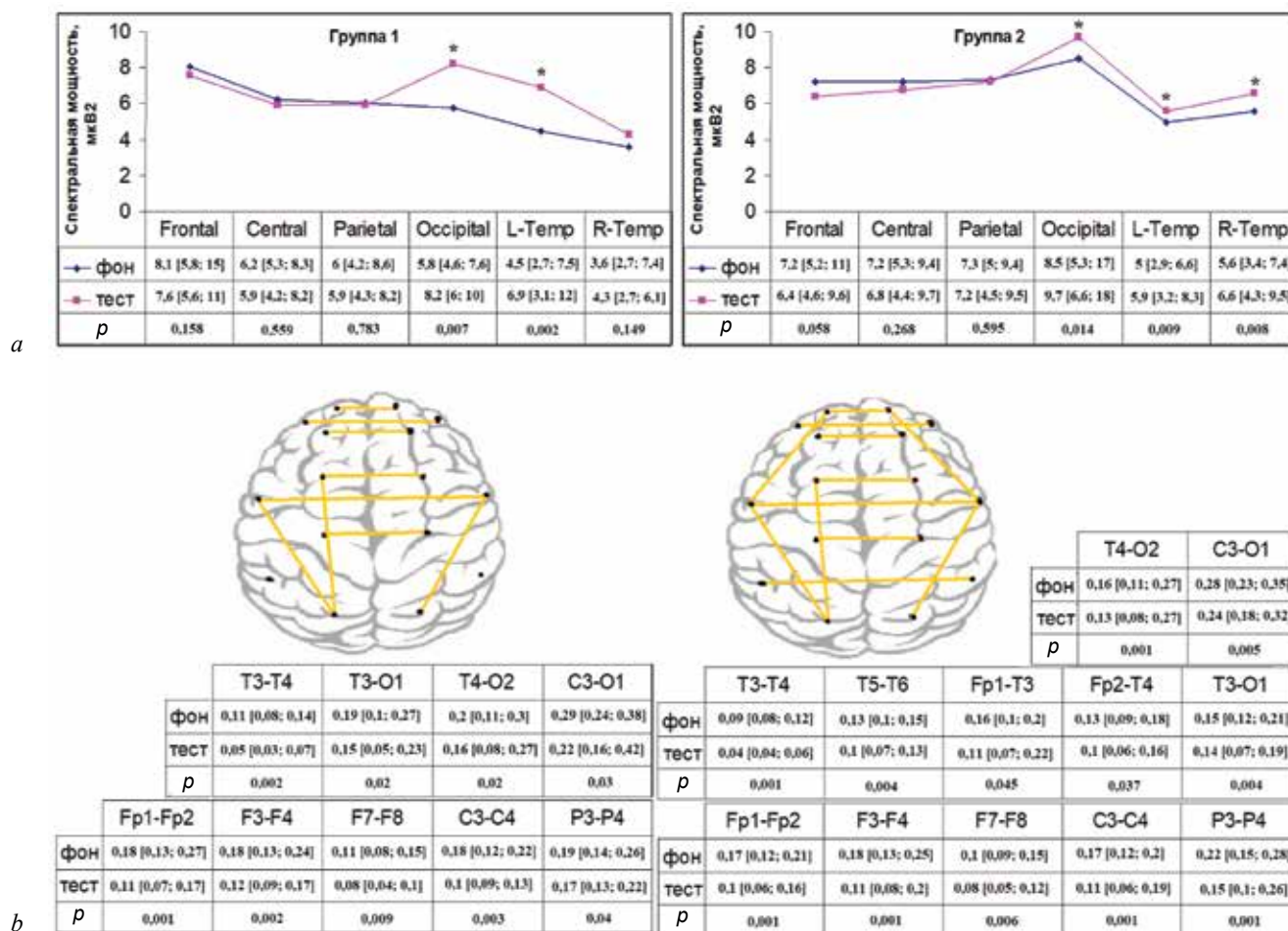


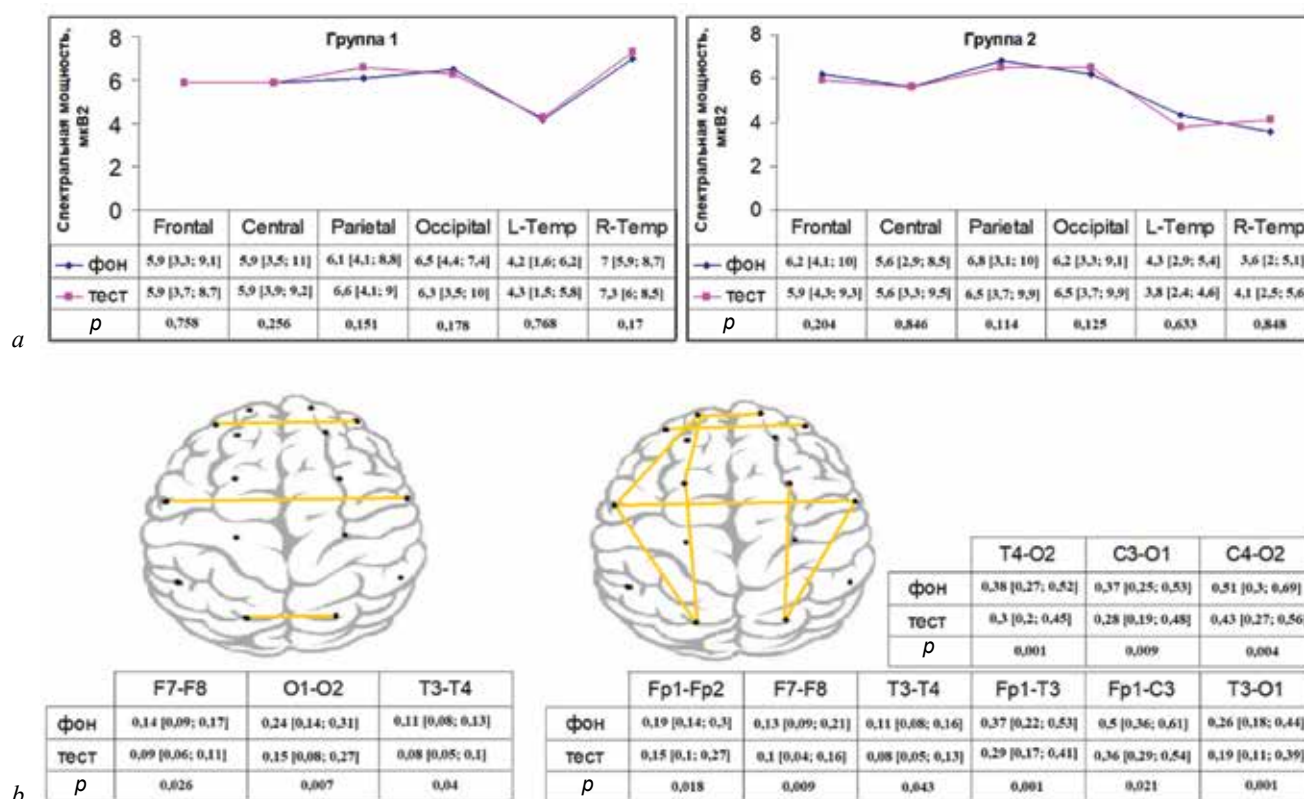
Рис. 4. Спектральная мощность (а) и когерентность (б) β -ритма ЭЭГ во время выполнения теста Go / No – go, Me [Q₁; Q₃]

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании изучались поведенческие характеристики ингибиторного контроля и его нейронные корреляты при помощи теста Go / No – go с целью определения особенностей процессов торможения при АЗ. Полученные данные согласуются с результатами некоторых исследований с использованием когнитивной задачи Go / No – go у пациентов с АЗ [4, 6, 12]. Установлено, что пациенты с нарушением ингибиторного контроля (группа 2) имели более тяжелое течение АЗ, чем пациенты из группы 1: большее

количество госпитализаций и потребления алкоголя в неделю. Более того, имеются данные, что нарушение тормозного контроля осложняет симптоматику АЗ и повышает резистентность к терапии [12].

Результаты электрофизиологического исследования выявили ряд важных различий. Во-первых, у пациентов с нарушенным ингибиторным контролем в процессе выполнения теста Go / No – go происходило снижение спектральной мощности α -ритма во фронтальной коре головного мозга, тогда как у пациентов без нарушений ингибиторного контроля – в центральной коре.

Рис. 5. Спектральная мощность (а) и когерентность (б) θ -ритма ЭЭГ во время выполнения теста Go / No – go, Me [Q_1 ; Q_3]

Как правило, ослабление ингибиторного контроля отражается в виде снижения активности в префронтальной коре [1, 13, 14]. Следовательно, наблюдаемое снижение α -активности во время задачи Go / No – go в лобной коре может объективно отражать дефицит мозговых ресурсов в подавлении реакции на стимул. Снижение спектральной мощности α -ритма в центральной коре у пациентов без нарушений ингибиторного контроля может отражать процессы запуска поведения (подавление реакции на стимул) [13].

Во-вторых, нами было обнаружено необычное повышение β -активности в затылочно-височной коре во время выполнения задачи Go / No – go, причем у пациентов с нарушенным ингибиторным контролем изменения наблюдались в обоих полушариях. Данные изменения могут быть следствием того, что при нарушении ингибиторного контроля отмечается повышенная потребность в активации дополнительных отделов головного мозга для выполнения когнитивной функции. В-третьих, по параметрам когерентности мы наблюдаем значительную вовлеченность мозговых структур у пациентов с нарушением ингибиторного контроля во время выполнения теста Go / No – go, причем во всех частотных диапазонах. Это также подтверждает вывод о дефиците функциональной активности коры головного мозга у паци-

ентов с алкогольной зависимостью с нарушенным ингибиторным контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом результаты этого исследования позволяют дополнить и улучшить понимание нейронного функционирования в когнитивных процессах, в особенности ингибиторного (тормозного) контроля у пациентов с АЗ. Наше исследование показало способность метода электроэнцефалографии выявлять различия в электрической активности головного мозга в процессе выполнения задачи Go / No – go среди пациентов с алкогольной зависимостью с нарушением ингибиторного контроля и без такового. Лучшее понимание различных коррелятов поведения, связанного с потреблением алкоголя, и нейронных эффектов на регуляторные процессы может помочь в диагностике АЗ, а также в создании прогностических критериев патологического влечения к алкоголю.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahmadi A., Pearson G., Meda S., Dager A., Potenza M., Rosen R., Austad C., Raskin S., Fallahi C., Tennen H., Wood R., Stevens M. Influence of alcohol use on neuronal response to Go/No-Go task in college drinkers. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38 (11): 2197–2208. DOI: 10.1038/npp.2013.119.

2. Petit G., Cimochowska A., Kornreich C., Hanak C., Verbanck P., Campanella S. Neurophysiological correlates of response inhibition predict relapse in detoxified alcoholic patients: some preliminary evidence from event-related potentials. *Neuropsychiat., Dis. Treat.* 2014; 10: 1025–1037. DOI: 10.2147/NDT.S61475.
3. Lopez-Caneda E., Roriguez S., Cadaveira F., Corral M., Doallo S. Impact of alcohol use on inhibitory control (and vice versa) during adolescence and young adulthood: a review. *Alcohol and Alcoholism.* 2014; 49 (2): 173–181. DOI: 10.1093/alc/alz/agt168.
4. Field M., Wiers R., Christiansen P., Fillmore M., Verster J. Acute alcohol effects on inhibitory control and implicit cognition: implications for loss of control over drinking. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2010; 34 (8): 1346–1352. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01218.x.
5. Маракшина Ю.А. Латеральная асимметрия в задаче подавления ответа: электрофизиологическое исследование когнитивного контроля. *Теоретическая и экспериментальная психология.* 2016; 9 (3): 17–26.
6. Ames S., Wong S., Bechara A., Cappelli C., Dust M., Grenard J., Stacy A. Neural correlates of a Go/NoGo task with alcohol stimuli in light and heavy young drinkers. *Behav. Brain. Res.* 2014; 274: 382–389. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.08.039.
7. Simmonds D., Pekar J., Mostofsky S. Meta-analysis of Go/No-go tasks demonstrating that fMRI activation associated with response inhibition is task-dependent. *Neuropsychologia.* 2008; 46 (1): 224–232. DOI: 10.1016/j.neuropsychologia.2007.07.015.
8. Zhao X., Qian W., Fu L., Maes J. Deficits in go/no-go task performance in male undergraduate high-risk alcohol users are driven by speeded responding to go stimuli. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse.* 2017; 43 (6): 656–663. DOI: 10.1080/00952990.2017.1282502.
9. Мельникова Т.С., Лапин И.А., Саркисян В.В. Обзор использования когерентного анализа ЭЭГ в психиатрии. *Социальная и клиническая психиатрия.* 2009; 19 (1): 90–94.
10. Янина А.С. Особенности альфа-активности головного мозга на фоне медитативного психологического тренинга. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016; 15 (3): 95–101. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-95-101.
11. Черный В.И., Андронova И.А., Городник Г.А., Черный Т.В., Назаренко К.В., Андронova М.А. Исследование ЭЭГ-предикторов нейромедиаторной и нейроглиальной активности у больных с острой церебральной недостаточностью различного генеза. *Медицина неотложных состояний.* 2016; 4 (75): 45–56. DOI: 10.22141/2224-0586.4.75.2016.75817
12. Трусова А.В., Климанова С.Г. Когнитивный контроль при алкогольной зависимости: обзор современных исследований. *Клиническая и медицинская психология: исследование, обучение, практика.* 2015; 3 (9): 10.
13. Jackson J., Karnani M., Zemelman B., Burdakov D., Lee A. Inhibitory control of prefrontal cortex by the claustrum. *Neuron.* 2018; 99 (5): 1029–1039. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.07.031.
14. Sallard E., Mouthon M., De Pretto M., Spierer L. Modulation of inhibitory control by prefrontal anodal tDCS: A crossover doubleblind sham-controlled fMRI study. *PLoS ONE.* 2018; 13 (3): e0194936. DOI: 10.1371/journal.pone.0194936.

Вклад авторов

Галкин С.А. – разработка концепции исследования, нейрофизиологическое обследование выборки, анализ данных, написание статьи. Пешковская А.Г. – разработка дизайна исследования. Рощина О.В., Кисель Н.И. – клинико-психопатологическое обследование выборки. Иванова С.А., Бохан Н.А. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Галкин Станислав Алексеевич, аспирант, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7709-3917.

Пешковская Анастасия Григорьевна, мл. науч. сотрудник, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-3951-395X.

Рощина Ольга Вячеславовна, мл. науч. сотрудник, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-2246-7045.

Кисель Наталья Игоревна, канд. мед. наук, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-5607-7491.

Иванова Светлана Александровна, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики и биохимии, зам. директора по научной работе, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7078-323X.

Бохан Николай Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ; зав. кафедрой психиатрии, психотерапии, наркологии с курсом медицинской психологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1052-855X.

(✉) Галкин Станислав Алексеевич, e-mail: s01091994@yandex.ru.

Поступила в редакцию 18.11.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К.,
Лопатина О.Л., Салмина А.Б.

*Красноярский государственный медицинский университет (КрасГМУ) имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1*

РЕЗЮМЕ

Цель – изучение молекулярных механизмов нарушения структурно-функциональной целостности гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) при хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с развитием церебральной ангиопатии.

Материалы и методы. Опытная группа – генетическая модель болезни Альцгеймера (БА) – мыши линии B6SLJ -Tg(APPs^{SwF/Lon},PSEN1^{*M146L}*L286V)6799Vas, самцы в возрасте 9 мес. Контрольная группа – мыши линии C57BL/6 x SJL, самцы в возрасте 9 мес.

Результаты. У животных с генетической моделью БА в зубчатой извилине гиппокампа общая длина сосудов в 2,5 раза больше, чем у контрольной группы ($p < 0,01$), при этом средний диаметр сосудов во всех областях гиппокампа меньше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Выявлено, что при генетическом моделировании нейродегенерации в СА2 зоне гиппокампа наблюдается увеличение относительной площади ткани с повышенной проницаемостью ГЭБ (17,80 [9,15;36,75]) по сравнению с контролем (1,38 [0,04;7,60]) при $p < 0,05$. Подобное различие ($p < 0,05$) наблюдается и в зоне СА1 гиппокампа. У животных опытной группы выявлена тенденция ($p > 0,05$) к снижению количества CD31+ эндотелиальных клеток в зубчатой извилине гиппокампа (21,52 [17,56; 24,50]) по сравнению с контролем (23,08 [21,18; 29,84]). Аналогичная ситуация наблюдается в зонах СА2 и СА3 гиппокампа.

Заключение. Нейродегенеративные изменения в гиппокампе животных с генетической моделью БА ассоциированы с нарушением микроциркуляции в ткани головного мозга в результате сокращения диаметра и разветвленности сосудов, повреждения и повышения проницаемости ГЭБ.

Ключевые слова: ангиогенез, гематоэнцефалический барьер, CD31, болезнь Альцгеймера.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (№ НШ-6240.2018.7).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом КрасГМУ (протокол № 3 от 08.10.2018).

Для цитирования: Горина Я.В., Осипова Е.Д., Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Салмина А.Б. Аберрантный ангиогенез в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 46–52. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-46-52>.

Aberrant angiogenesis in brain tissue in experimental Alzheimer's disease

Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Osipova E.D., Morgun A.V., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Salmina A.B.

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky
1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

ABSTRACT

The aim was to study the molecular mechanisms of the violation of the structural and functional integrity of the blood-brain barrier in chronic neurodegeneration of the Alzheimer's type associated with the development of cerebral angiopathy.

Materials and methods. The transgenic model of Alzheimer's disease is the B6SLJ-Tg line mice (APP^{SwF}ILon, PSEN1 * M146L * L286V) 6799Vas group which includes 9 months aged males. The control group included C57BL / 6 x SJL mice, males aged 9 months.

Results. The total length of the vessels in the area of the dentate gyrus is 2.5 times greater in transgenic animal models of Alzheimer's disease than in animals of the control group ($p < 0.01$). The average diameter of blood vessels in all areas of the hippocampus is smaller compared with the control ($p < 0.05$). Transgenic modeling of neurodegeneration in the CA2 zone of the hippocampus increases the relative area of tissue with increased permeability of blood-brain barrier (BBB) (17.80 [9.15; 36.75]) compared to control (1.38 [0.04; 7.60]) at $p < 0.05$. A similar difference ($p < 0.05$) is also observed in the hippocampal area CA1. A tendency ($p > 0.05$) to decrease the number of CD31+ endothelial cells in the dentate gyrus of the hippocampus (21.52 [17.56; 24.50]) in animals of the experimental group compared with the control group (23.08 [21.18; 29.84]) was detected. A similar situation is observed in the CA2 and CA3 areas of the hippocampus.

Conclusion. Neurodegenerative changes in the hippocampus of animals with a transgenic AD model are associated with impaired microcirculation in the brain tissue as a result of a reduction in the diameter and branching of blood vessels, and damage and increased permeability of BBB.

Key words: angiogenesis, blood-brain barrier, CD31, Alzheimer's disease.

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

Source of funding. This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support of leading scientific schools of the Russian Federation (No. SSH-6240.2018.7).

Compliance with ethical standards. The experiments were carried out after consideration of the application and protocol for the use of laboratory animals at a meeting of the bioethical commission at the local ethical committee of the Krasnoyarsk State Medical University of the Russian Ministry of Health (Protocol No. 3 October 8.10.2018).

For citation: Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Osipova E.D., Morgun A.V., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Salmina A.B. Aberrant angiogenesis in brain tissue in experimental Alzheimer's disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 46–52. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-46-52>.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА), являясь распространенным среди пожилых людей нейродегенеративным заболеванием, характеризуется накоплением бета-амилоидных бляшек, тау-содержащих нейрофибриллярных клубков и гибелью нейрональных клеток [1]. Установленные с использованием магнитно-резонансной томографии экспериментальные данные указывают на то, что БА без сопутствующих патологических нарушений встречается значительно реже, чем деменция, сопровождающаяся выраженными сосудистыми изменениями [2], тем самым

подтверждая существенный вклад сосудистых нарушений в развитие когнитивной дисфункции и, как следствие, нейродегенерации.

Считается, что бета-амилоид (Аβ) способствует повреждению микрососудов, развитию церебральной амилоидной ангиопатии (ЦАА), разрыву сосудистой стенки и нарушению церебральной перфузии [3]. Так, в результате исследования головного мозга пациентов с БА с множественными микрокровоизлияниями выявлены низкие уровни Аβ в спинномозговой жидкости, что, вероятно, является результатом повышенного церебрального внутрисосудистого отложения Аβ, приводящего к нарушению целостности

сосудистой стенки, тем самым вызывая микрокровотечение [4]. В дополнение к этому данные исследований с использованием двух моделей трансгенных линий мышей с инсультом (APP^{swe}/PS1^{dE9} и tg2576) показали, что цереброваскулярные нарушения влияют на клиренс Аβ и, следовательно, способствуют его отложению в области мозга с ярко выраженными поврежденными кровеносными сосудами [5].

Кроме того, повреждение головного мозга, вызванное нарушением мозгового кровообращения, увеличивает экспрессию белка-предшественника бета-амилоида (APP) и, следовательно, расщепление Аβ. Из этого следует, что на фоне отложения Аβ, вызывающего цереброваскулярную дисфункцию, последующая ишемия может усилить экспрессию APP и расщепление Аβ, формируя положительную обратную связь и приводя к нарушению структурно-функциональной целостности нейроваскулярной единицы (интегрированная единица, состоящая из микрососудистых эндотелиальных клеток, функционально связанных с нейронами, астроцитами, перicyтами и внеклеточными матричными компонентами) [6].

Также немаловажно отметить, что с возрастом у пациентов с сосудистой деменцией увеличивается проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а именно в срезах ткани головного мозга (гиппокампе и коре) наблюдается накопление нейротоксичных белков крови (тромбина, альбумина и иммуноглобулинов) [7]. Кроме того, нарушение целостности ГЭБ в гиппокампе, особенно в зоне CA1 и зубчатой извилины, коррелирует с развитием когнитивной дисфункции и деструкцией перicyтов [8].

Все вышеизложенные данные указывают на то, что нарушение целостности ГЭБ может способствовать прогрессированию БА, ассоциированной с развитием ЦАА, однако молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза, остаются не до конца ясными. Таким образом, цель настоящего исследования – изучение механизмов нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ при хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа, ассоциированной с развитием ЦАА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные группы. Опытная группа – генетическая модель БА (модель сформировавшихся нейродегенеративных изменений) – мыши линии B6SLJ –Tg(APP^{swe}FILon,PSEN1*^{M146L}*^{L286V})679 9Vas, самцы в возрасте 9 мес ($n = 5$). Контрольная группа – мыши линии C57BL/6 x SJL, самцы в возрасте 9 мес ($n = 5$). Данные линии мышей получены из The Jackson Laboratory.

Оценка проницаемости ГЭБ in vivo. Проводили путем оценки проницаемости красителя Evans blue в срезах головного мозга через 4–5 ч после его внутрибрюшинного введения (2%-й раствор в 0,9%-м растворе NaCl, в объеме 4 мл/кг веса животного) по протоколу, описанному в работе А. Манаенко и соавт. [9]. Животным проводили транскардиальную перфузию головного мозга 10%-м раствором формалина. В корональных срезах головного мозга (толщина 50 мкм) подсчитывали площадь флуоресценции красителя Evans blue (%) от общей площади сосудов в поле зрения с использованием конфокальной микроскопии. Оценку экспрессии CD31 (Abcam, ab28364, rabbit polyclonal, 1 : 1000) на свободно плавающих срезах проводили по стандартной методике одновременного комбинированного окрашивания препарата (протоколы для свободно плавающих срезов фирмы Abcam, США) [10]. Производился подсчет доли (%) клеток, экспрессирующих CD31 (от общего числа клеток в области сосудов в поле зрения, высчитывали по ядрам DAPI-позитивных клеток, локализующихся в области сосудов), в трех полях зрения. Конфокальную микроскопию проводили с помощью микроскопа Olympus FV10i-W (Япония). При анализе фотоснимков использовали программу Olympus FLUOVIEW Viewer 4.0 (Япония).

Оценка особенностей формирования сосудистой сети (ангиогенеза). Проводили микроскопическим методом с использованием микроскопа ZOE (Bio Rad, США) с фотофиксацией и последующей обработкой полученных фотографий в программе ImageJ v1.43 (США). Подсчитывали общую длину сосудистой сети, количество видимых сосудов, число точек ветвлений сосудов и средний диаметр сосудов в 1 мм³ ткани гиппокампа в области CA1, CA2, CA3, зубчатой извилины (DG).

Статистический анализ полученных результатов. Проводили с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики, программой GraphPad6.0. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна – Уитни. Различия принимали значимыми при уровне значимости $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1; Q_3]$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучая особенности формирования сосудистой сети в гиппокампе, нами выявлено, что у животных с генетической моделью БА в области зубчатой извилины общая длина сосудов в 2,5 раза больше, чем у животных контрольной группы ($p = 0,006$) (рис. 1, а). При этом общее количество сосудов в области CA1

и зубчатой извилины превышало показатели контрольных животных в 2,5 и 3 раза соответственно ($p = 0,008$) (рис. 1, *b*). Однако число точек ветвления сосудов у контрольных животных было значимо выше (в 1,5–2 раза) в областях CA1, CA2, CA3 по сравнению с животными опытной группы (рис. 1, *c*).

Средний диаметр сосудов у животных с генетической моделью БА был статистически значимо меньше, чем у животных контрольной группы во всех изученных областях гиппокампа (рис. 1, *d*). Таким образом, формирование ЦАА сопровождается ремоделированием сосудистой сети гиппокампа.

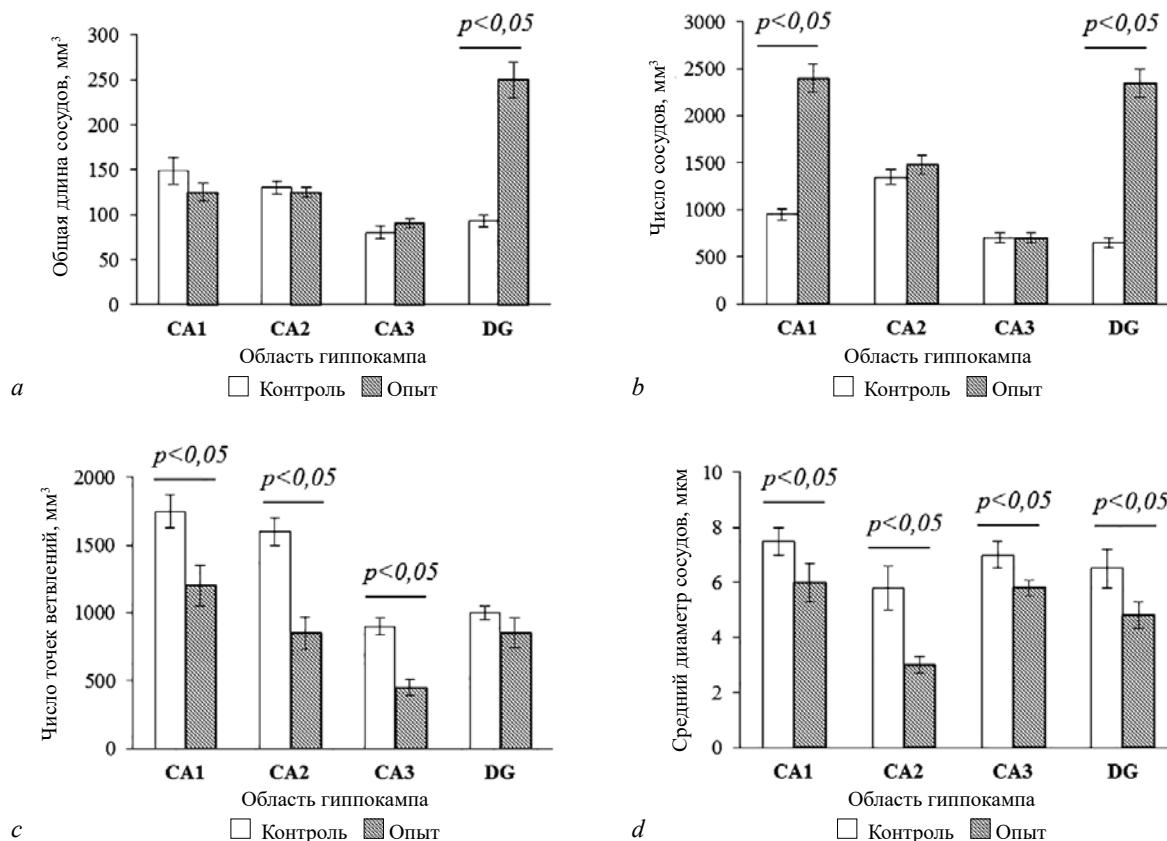


Рис. 1. Особенности сосудистой сети (ангиогенеза) в отдельных областях гиппокампа в экспериментальных группах: *a* – общая длина сосудов, мм³, *b* – число сосудов, мм³, *c* – число точек ветвлений, мм³, *d* – средний диаметр сосудов, мкм

Далее нами была проведена оценка проницаемости ГЭБ с использованием красителя Evans blue в качестве маркера повреждения ГЭБ. Мы обнаружили, что в зоне CA2 гиппокампа животных с генетической моделью БА наблюдается статистически значимое увеличение относительной площади ткани головного мозга, содержащей краситель Evans blue (17,80 [9,15; 36,75]) по сравнению с контрольной группой (1,38 [0,04; 7,60]), $p = 0,025$ (рис. 2, *a*). Подобное статистически значимое различие ($p = 0,033$) наблюдается и в зоне CA1 гиппокампа. В зубчатой извилине гиппокампа животных опытной группы наблюдается тенденция к увеличению относительной площади, содержащей краситель (7,37 [1,25; 27,83]), по сравнению с контрольной группой (1,11 [0,05; 6,35]), $p = 0,025$. Аналогичная ситуация выявлена и в зоне CA3 гиппокампа ($p = 0,157$).

Полученные выше результаты сформировали наш интерес к оценке характера экспрессии одного из маркеров клеток эндотелия, а именно CD31, в различных субрегионах гиппокампа у животных с генетической моделью БА. У животных опытной группы мы выявили тенденцию к снижению количества CD31+ эндотелиальных клеток в зубчатой извилине гиппокампа (21,52 [17,56; 24,50]) по сравнению с контрольной группой (23,08 [21,18; 29,84]), $p = 0,223$ (рис. 2, *b*). Аналогичная ситуация наблюдается в зонах CA2 и CA3 гиппокампа.

Однако в субрегионе CA1 гиппокампа у животных с генетической моделью БА наблюдается статистически значимое увеличение количества CD31+клеток (30,41 [20,50; 31,82]) по сравнению с контрольной группой (22,56 [15,70; 25,34]), $p = 0,028$.

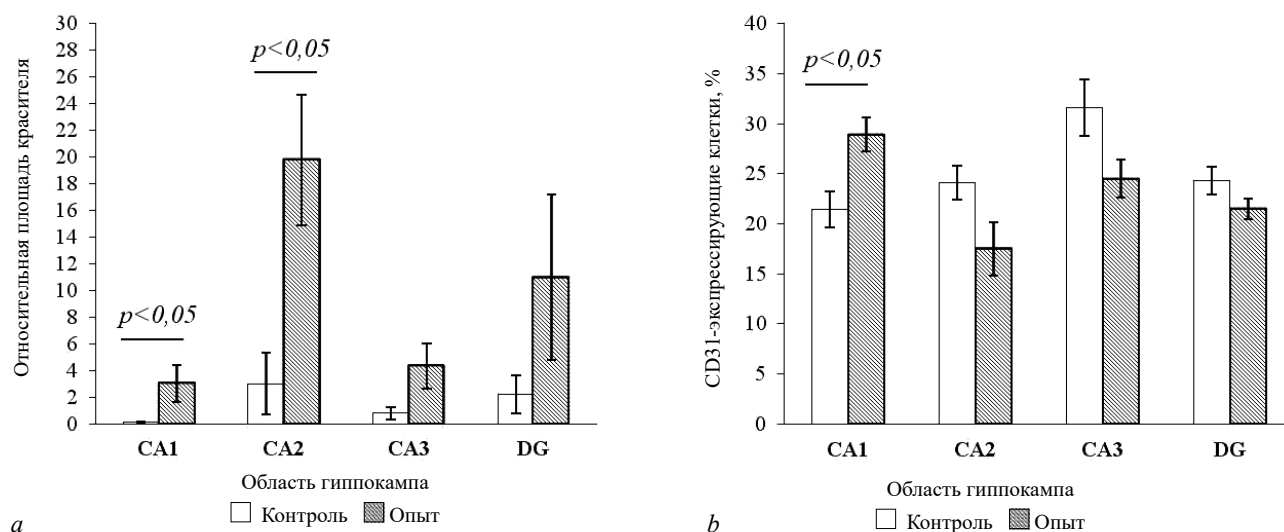


Рис. 2. Проницаемость ГЭБ *in vivo* и экспрессия CD31: *a* – количество красителя Evans blue в отдельных областях гиппокампа в экспериментальных группах, *b* – количество клеток, экспрессирующих CD31 в отдельных областях гиппокампа в экспериментальных группах, %

ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что ЦАА играет ключевую роль в патогенезе деменции, при этом наиболее часто встречается при развитии спорадической формы БА, что свидетельствует о наличии четко выраженной взаимосвязи БА и церебральной ангиопатии. В дополнение к этому при прогрессировании БА в головном мозге наблюдаются различные микрососудистые нарушения, в частности снижение плотности капилляров, атрофия сосудов и дисфункция эндотелия [11]. Известно, что действие ангиогенных факторов роста и цитокинов в ткани головного мозга приводит к активации эндотелиальных клеток, тем самым способствуя формированию микрососудистой сети, что увеличивает локальную микроциркуляцию, индуцируя приток кислорода и питательных веществ в пораженную ткань. Эндотелий также оказывает прямое локальное воздействие, продуцируя не менее 20 паракринных факторов, которые воздействуют на соседние клетки. Хотя многие из этих факторов являются антиапоптотическими, в микрососудах пораженных тканей также выделяются токсические вещества, включая нейротоксины и предшественники Аβ [12].

Результаты наших исследований показали, что у животных со сформировавшимися проявлениями хронической нейродегенерации регистрируются значимые изменения в микрососудистом русле гиппокампа, причем наиболее аффецированной областью является субрегион CA1 гиппокампа (увели-

чение общего числа сосудов, снижение количества ветвлений сосудистой сети и сокращение среднего диаметра микрососудов). С учетом того, что именно в этом субрегионе гиппокампа мы обнаружили сохранение высокого уровня клеток CD31, логично предположить, что зона CA1 и зубчатая извилина гиппокампа доминируют по процессам ремоделирования микрососудистой сети при нейродегенерации альцгеймеровского типа. Таким образом, процессы ремоделирования микрососудистого русла имеют разнонаправленный характер в субрегионах гиппокампа у животных с экспериментальной БА: неоангиогенез характерен для зоны CA1 гиппокампа и зубчатой извилины, локальные нарушения микроциркуляции вследствие сокращения диаметра и разветвленности сосудов – для субрегионов CA2 и CA3.

Эти результаты соответствуют данным об интенсификации процессов неоангиогенеза в головном мозге экспериментальных животных при нейродегенерации альцгеймеровского типа [13], что может сопровождаться развитием патологической проницаемости ГЭБ вследствие нарушения экспрессии белков тесных контактов клеток церебрального эндотелия. На микрососудистом уровне дисфункция эндотелиальных клеток и ГЭБ может быть связана с уменьшением мозгового кровотока и гипоксией. Кроме того, само отложение Аβ в микрососудах может способствовать дальнейшему повреждению эндотелиальных клеток, что в свою очередь может быть одним из звеньев патогенеза БА [14]. Такой

фактор, как нарушение дренажа Аβ в связи с дисфункцией эндотелия, может приводить к накоплению амилоидных бляшек в паренхиме головного мозга. Как показывают экспериментальные данные [15], воздействие Аβ на белки плотных и адгезивных контактов может изменить проницаемость ГЭБ. В свою очередь, повреждение ГЭБ приводит к гибели нейрональных клеток, активации глии, иммунной инфильтрации в паренхиму, что несет негативные последствия для пораженных областей мозга: гормональной дисрегуляции при поражении гипоталамуса [16], когнитивным нарушениям при поражении гиппокампа [17], тем самым способствуя прогрессированию БА.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что увеличение проницаемости ГЭБ наиболее характерно для субрегиона СА2 гиппокампа, в меньшей степени – для СА1 и, весьма вероятно, – для зубчатой извилины гиппокампа. Значительное увеличение проницаемости ГЭБ может быть связано с интенсивным неоангиогенезом, ремоделированием микрососудов (снижением разветвленности сосудов и сокращением среднего диаметра сосудов, повышенной экспрессией CD31 в субрегионе СА1 гиппокампа) на фоне развития церебральной амилоидной ангиопатии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что нейродегенеративные изменения в гиппокампе животных с генетической моделью БА, связанные с аккумуляцией Аβ, ассоциированы с локальным нарушением микроциркуляции вследствие сокращения диаметра и разветвленности сосудов, повышением проницаемости ГЭБ и подавлением неоангиогенеза (за исключением субрегиона СА1) по мере прогрессирования заболевания. Эти наблюдения подчеркивают важность будущих исследований для четкого понимания молекулярных механизмов церебральных микроциркуляторных расстройств и нарушения структурно-функциональной целостности ГЭБ при хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumfor F., Piguet O. Emotion recognition in the dementias: brain correlates and patient implications. *Neurodegener Dis. Manag.* 2013; 3 (3): 277–288. DOI: 10.2217/nmt.13.16.
2. Chui H.C., Ramirez-Gomez L. Clinical and imaging features of mixed Alzheimer and vascular pathologies. *Alzheimers Res. Ther.* 2015; 7 (1): 21. DOI: 10.1186/s13195-015-0104-7.
3. Kalaria R.N. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis.* 2002; 13 (2): 48–52. DOI: 10.1159/000049150.
4. Goos J.D.C., Kester M.I., Barkhof F., Klein M., Blankenstein M.A., Scheltens P. van der Flier W.M. Patients with Alzheimer disease with multiple microbleeds. *Stroke.* 2009; 40 (11): 3455–3460. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.558197.
5. Garcia-Alloza M., Gregory J., Kuchibhotla K.V., Fine S., Wei Y., Ayata C., Frosch M.P., Greenberg S.M., Bacskai B.J. Cerebrovascular lesions induce transient β-amyloid deposition. *Brain.* 2011; 134 (12): 3694–3704. DOI: 10.1093/brain/awr300.
6. Uryu K., Laurer H., McIntosh T., Praticò D., Martinez D., Leight S., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Repetitive mild brain trauma accelerates Aβ deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *J. Neurosci.* 2002; 22 (2): 446–454. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-02-00446.2002.
7. Sengillo J.D., Winkler E.A., Walker C.T., Sullivan J.S., Johnson M., Zlokovic B.V. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2013; 23 (3): 303–310. DOI: 10.1111/bpa.12004.
8. Montagne A., Barnes S.R., Sweeney M.D., Halliday M.R., Sagare A.P., Zhao Z., Toga A.W., Jacobs R.E., Liu C.Y., Amezcua L., Harrington M.G., Chui H.C., Law M., Zlokovic B.V. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron.* 2015; 85 (2): 296–302. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.12.032.
9. Manaenko A., Chen H., Kammer J., Zhang J. H., Tang J. Comparison Evans blue injection routes: intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J. Neurosci. Methods.* 2011; 195 (2): 206–210. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.12.013.
10. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* 2008; 85: 243–272. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)85011-X.
11. Kalaria R.N. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2016; 131 (5): 659–685. DOI: 10.1007/s00401-016-1571-z.
12. Grammas P., Moore P., Weigel P.H. Microvessels from Alzheimer's disease brains kill neurons *in vitro*. *Am. J. Pathol.* 1999; 154 (2): 337–342. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65280-7.
13. Biron K.E., Dickstein D.L., Gopaul R., Jefferies W.A. Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23789. DOI: 10.1371/journal.pone.0023789.
14. Burgmans S., van de Haar H.J., Verhey F.R.J., Backes W.H. Amyloid-β interacts with blood-brain barrier function in dementia: a systematic review. *J. Alzheimers Dis.* 2013; 35 (4): 859–873. DOI: 10.3233/JAD-122155.
15. Marco S., Skaper S.D. Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 2006; 401 (3): 219–224. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.03.047.
16. Jais A., Brüning J.C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 2017; 127 (1): 24–32. DOI: 10.1172/JCI88878.

17. Davidson T.L., Monnot A., Neal A.U., Martin A.A., Horton J.J., Zheng W. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain

barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol. Behav.* 2012; 107 (1): 26–33. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.05.015.

Вклад авторов

Горина Я.В. – анализ и интерпретация данных иммуногистохимического исследования. Осипова Е.Д. – проведение оценки особенностей формирования сосудистой сети (ангиогенеза). Моргун А.В. – анализ и интерпретация данных исследования ангиогенеза. Малиновская Н.А. – проведение оценки проницаемости ГЭБ. Комлева Ю.К. – разработка концепции и дизайна. Лопатина О.Л. – оформление рисунков. Салмина А.Б. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Горина Яна Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-3341-1557.

Осипова Елена Дмитриевна, ст. преподаватель, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Моргун Андрей Васильевич, д-р мед. наук, ассистент, кафедра педиатрии ИПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-9644-5500.

Малиновская Наталия Александровна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-0033-3804.

Комлева Юлия Константиновна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0001-5742-8356.

Лопатина Ольга Леонидовна, д-р биол. наук, профессор, кафедра биохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-7884-2721.

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-9170-0867.

(✉) **Горина Яна Валерьевна**, e-mail: yana_20@bk.ru.

Поступила в редакцию 25.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Редокс формы глутатиона при злокачественном поражении желудка разной степени агрессивности

Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Франциянц Е.М., Нескубина И.В.,
Немашкалова Л.А., Медведева Д.Е., Маслов А.А.

Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) онкологии
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить уровень восстановленного и окисленного глутатиона (GSH и GSSG соответственно), а также тиоловый статус в опухолях рака желудка (РЖ) различных гистологических типов и разной степени дифференцировки.

Материалы и методы. Показатели определены методами иммуноферментного анализа в образцах опухоли, перитуморальной зоны и визуально интактной ткани. Образцы получены во время операции у 52 больных РЖ, в том числе у 18 – с аденокарциномой (АК) G1-2, 8 – с АК G3, 6 – с перстневидноклеточным раком (ПКР), 14 – с сочетанным поражением желудка (СПЖ) и 6 – с компонентом недифференцированного рака G4.

Результаты. В группах больных с низкодифференцированными и недифференцированными опухолями содержание GSH в ткани опухоли и перифокальной зоны было выше, чем в группе больных с высоко- и умеренно дифференцированными опухолями. При АК G3 и ПКР уровень GSH в опухолевой ткани значимо превышал уровень в визуально интактной ткани. При этом в визуально интактной ткани больных ПКР содержание GSH было ниже, чем при АК G1-2 и СПЖ. При СПЖ уровень GSH во всех тканях был выше, чем при АК G1-2.

Наиболее низкий уровень GSSG в ткани опухоли отмечен при ПКР: на 27,5% ниже, чем при АК G1-2, и на 30,3% относительно АК G3. При АК G4 наблюдалось самое высокое содержание GSH во всех исследованных тканях: в опухоли – на 29,9%, в перифокальной зоне – на 40,7%, а в визуально интактной ткани не только GSH, но и GSSG на 22,5–25,5% по сравнению со значениями у больных АК G1-2. Для G4 также характерен высокий уровень тиолового статуса в ткани опухоли – на 80,2 и 89,9% выше, чем в визуально интактной ткани и перитуморальной зоне, и он был значимо выше (на 68–96%), чем при АК G1-2, АК G3, ПКР и СПЖ. Наиболее информативным оказалось соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона.

Заключение. При снижении дифференцировки АК (в ряду G1-2, G3, G4) и изменении гистологического типа опухоли (АК, СПЖ и ПКР), т.е. при увеличении агрессивности неоплазмы, происходит усиление восстановительных процессов в опухолевой ткани, о чем свидетельствует статистически значимо более высокий коэффициент GSH/GSSG и уровень тиолового статуса в случае АК G4.

Ключевые слова: рак желудка, различные гистотипы опухоли, ткани опухоли, перитуморальная и визуально интактная зона, восстановленный глутатион, окисленный глутатион, тиоловый статус.

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

Источник финансирования. Исследование выполнялось в рамках госзадания НМИЦ онкологии на 2018–2020 гг. № АААА-А18-118072790016-2 «Разработка прогностических алгоритмов на основе выявления новых лабораторных факторов прогноза течения злокачественных опухолей».

✉ Горошинская Ирина Александровна, e-mail: iagor17@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие. Исследование одобрено советом по этике Ростовского научно-исследовательского онкологического института (протокол № 11/1 от 03.11.2016).

Для цитирования: Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Немашкалова Л.А., Медведева Д.Е., Маслов А.А. Редокс формы глутатиона при злокачественном поражении желудка разной степени агрессивности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 53–60. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-53-60>.

Redox forms of glutathione in malignant lesions of the stomach with varying aggressiveness degrees

Goroshinskaya I.A., Surikova E.I., Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Nemashkalova L.A., Medvedeva D.E., Maslov A.A.

*National Medical Research Centre for Oncology
63, 14 Liniya Str., Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. To study the levels of reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively), as well as the thiol status in gastric cancer (GC) tumors of various histological types and grades.

Materials and methods. The indicators were determined by ELISA methods in tumor, peritumoral and visually intact tissues obtained during surgery from 52 patients with GC: 18 patients had a G1-2 adenocarcinoma (AC), 8 with G3 AC, 6 with signet ring cell cancer (SRCC), 14 with combined gastric lesions (CGL) – AC with signet ring cell fragments, 6 with patients with a component of undifferentiated cancer, G4.

Results. In the groups of patients with low-differentiated and undifferentiated tumors, the GSH content in the tumor tissue and the peritumoral zone was higher than in the group of patients with well- and moderately-differentiated tumors. Tumor GSH levels in G3 AC and SRCC exceeded the values in visually intact tissues. Moreover, in the visually intact tissue of patients with SRCC, GSH level was reduced relative to G1-2 AC and CGL. GSH in all tissues of patients with CGL was higher than in patients with G1-2 AC. The lowest level of GSSG in the tumor tissue was registered in SRCC: 27.5% lower than in G1-2 AC and 30.3% lower than in G3 AC. Patients with undifferentiated tumors (G4 AC) had the highest GSH content in all studied tissues: by 29.9% in tumor; by 40.7% in peritumoral zone; and in visually intact tissue not only GSH, but also GSSG was increased by 22.5–25.5% in comparison with AC G1-2. G4 AC was also characterized by a sharp increase in the thiol status in tumor tissues by 80.2 and 89.9% higher than in visually intact and peritumoral tissues, and it was statistically higher than in AC G1-2, AC G3, SRCC and CGL. The ratio of GSH and GSSG was the most informative.

Conclusion. Poor AC differentiation (in the row G1-2, G3, G4) and a change of histological tumor type (AC, SPL and SRCC), i.e. an increase in tumor aggressiveness, were accompanied by the enhancement of reductive processes in tumor tissue, as evidenced by the statistically significant increase in the GSH/GSSG coefficient and a sharp increase in the thiol status in G4 AC.

Key words: stomach cancer, various tumor histotypes, tumor tissue, peritumoral and visually intact zones, reduced glutathione, oxidized glutathione, thiol status.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. The study was carried out under the state order for the National Medical Research Centre for Oncology (No. № AAAA-A18-118072790016-2).

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent. The study was approved by the Ethics Committee under the Rostov Research Institute of Oncology (Protocol No. 11/1 of 03.11.2016).

For citation: Goroshinskaya I.A., Surikova E.I., Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Nemashkalova L.A., Medvedeva D.E., Maslov A.A. Redox forms of glutathione in malignant lesions of the stomach with varying aggressiveness degrees. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 53–60. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-53-60>.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ), представляющий собой злокачественную опухоль, происходящую из эпителия слизистой оболочки желудка, остается одним из самых распространенных заболеваний в мире. Согласно мировой статистике, РЖ является пятой по значимости причиной смерти от рака и ежегодно поражает около 1 млн человек [1–3].

Основным гистологическим типом РЖ является аденокарцинома, разделяемая по степени дифференциации на высокодифференцированную G1, умеренно дифференцированную G2 и низкодифференцированную аденокарциному G3. Согласно статистике США, заболеваемость аденокарциномой приближается к 90% от всех новообразований желудка [4].

Другим гистологическим типом РЖ является перстневидноклеточный рак (ПКР), частота которого увеличивается [5]. Обычно считается, что ПКР желудка ассоциируется с плохой выживаемостью и низкой эффективностью лечения по сравнению с аденокарциномой желудка. Тем не менее метаанализ показал отсутствие различий в выживаемости между пациентами с ПКР и не-ПКР в общей популяции. Авторы выявили, что ранние стадии ПКР были связаны с лучшим прогнозом, в то время как распространенный ПКР – с худшим [6].

К относительно редким заболеваниям желудка относится недифференцированная карцинома, в Европе заболеваемость составляет около 1 400 случаев в год, смертность достигает 1 250 случаев в год [7]. Это наиболее агрессивная форма заболевания желудка с абсолютно атипичными клетками, неспособными к дифференцировке. Ее характерными особенностями являются стремительные темпы роста с преобладанием инфильтративного рака и метастазирование на ранних стадиях. У 75% выявленных больных недифференцированный рак желудка на начало лечения дает метастазы.

Одной из характерных особенностей раковых клеток, отличающих их от нормальных клеток, является способность продуцировать большое количество активных форм кислорода (АФК), что обуславливает повышенную зависимость опухолевых клеток от системы антиоксидантной защиты [8]. Понимание биологии редокс-процессов, лежащих в основе развития онкологической патологии, и механизмов их функционирования имеет большое значение для разработки новых терапевтических подходов к воздействию на устойчивые опухоли, основанных на изменении редокс-состояния неоплазмы и окружающих ее тканей [9, 10]. Это обуславливает актуальность изучения окислительно-восстановительных характе-

ристиков конкретной опухоли и ее окружения, особенно в опухолях желудка.

Центральную роль в защите клеток от окислительного поражения играет глутатион, благодаря чему он является одним из основных активных компонентов патофизиологии рака [11]. Восстановленный глутатион и глутатион-зависимые ферменты имеют большое значение для нормального функционирования интестинального эпителия желудка, относящегося к тканям, которым свойственно непрерывное клеточное обновление, и постоянство структуры эпителия обеспечивается только при координации фаз пролиферации, дифференцировки и апоптоза. При нарушении баланса окислительно-восстановительных процессов возможна инициация злокачественной трансформации и прогрессирование неоплазии [12, 13].

В организме человека глутатион присутствует в нескольких окислительно-восстановительных формах, среди которых наиболее важными являются восстановленный глутатион (GSH) и окисленный глутатион (GSSG). Восстановленный глутатион составляет до 98% общего пула глутатиона при нормальных условиях [14]. Концентрация и роль GSH зависят от дифференцировки и типа клеток. GSH является растворимым антиоксидантом, который в высоких клеточных концентрациях (1–10 мМ) присутствует в цитоплазме, митохондриях и ядре. Митохондрии содержат 10% глутатиона клетки [15]. Эритроциты богаты глутатионом и содержат 99% GSH против 1%, присутствующего в плазме [16]. В плазме крови содержится только около 20 мкМ глутатиона с доминирующей формой GSSG [17].

Ранее нами были показаны особенности окислительно-восстановительных систем в опухолевой ткани и окружающих тканях при аденокарциноме желудка [18], а также изменения антиоксидантного статуса крови больных раком желудка [19].

Цель данной работы – сравнение уровня восстановленного и окисленного глутатиона, а также тиолового статуса в опухолях желудка различных гистологических типов. Показатели были изучены в ткани опухоли, перитуморальной зоне и условно здоровой ткани у больных аденокарциномой желудка разной степени дифференцировки, перстневидноклеточным раком и при сочетанном поражении желудка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данное исследование были включены ткани, полученные при операции 52 больных РЖ (28 мужчин и 24 женщины), разделенных в зависимости от гистотипа опухоли на пять групп: аденокарцинома G1-2 – 18 пациентов ($T_{2-4}N_{0-2}M_0$); аденокарцинома

G3 – 8 пациентов ($T_{2-4}N_{0-3}M_0$); аденокарцинома с наличием недифференцированных клеток (G3+G4) – 6 пациентов ($T_{2-4}N_{1-3}M_{0-1}$); сочетанное поражение желудка (аденокарцинома G2 или G3 с наличием перстневидных компонентов) – 14 пациентов ($T_{3-4}N_{0-3}M_{0-1}$); перстневидноклеточный рак (ПКР) – 6 пациентов ($T_{1-4}N_{1-3}M_{0-1}$). Группы пациентов были сопоставимы по полу и возрасту (50–84 года). Гистологический контроль был проведен во всех случаях. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на использование биологического материала. В тканях опухоли, перифокальной зоны и условно здоровых тканях, полученных на линии резекции, были изучены содержание восстановленного и окисленного глутатиона (редокс форм глутатиона), а также тиоловый статус методами иммуноферментного анализа (ELISA).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistika 6.0 по t -критерию Стьюдента для двух независимых выборок, а также с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Предварительно проводили проверку выборок на соответствие нормальному рас-

пределению по W -критерию Шапиро – Уилка для малых выборок. Коррекцию на множественность сравнения проводили с использованием FDR-контроля (False Discovery Rate control: Benjamini, Hochberg, 1995) [20]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, а при $0,1 > p > 0,05$ – на уровне статистической тенденции к значимости. В таблицах данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Преобладание в нашем исследовании больных с высоко- и умеренно дифференцированной аденокарциномой согласуется с данными, представленными в других исследованиях [21].

Как видно из табл. 1, содержание GSH в опухолевой ткани было выше, чем в условно здоровой ткани желудка во всех группах больных РЖ, однако значимые различия были выявлены только при ПКР. Содержание GSSG при ПКР и у больных со статусом T4 и при IV стадии процесса было значимо ниже в ткани опухоли по сравнению с условно здоровой тканью.

Таблица 1

Содержание восстановленного и окисленного глутатиона в ткани опухоли и прилегающих зонах у больных раком желудка с разной гистологией и стадией злокачественного процесса, $M \pm m$			
Показатель	Опухоль	Перитуморальная зона	Условно здоровая ткань
Аденокарцинома G1-2, $n = 18$			
GSH, мкг/г ткани	$871,04 \pm 40,07$	$790,79 \pm 39,64$	$837,51 \pm 21,27$
GSSG, нг/г ткани	$499,14 \pm 22,54$	$513,73 \pm 23,17$	$473,97 \pm 14,71$
Аденокарцинома G3, $n = 8$			
GSH, мкг/г ткани	$968,46 \pm 39,8$	$942,99 \pm 47,87$	$808,05 \pm 66,76$
GSSG, нг/г ткани	$519,02 \pm 28,61$	$554,12 \pm 27,39$	$456,04 \pm 45,91$
Сочетанная опухоль (АК + ПКР), $n = 14$			
GSH, мкг/г ткани	$983,02 \pm 29,9$	$943,79 \pm 32,87$	$958,51 \pm 56,21$
GSSG, нг/г ткани	$460,48 \pm 25,04$	$464,5 \pm 13,71$	$502,49 \pm 19,58$
ПКР, $n = 6$			
GSH, мкг/г ткани	$810,95 \pm 40,6$ $p_1 = 0,095$ $p_2 < 0,02$	$718,21 \pm 16,45$ $p_1 = 0,01$ $p_2 < 0,002$	$693,01 \pm 17,86$ $p < 0,002$ $p_2 < 0,03$ $p_{оп} < 0,05$
GSSG, нг/г ткани	$361,69 \pm 26,46$ $p = 0,02$ $p_1 = 0,01$	$440,18 \pm 37,28$	$504,72 \pm 15,51$ $p_{оп} < 0,002$
ПКР и сочетанная опухоль, $n = 20$			
GSH, мкг/г ткани	$925,66 \pm 30,57$	$876,11 \pm 33,18$	$878,86 \pm 48,14$
GSSG, нг/г ткани	$430,84 \pm 21,53$ $p_1 = 0,075$	$457,2 \pm 14,36$	$503,16 \pm 14,24$ $p_{оп} < 0,02$ $p_{пер} < 0,03$
Недифференцированная опухоль (G3 + G4), $n = 6$			
GSH, мкг/г ткани	$1131,16 \pm 111,22$ $p < 0,075$ $p_3 < 0,07$	$1112,53 \pm 113,2$ $p < 0,02$ $p_2 = 0,095$	$1026,22 \pm 29,04$ $p < 0,0006$ $p_3 < 0,00001$

Окончание табл. 1

Показатель	Опухоль	Перитуморальная зона	Условно здоровая ткань
GSSG, нг/г ткани	527,52 ± 34,13, $p_3 = 0,01$	512,63 ± 59,58 $p_3 = 0,018$	594,65 ± 11,3 $p < 0,001$
T4 или IV st., $n = 10$ GSH, мкг/г ткани	905,48 ± 56,31	800,98 ± 46,2 $p_2 < 0,035$ $p_4 = 0,010$	812,67 ± 32,93, $p_3 < 0,03$, $p_4 = 0,0006$
GSSG, нг/г ткани	436,2 ± 26,66	459,8 ± 27,5	515,77 ± 15,51, $p_{оп} < 0,04$

Примечание. Статистическая значимость различий с коррекцией на множественность по FDR: p – относительно АК G1-2, p_1 – относительно АК G3, p_2 – относительно сочетанного поражения, p_3 – относительно ПКР, p_4 – относительно АК G4, $p_{оп}$ – относительно опухолевой ткани, $p_{пер}$ – относительно ткани перитуморальной зоны (здесь и в табл. 2, 3).

В группах больных с низкодифференцированными и недифференцированными опухолями содержание GSH в ткани опухоли и перитуморальной зоны было выше, чем в группе больных с высоко- и умеренно дифференцированными опухолями. При ПКР уровень GSSG в ткани опухоли был ниже на 27,5% относительно АК G1-2 и на 30,3% относительно АК G3 ($p = 0,01–0,002$). При этом в условно здоровой ткани больных ПКР было снижено содержание GSH на 17,3% относительно АК G1-2 ($p < 0,002$). Для боль-

ных с недифференцированным раком (АК G4) было характерно увеличение содержания GSH во всех исследованных тканях: в опухоли на 29,9%, в перитуморальной зоне на 40,7%, а в здоровой ткани был повышен уровень не только GSH на 22,5%, но и GSSG на 25,5% по сравнению со значениями у больных АК G1-2.

Наиболее информативным оказалось соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH/GSSG•10-3), представленное в табл. 2.

Таблица 2

Коэффициент соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона в ткани опухоли и прилегающих зонах у больных раком желудка с разной гистологией и стадией злокачественного процесса

Показатель	Опухоль	Перитуморальная зона	Условно здоровая ткань
Аденокарцинома G1-2, $n = 18$	1,656 ± 0,081	1,611 ± 0,102	1,815 ± 0,087
Аденокарцинома G3, $n = 8$	1,89 ± 0,094	1,701 ± 0,004	1,83 ± 0,115
Сочетанная опухоль (АК + ПКР), $n = 14$	2,228 ± 0,153 $p < 0,005$	2,058 ± 0,098 $p < 0,015$ $p_1 < 0,05$	1,947 ± 0,136
ПКР, $n = 6$	2,29 ± 0,161 $p < 0,005$	1,689 ± 0,137 $p_{оп} = 0,018$	1,383 ± 0,073 $p < 0,05$ $p_1 = 0,05$ $p_2 = 0,075$ $p_{оп} < 0,001$
ПКР и сочетанная опухоль, $n = 20$	2,249 ± 0,113 $p < 0,005$	1,947 ± 0,087 $p < 0,05$ $p_{оп} = 0,039$	1,778 ± 0,113 $p_{оп} < 0,015$
Недифференцированная опухоль (G3 + G4), $n = 6$	2,246 ± 0,357 $p < 0,05$	2,205 ± 0,09 $p < 0,02$ $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	1,728 ± 0,052 $p_3 < 0,01$ $p_{пер} < 0,005$
T4 или IV st., $n = 10$	2,146 ± 0,093 $p < 0,005$	1,755 ± 0,066 $p_4 = 0,001$ $p_{оп} = 0,003$	1,596 ± 0,09 $p_{оп} < 0,005$

У больных с наличием недифференцированных клеток (G3 + G4) данный коэффициент был выше, чем у больных с G1-2, на 35,6% ($p < 0,05$) в ткани опухоли и на 36,9% в перитуморальной зоне ($p <$

0,02). У больных с прорастанием опухоли в серозную оболочку и распространением на соседние структуры (T4), а также при IV стадии процесса этот показатель был выше, чем у больных с G1-2, на 30%

($p < 0,005$). Максимально высокое значение соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона было выявлено в опухоли больных ПКР – выше, чем у больных с G1-2, на 38,3% ($p < 0,005$). При со-

четанном поражении желудка превышение значений у больных с G1-2 составило 34,5%.

Данные по тиоловому статусу представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тиоловый статус в ткани опухоли и прилегающих зонах у больных раком желудка с разной гистологией и стадией злокачественного процесса, мкг/г ткани, $M \pm m$			
Показатель	Опухоль	Перитуморальная зона	Условно здоровая ткань
Аденокарцинома G1-2, $n = 16$	$156,62 \pm 9,93$	$132,94 \pm 10,04$	$124,16 \pm 11,97$
$n = 4$	$218,74 \pm 5,84$	–	–
$n = 12$	$125,91 \pm 7,41$	–	–
Аденокарцинома G3, $n = 8$	$91,91 \pm 10,75$, $p < 0,005$	$115,1 \pm 9,8$	$110,88 \pm 15,94$
Сочетанная опухоль, $n = 14$	$128,76 \pm 14,78$	$104,43 \pm 5,54$	$115,76 \pm 14,39$
ПКР, $n = 6$	$129,0 \pm 19,58$	$122,26 \pm 15,49$	$130,69 \pm 10,52$
ПКР + сочетанная опухоль, $n = 20$	$128,83 \pm 11,61$	$109,78 \pm 6,09$	$120,24 \pm 10,51$
Недифференцированная опухоль (G3 + G4), $n = 6$	$217,26 \pm 15,71$, $p < 0,02$, $p_1 < 0,0001$, $p_2 = 0,09$, $p_3 < 0,02$	$114,39 \pm 16,91$, $p_{\text{оп}} < 0,005$	$120,58 \pm 20,43$, $p_{\text{оп}} = 0,004$
T4 или IV st., $n = 10$	$114,17 \pm 20,76$, $p = 0,09$	$119,23 \pm 5,81$	$115,85 \pm 10,13$

Как видно из табл. 3, у 4 из 16 больных с высоко и умеренно дифференцированной аденокарциномой наблюдались высокие значения тиолового статуса в опухолевой ткани. В целом по группе он был выше, чем у больных с низкодифференцированной аденокарциномой, на 70,4% ($p < 0,005$). Уровень показателя у больных ПКР и при сочетанном поражении желудка занимал промежуточное положение.

Интересным представляется высокий уровень тиолового статуса в ткани опухоли при аденокарциноме с наличием недифференцированных клеток (G4): на 80,2 и 89,9% выше, чем в условно здоровой ткани и перитуморальной зоне ($p < 0,005$), выше на 38,7% ($p < 0,02$), чем при АК G1-2, на 136,4% ($p < 0,0001$), чем при АК G3, и на 68,6% ($p < 0,02$), чем при ПКР и СПЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение уровней редокс-форм глутатиона показало, что содержание GSH в опухолевой ткани было выше, чем в условно здоровой ткани желудка во всех группах пациентов с аденокарциномой желудка, но степень различия зависела от гистологического типа и степени дифференцировки опухоли. Редокс-статус глутатиона, т.е. соотношение восстановленного и окисленного глутатиона, в наибольшей степени было нарушено в тканях опухоли при ПКР. Следует отметить, что отношение восстановленный/окисленный глутатион внутри клетки рассматривается в

качестве одного из важнейших параметров, который характеризует уровень окислительного стресса [22].

Высокий уровень GSH у больных низкодифференцированной аденокарциномой, особенно у больных с наличием в опухоли недифференцированных клеток, а также значимо более высокое соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона у больных ПКР, сочетанным поражением и недифференцированной карциномой желудка свидетельствуют о роли восстановленного глутатиона в поддержании способности опухоли расти и прогрессировать.

Помимо того, что восстановленный глутатион является мощным антиоксидантом, он обладает рядом функций, не связанных с защитой от АФК. Он участвует в процессах детоксикации электрофильных соединений (ксенобиотиков), а также в метаболизме простагландинов и лейкотриенов, транспорте аминокислот и во всасывании микроэлементов из кишечника, главным образом железа и селена. Тем не менее доминирующая роль GSH, несомненно, антиоксидантная.

Восстановленный глутатион не только является ловушкой свободных радикалов, но и занимается восстановлением поврежденных клеток. Благодаря наличию тиоловой группы (-SH) в молекуле GSH обладает способностью защищать другие тиоловые группы в белках от окислительного повреждения [14]. В этой связи выявленный нами почти двукратно более высокий тиоловый статус только в опухоли

левой ткани при недифференцированных опухолях желудка представляет интерес для дальнейшего исследования и анализа. Важнейшие функции групп -SH в биологических системах включают образование комплексов с ионами металлов, участие в реакциях окисления и образования тиоловых радикалов и дисульфидов [17]. Как антиоксидант, GSH снижает уровень АФК в ходе ферментативных и неферментативных реакций. Он регенерирует другие окисленные низкомолекулярные антиоксиданты, например витамин С и витамин Е, участвует в восстановлении белковых молекул, нуклеиновых кислот и липидов, поврежденных в процессах перекисного окисления, и в поддержании сульфгидрильных групп белков в восстановленном состоянии, что необходимо для репарации и экспрессии ДНК [23–25]. Окисленная форма, глутатион дисульфид (GSSG), может быть восстановлена до GSH. Следовательно, отношение GSH/GSSG считается важным показателем окислительно-восстановительного баланса в клетках, причем более высокое отношение означает меньший окислительный стресс [26].

Несомненный интерес представляют новейшие исследования *in vitro*, показавшие, что не только восстановленный, но и окисленный глутатион тормозит образование супероксида (O_2^-), ингибируя хиноидное окисление адреналина [27]. Это в еще большей степени усиливает важность дальнейших исследований редокс-форм глутатиона при патологических состояниях и может привести к изменению устоявшихся представлений об исключительной роли восстановленного глутатиона в качестве антиоксиданта и потребовать некоторой корректировки предполагаемых механизмов участия глутатионовой системы в процессах канцерогенеза и противоопухолевых воздействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных нами данных и приведенной выше информации об особенностях антиоксидантной роли глутатиона способствует пониманию его причастности к злокачественному прогрессированию при опухолях желудка различных гистотипов. Уменьшение дифференцировки аденокарциномы (в ряду G1-2, G3, G4) и изменение гистологического типа опухоли (аденокарцинома, сочетанное поражение желудка, ПКР), т. е. увеличение агрессивности опухоли, сопровождалось усилением процессов восстановления в опухолевой ткани, что подтверждается статистически значимо более высоким соотношением GSH/GSSG и резко повышенным тиоловым статусом в случае недифференцированных опухолей (G4). Возрастающее GSH по мере снижения степени дифференцировки

аденокарциномы, а также более высокий коэффициент соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона у больных ПКР, при сочетанном поражении и недифференцированной карциноме желудка указывают на вероятность участия восстановленного глутатиона в сохранении способности опухоли к росту и прогрессированию заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61 (2): 69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
2. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: Cancer J. Clin.* 2015; 65 (2): 87–108. DOI: 10.3322/caac.21262.
3. Sitarz R., Skierucha M., Mielko J., Offerhaus G.J.A., Maciejewski R., Polkowski W.P. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag. Res.* 2018; 10: 239–248. DOI: 10.2147/CMAR.S149619.
4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta: American Cancer Society; 2016.
5. Henson D.E., Dittus C., Younes M. et al. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973–2000: increase in the signet ring cell type. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004; 128 (7): 765–770. DOI: 10.1043/1543-2165(2004)128<765:DTITIA>2.0.CO;2.
6. Nie R.C., Yuan S.Q., Li Y.F., Chen Y.M., Chen X.J., Zhu B.Y., Xu L.P., Zhou Z.W., Chen S., Chen Y.B. Clinicopathological characteristics and prognostic value of signet ring cells in gastric carcinoma: a meta-analysis. *Journal of Cancer*. 2017; 8 (17): 3396–3404. DOI: 10.7150/jca.21017.
7. Gatta G., Capocaccia R., Trama A., Martínez-García C.; RARECARE Working Group. The burden of rare cancers in Europe. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 686: 285–303. DOI: 10.1007/978-90-481-9485-8_17.
8. Prasad S., Gupta S.C., Tyagi A.K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*. 2017; 387: 95–105. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.042.
9. Policastro L.L., Ibañez I.L., Notcovich C., Duran H.A., Podhajcer O.L. The tumor microenvironment: characterization, redox considerations, and novel approaches for reactive oxygen species-targeted gene therapy. *Antiox. & Redox Sign.* 2013; 19: 854–895. DOI: 10.1089/ars.2011.4367.
10. Castaldo S.A., Freitas J.R., Conchinha N.V., Madureira P.A. The tumorigenic roles of the cellular redox regulatory systems. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015; Article ID 8413032. DOI: 10.1155/2016/8413032.
11. Andrisic L., Dudzika D., Barbasa C., Milkovic L., Grunec T., Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biology*. 2018; 14: 47–58. DOI: 10.1016/j.redox.2017.08.009.
12. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций. *Биохимия*. 2007; 72 (2): 158–175.
13. Dawane J.S., Pandit V.A. Understanding redox homeostasis and its role in cancer. *J. Clin. Diagnos. Res.* 2012; 6 (10): 1796–1802. DOI: 10.7860/JCDR/2012/4947.2654.

14. Mironczuk-Chodakowska I., Witkowska A.M., Zujko M.E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. 2018; 63 (1): 68–78. DOI: 10.1016/j.advms.2017.05.005.
15. Marí M., Morales A., Colell A., García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox. Signal.* 2009; 11 (11): 2685–2700. DOI: 10.1089/ARS.2009.2695.
16. Samuelsson M., Vainikka L., Öllinger K. Glutathione in the blood and cerebrospinal fluid: a study in healthy male volunteers. *Neuropeptides*. 2011; 45 (4): 287–292. DOI: 10.1016/j.npep.2011.05.004.
17. Lushchak V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*. 2012; 2012: 736837. DOI: 10.1155/2012/736837.
18. Сурикова Е.И., Горошинская И.А., Неродо Г.А., Франциянц Е.М., Малейко М.Л., Шалашная Е.В., Качесова П.С., Немашкалова Л.А., Леонова А.В. Активность редокс-регулирующих систем в опухоли и окружающих ее тканях при различных гистологических вариантах. *Биомедицинская химия*. 2016; 62 (2): 187–192. DOI: 10.18097/PBMC20166202187.
19. Франциянц Е.М., Орловская Л.А., Шалашная Е.В., Мусиенко Н.В., Анапаян В.Х. Изменения антиокислительного статуса крови больных неоперабельным раком желудка после проведения химиотерапии. *Вопросы онкологии*. 1999; 45 (6): 607–611.
20. Korn E.L., Troendle J.F., McShane L.M., Simon R. Controlling the number of false discoveries: application to high-dimensional genomic data. *Journal of Statistical Planning and Inference*. 2004; 124 (2): 379–398. DOI: 10.1016/S0378-3758(03)00211-8.
21. Wang D., Wang B., Wang R., Zhang Z., Lin Y., Huang G., Lin S., Jiang Y., Wang W., Wang L., Huang Q. High expression of EGFR predicts poor survival in patients with resected T3 stage gastric adenocarcinoma and promotes cancer cell survival. *Oncology Letters*. 2017; 13 (5): 3003–3013. DOI: 10.3892/ol.2017.5827.
22. Проскурнина Е.В. Методы оценки свободнорадикального гомеостаза крови: дис. ... д-ра мед. наук. М., 2018: 221.
23. Aquilano K., Baldelli S., Ciriolo M.R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* 2014; 5: 196. DOI: 10.3389/fphar.00196.
24. Alli J.A., Kehinde A.O., Kosoko A.M., Ademowo O.G. Oxidative stress and reduced vitamins C and E levels are associated with multi-drug resistant tuberculosis. *J. Tuberc. Res.* 2014; 2: 52–58. DOI: 10.4236/jtr.2014.21006.
25. Chatterjee A. Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity? *Nutrients*. 2013; 5 (2): 525–542. DOI: 10.3390/nu5020525.
26. Sentellas S., Morales-Ibanez O., Zanuy M., Albertí J.J. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicol. Vitr.* 2014; 28 (5): 1006–1015. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.04.017.
27. Сирота Т.В. Действие серосодержащих соединений на хиноидный процесс автоокисления адреналина; потенциальные нейропротекторы. *Биомедицинская химия*. 2019; 65 (4): 316–323. DOI: 10.18097/PBMC20196504316.

Вклад авторов

Горошинская И.А. – анализ и интерпретация полученных результатов и данных литературы, статистическая обработка результатов, написание и оформление статьи. Сурикова Е.И. – анализ клинических показателей больных для разделения их на группы, участие в подборе литературы. Франциянц Е.М. – окончательное утверждение для публикации рукописи. Нескубина И.В. – проведение определения показателей. Немашкалова Л.А. – подготовка тканей для исследования. Медведева Д.Е. – сбор материала для исследования и предоставление информации по больным. Маслов А.А. – диагностика, определение плана лечения больных, вошедших в исследование, проведение операций.

Сведения об авторах

Горошинская Ирина Александровна, д-р биол. наук, профессор, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0001-6265-8500.

Сурикова Екатерина Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-4318-7587.

Франциянц Елена Михайловна, д-р биол. наук, профессор, зам. генерального директора по науке, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-3618-6890.

Нескубина Ирина Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-7395-3086.

Немашкалова Людмила Анатольевна, науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-2713-8598.

Медведева Дарья Евгеньевна, врач-онколог, аспирант, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону.

Маслов Андрей Александрович, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения абдоминальной онкологии № 3, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-4902-5789.

(✉) **Горошинская Ирина Александровна**, e-mail: iagor17@mail.ru.

Поступила в редакцию 03.09.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Изменение вентиляционной функции легких в процессе формирования хронической обструктивной болезни легких и при ее сочетании с раком легкого

Добнер С.Ю.¹, Дубаков А.В.², Поровский Я.В.², Тузиков С.А.^{1,2}, Миллер С.В.¹, Родионов Е.О.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение вентиляционной функции легких у пациентов с различной степенью тяжести хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и при ее сочетании с раком легкого (РЛ), а также установление особенностей респираторных нарушений с помощью спирографии и бодиплетизмографии.

Материалы и методы. Проведено клинико-функциональное исследование 57 лиц (10 здоровых (группа контроля), 30 больных с ХОБЛ и 17 больных, у которых РЛ сочетался с ХОБЛ) при помощи диагностического комплекса Masterlab Pro (Erich Jaeger, Германия).

Результаты. При начальной стадии ХОБЛ наиболее информативно снижение максимального объема скорости на уровне 75% от форсированной жизненной емкости легких (MOC_{75}) – вентиляционного показателя, характеризующего проходимость мелких дыхательных путей. При прогрессировании бронхиальной обструкции отмечались как обструктивные, так и рестриктивные нарушения, характеризующиеся снижением объема форсированного выдоха за первую секунду, жизненной емкости легких, изменением структуры общей емкости легких в виде увеличения отношения остаточного объема легких к общей емкости легких и повышения бронхиального сопротивления. У пациентов, страдающих РЛ в сочетании с нетяжелой ХОБЛ, показатели вентиляции легких и бронхиальное сопротивление не отличались от пациентов с ХОБЛ, имеющих аналогичную степень бронхиальной обструкции. При РЛ в сочетании с более тяжелой ХОБЛ, в отличие от пациентов, страдающих аналогичной тяжестью ХОБЛ, установлено снижение проходимости бронхов крупного, среднего и мелкого диаметра (пиковая объемная скорость, MOC_{25} , MOC_{50} , MOC_{75}), свидетельствующее о развитии генерализованной бронхиальной обструкции.

Заключение. Современная диагностика нарушений вентиляции легких у больных РЛ в сочетании с ХОБЛ должна быть направлена на выявление, а медикаментозная терапия – на максимальное нивелирование обратимых компонентов бронхиальной обструкции с целью повышения функционального резерва системы дыхания и снижения риска послеоперационных осложнений, вызванных ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, рак легкого, вентиляционная функция легких, спирография, бодиплетизмография.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение исследования. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии, Томский НИМЦ (протокол № 10 от 26.09.2016).

✉ Добнер Светлана Юрьевна, e-mail: dobnersv@gmail.com.

Для цитирования: Добнер С.Ю., Дубаков А.В., Поровский Я.В., Тузиков С.А., Миллер С.В., Родионов Е.О. Изменение вентиляционной функции легких в процессе формирования хронической обструктивной болезни легких и при ее сочетании с раком легкого. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 61–66. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-61-66>.

Changes in the ventilation function of the lungs during the formation of chronic obstructive pulmonary disease and its combination with lung cancer

Dobner S.Yu.¹, Dubakov A.V.², Porovskiy Ya.V.², Tuzikov S.A.^{1,2}, Miller S.V.¹, Rodionov E.O.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of Russian Academy of Sciences 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

² Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the ventilation function of the lungs in patients with varying degrees of severity of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and in patients with COPD combined with lung cancer (LC), as well as to establish the features of its disorders using spirometry and body plethysmography.

Materials and methods. A clinical and functional study of 57 individuals was carried out with 10 healthy patients (control group), 30 patients with COPD and 17 patients in whom LC was combined with COPD using the Masterlab Pro diagnostic complex (Erich Jaeger, Germany).

Results. In patients with early COPD, a decrease in MEF_{75} (a ventilation parameter characterizing small airway patency) is the most informative. With the progression of bronchial obstruction, both restrictive and obstructive disorders, characterized by a decrease in FEV_1 , VC, a change in the structure of the total lung capacity in the form of an increase in the RV/TLC ratio such as an increase in the RV/TLC ratio and an increase in bronchial resistance were recorded. In patients with LC and mild COPD, pulmonary volumes, capacities, flow-volume loop and bronchial resistance parameters did not differ from patients with COPD with a similar bronchial obstruction. In patients with LC and more severe COPD, in contrast to patients suffering from a similar severity of COPD, a decrease in the patency of large, medium and small diameter bronchi (PEF , MEF_{25} , MEF_{50} , MEF_{75}) was detected, which indicated development of generalized bronchial obstruction.

Conclusion. Modern diagnostics of pulmonary ventilation disorders in patients with LC and COPD should be aimed at identifying the disease, and drug therapy should target maximum leveling of reversible components of bronchial obstruction in order to increase the functional reserve of the respiratory system and reduce the risk of postoperative complications caused by COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, lung cancer, pulmonary ventilation function, spirometry, bodyplethysmography.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors received no specific funding for this work.

Conformity to the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at Cancer Research Institute, TNRMC (Protocol No. 10 of 26.09.2016).

For citation: Dobner S.Yu., Dubakov A.V., Porovskiy Ya.V., Tuzikov S.A., Miller S.V., Rodionov E.O. Changes in the ventilation function of the lungs during the formation of chronic obstructive pulmonary disease and its combination with lung cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 61–66. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-61-66>.

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и рак легких (РЛ) обычно сосуществуют и представляют собой ряд клинических проблем [1–3]. При этом именно ХОБЛ чаще всего приводит к снижению функции внешнего дыхания и является фактором, определяющим частоту осложнений и риск летального исхода у ряда больных с РЛ [4, 5].

Диагноз ХОБЛ в значительной мере является функциональным. Характеристики вентиляционной функции легких (ВФЛ), а именно объем форсированного выдоха за первую секунду ($ОФВ_1$), жизненная емкость легких (ЖЕЛ), индекс Тиффно являются золотым стандартом диагностики ХОБЛ [1]. Однако часто в дебюте заболевания обструктивные нарушения, развивающиеся в дистальных отделах бронхиального дерева, более эффективно диагностируются с помощью показателей максимальной объемной скорости (МОС) воздушного потока форсированного выдоха и методом бодиплетизмографии [6, 7]. Бодиплетизмография дополнительно позволяет определить бронхиальное сопротивление (R_{aw}), диагностировать проявления гиперинфляции легких, которые используются в пульмонологии как достоверные признаки бронхообструкции и изменения эластических свойств легочной ткани [7, 8]. Выявление нарушений этих показателей помогает ранней диагностике ХОБЛ и более эффективной терапии данной распространенной патологии легких [7].

Ежегодно в России РЛ заболевают 63–65 тыс., а в мире – 1,04 млн человек, что составляет 12,8% от всех регистрируемых случаев новообразований [9]. Характерным для повседневной клинической практики является увеличение количества оперированных больных старших возрастных групп с высоким процентом послеоперационных осложнений [2, 4]. В ближайшем будущем предполагается дальнейшее увеличение демографического старения населения и количества больных с коморбидной патологией [10, 11].

В связи с этим понятен повышенный интерес к оценке ХОБЛ как фактора, который может привести к осложнениям в периоперационном периоде курации операбельных больных РЛ [4, 5]. Применение существующих эффективных методов диагностики нарушений ВФЛ у этого контингента больных – важная задача современных научных исследований.

Целью исследования явилось изучение ВФЛ у пациентов с различной степенью тяжести ХОБЛ и при сочетании у больных РЛ с ХОБЛ, а также выявление особенностей ее нарушений с помощью спирографии и бодиплетизмографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной цели проведено клинико-функциональное исследование 57 лиц – 10 здоровых (группа контроля), 30 больных с ХОБЛ и 17 больных, у которых РЛ сочетался с ХОБЛ. Выборку включенных в исследование лиц формировали из пациентов, находящихся на лечении в терапевтической клинике СибГМУ и отделении торакальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Среди больных ХОБЛ, по данным исследования ВФЛ, у восьми имелись клинические признаки бронхита и обструкции мелких дыхательных путей, но $ОФВ_1$ был в норме (группа 0). У остальных 22 больных диагностирована ХОБЛ согласно критериям по диагностике ХОБЛ [1]: в группе 1 (10 человек) – $ОФВ_1 \geq 80\%$ от должных значений, в группе 2 (12 человек) $ОФВ_1 < 80\%$, из них у семи больных – $50\% \leq ОФВ_1 < 80\%$ и у пяти – $30\% \leq ОФВ_1 < 50\%$ от должных значений. У шести больных с РЛ в сочетании с ХОБЛ $ОФВ_1 \geq 80\%$ от должных значений (группа 3), у остальных 11 (группа 4) $ОФВ_1$ составил $< 80\%$, из них у девяти – $50\% \leq ОФВ_1 < 80\%$ и у двух – $30\% \leq ОФВ_1 < 50\%$ от должных значений.

Оценку ВФЛ осуществляли на универсальной камере Masterlab Pro (Erich Jaeger, Германия). Исследование проводилось утром натощак в условиях относительного покоя в ортостатическом положении больного. Все пациенты исследованных групп не получали терапию бронхоактивными препаратами по поводу ХОБЛ. Методами спирографии и пневмотахографии анализировали минутный объем дыхания, ЖЕЛ, $ОФВ_1$, индекс Тиффно ($ОФВ_1/ЖЕЛ$), показатели кривой «поток – объем» (ПО) – пиковую объемную скорость (ПОС), максимальную объемную скорость в момент выдоха 25% от форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), максимальную объемную скорость в момент выдоха 50% ФЖЕЛ ($МОС_{50}$), максимальную объемную скорость в момент выдоха 75% ФЖЕЛ ($МОС_{75}$). С помощью бодиплетизмографии определяли структуру общей емкости легких (ОЕЛ): остаточный объем легких (ООЛ), отношение остаточного объема легких к общей емкости легких (ООЛ/ОЕЛ), а также бронхиальное сопротивление (R_{aw}).

Средний возраст исследованных лиц в группе контроля ($52,6 \pm 2,7$) года. У пациентов, страдающих ХОБЛ, группы 2 средний возраст составил ($59,7 \pm 3,0$) года, они старше пациентов группы 0 ($48,2 \pm 3,0$; $p = 0,01$) и группы 1 ($49,0 \pm 2,2$) года; $p = 0,02$). Средний возраст больных РЛ в сочетании с ХОБЛ в группе 3 составил ($56,7 \pm 2,0$) года, группе 4 – ($60,8 \pm 2,0$) года. Пациенты группы 3 были старше ($p = 0,03$) пациентов группы 1 с аналогичной степенью снижения $ОФВ_1$.

Верификацию ХОБЛ осуществляли путем сбора жалоб, анамнеза, физического исследования и анкетирования с помощью вопросника для диагностики ХОБЛ (шкалы САТ и mMRC) [1, 12]. В группы РЛ в сочетании с ХОБЛ (группы 3 и 4) включены больные с РЛ ПА–ПВ стадиями. В группу 3 включены шесть пациентов, из них II стадию имели три пациента, еще у трех диагностирована IIIA стадия. В группе 4 у трех пациентов выявлены ПА–В стадии немелкоклеточного рака легкого, у семи пациентов – IIIA стадия и у одного – ПВ. Центральный РЛ был выявлен у 12 (70,6%), периферический РЛ – у 5 (29,4%).

Критерии включения: табакокурение, отсутствие другой патологии легких и тяжелой соматической патологии, которые могли повлиять на показатели функции внешнего дыхания на момент включения в исследование, отсутствие регулярной базовой и симптоматической терапии по поводу ХОБЛ, согласие на участие в исследовании.

Статистическую обработку полученного материала осуществляли на персональном компьютере с использованием пакета статистических программ Statistica 10. Использовали методы вариационной статистики, данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей Me ($LQ;UQ$). Статистическая значимость различий средних значений признаков между группами оценивалась с помощью непараметрического теста Манна – Уитни для независимых выборок. Достоверными считали результаты при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе параметров ВФЛ, представленных в таблице, установлено, что у больных ХОБЛ в группе 0 бронхиальная проходимость на уровне MOC_{75} была в среднем ниже относительно группы контроля, при отсутствии различий в ОФВ₁, а также других скоростных и объемных характеристик вентиляции. В группе 1 наблюдалось снижение средних показателей ОФВ₁, индекса Тиффно, ЖЕЛ, кривой ПО (ПОС, MOC_{25} , MOC_{50} , MOC_{75}) относительно средних показателей лиц контрольной группы и снижение ОФВ₁, MOC_{25} , MOC_{50} , MOC_{75} при увеличении ООЛ, ООЛ/ОЕЛ относительно группы 0. У пациентов группы 2 при нарастании обструкции дополнительно выявлялось снижение ЖЕЛ, повышение ООЛ, ООЛ/ОЕЛ относительно пациентов группы 0, а также выраженной тенденции (85,2%) к повышению ООЛ/ОЕЛ относительно группы 1.

Выявленная у пациентов с ХОБЛ перестройка в структуре ОЕЛ в виде увеличения ООЛ/ОЕЛ при прогрессирующем снижении ОФВ₁ свидетельствовала о развитии легочной гиперинфляции – форми-

ровании «воздушных ловушек», повышении объемов легких в конце спонтанного выдоха по механизму клапанной обструкции на уровне малых дыхательных путей [7, 13, 14]. Установлено, что легочная гипервентиляция приводит к неблагоприятным функциональным последствиям – слабости дыхательных мышц, ограничению нарастания дыхательного объема во время физической нагрузки, созданию внутреннего положительного давления в конце выдоха, альвеолярной гиповентиляции [8, 14].

Величина Raw у больных ХОБЛ в группах 0 и 1 была в диапазоне референсных значений и не отличалась от показателя лиц контрольной группы (таблица). Напротив, в группе 2 Raw составило в среднем 153,6% и было статистически значимо выше у лиц контрольной группы и пациентов групп 0 и 1.

При анализе показателей ВФЛ пациентов, страдающих РЛ в сочетании с ХОБЛ, представленных в таблице, установлено, что при I степени обструкции (группа 3) легочные объемы и емкости не отличаются в среднем от характеристик больных ХОБЛ группы 1 с аналогичной степенью снижения ОФВ₁. При сравнении ВФЛ пациентов РЛ в сочетании с ХОБЛ группы 4 и пациентов ХОБЛ с аналогичной степенью снижения ОФВ₁ (группа 2) исследованные легочные объемы и емкости не отличались, однако у больных группы 4 снижены показатели ПО – ПОС, MOC_{25} , MOC_{50} , MOC_{75} , что свидетельствовало о распространенной, генерализованной обструкции. При этом между анализируемыми группами отсутствовали отличия в величине бронхиального сопротивления.

Можно полагать, что в данном случае локальное сужение или полное закрытие просвета бронха (дистелектаз, ателектаз) новообразованием, ограниченным по протяженности, приводит к нарушению вентиляции участка легочной ткани. Рефлекс Эйлера – Лильестранда при этом ограничивает кровоток через гиповентилируемый участок, препятствуя тем самым шунтированию венозной крови, а непораженные отделы легких способны компенсировать выпадение вентиляции.

Несмотря на достигнутые положительные результаты в технике оперативного лечения РЛ в сочетании с ХОБЛ, конечные эффекты лечения остаются не вполне удовлетворительными, в первую очередь в связи со значительным количеством послеоперационных осложнений, обусловленных ХОБЛ [15].

Исследованиями установлено, что курение табака, в меньшей степени воздействие других патогенных частиц или газов являются основным фактором риска развития ХОБЛ. Они вызывают воспалительный процесс в легких, который, прогрессируя, ведет к характерным патофизиологическим рас-

стройству: гиперсекреции слизи и цилиарной дисфункции, ограничению скорости воздушного потока и гиперинфляции, легочной гипертензии и системным эффектам, формируя обратимые и необратимые компоненты бронхиальной обструкции [6].

Можно ожидать, что современная функциональная диагностика и эффективная медикаментозная терапия обратимого компонента бронхиальной обструкции откроют перспективы в улучшении периоперационных результатов у больных РЛ в сочетании с ХОБЛ.

Таблица

Показатели ВФЛ в группе контроля, у пациентов с ХОБЛ и имеющих РЛ в сочетании с ХОБЛ, Me (LQ;UQ)											
Показатель	Контроль (n = 10)	ХОБЛ			ХОБЛ + РЛ		p				
		0 (n = 8)	1 (n = 10)	2 (n = 12)	3 (n = 6)	4 (n = 11)	0-К	1-К 1-0	2-К 2-0 2-1	3-К 3-0 3-1	4-2 4-3
ЖЕЛ	117,6 (107,7;129,6)	106,4 (98,5;112,5)	104,2 (97,0;108,7)	93,3 (87,6;100,3)	106,9 (106,2;108,7)	91,8 (85,7;93,1)	0,062	0,023 0,824	<0,001 0,037 0,013	0,074 0,846 0,415	0,406 0,001
ОФВ ₁	109,1 (102,0;117,0)	107,8 (104,3;117,7)	94,5 (85,7;104,0)	44,4 (38,0;65,3)	91,5 (86,9;98,2)	73,9 (65,9;80,9)	1,0	0,013 0,037	<0,001 <0,001 <0,001	0,004 0,008 0,745	0,056 <0,001
ПОС	127,3 (113,7;145,2)	127,4 (106,2;145,7)	105,1 (94,1;116,8)	44,6 (40,6;74,3)	106,7 (97,5;115,0)	78,4 (55,5;101,8)	0,859	0,028 0,051	<0,001 <0,001 <0,001	0,057 0,175 0,828	0,023 0,087
МОС ₂₅	122,1 (100,0;141,6)	123,3 (101,2;142,2)	77,6 (65,2;86,7)	15,4 (11,7;34,3)	60,4 (50,9;75,8)	37,6 (31,3;72,5)	0,657	0,003 0,001	<0,001 <0,001 <0,001	0,003 0,002 0,158	0,031 0,070
МОС ₅₀	83,9 (76,0;102,6)	95,7 (80,1;110,6)	47,2 (39,2;57,3)	11,5 (7,5;17,1)	54,1 (46,7;66,2)	36,6 (24,1;46,9)	0,656	<0,001 0,001	<0,001 <0,001 <0,001	0,003 0,012 0,278	0,018 0,035
МОС ₇₅	85,0 (60,8;110,6)	50,0 (35,6;62,4)	25,9 (21,9;37,1)	9,2 (5,6;19,8)	37,9 (30,7;44,6)	26,4 (14,0;33,4)	0,033	0,007 <0,001	<0,001 <0,001 <0,001	0,004 0,272 0,083	0,006 0,009
ООЛ	99,7 (93,1;110,0)	79,2 (63,7;102,3)	105,2 (92,8;129,9)	141,3 (132,1;150,5)	127,0 (92,5;136,4)	120,8 (110,2;142,2)	0,083	0,496 0,045	0,003 0,001 0,044	0,175 0,045 0,405	0,218 0,763
ООЛ/ ОЕЛ	90,5 (87,3;94,6)	74,6 (70,6;95,5)	104,6 (83,7;120,0)	121,6 (115,1;130,6)	102,1 (81,1;105,4)	116,4 (107,1;124,1)	0,109	0,121 0,016	0,001 <0,001 0,056	0,481 0,272 0,329	0,295 0,003
Raw	73,7 (42,7;94,0)	67,1 (51,5;80,2)	65,3 (52,3;126,0)	139,5 (101,9;197,8)	98,3 (86,4;119,2)	132,4 (94,5;174,4)	0,859	0,405 0,789	0,002 0,004 0,011	0,074 0,081 0,447	0,622 0,269

Примечание. К – группа контроля.

ВЫВОДЫ

1. В группе пациентов с начальной ХОБЛ наиболее информативно снижение МОС₇₅ – вентиляционного показателя, характеризующего проходимость мелких дыхательных путей. При прогрессировании бронхиальной обструкции развиваются обструктивные и рестриктивные нарушения, характеризующиеся снижением ОФВ₁, ЖЕЛ, изменением структуры общей емкости легких в виде увеличения ООЛ/ОЕЛ, свидетельствующие о развитии легочной гиперинфляции. Установлено, что большая степень обструктивных нарушений приводит к повышению бронхиального сопротивления.

2. У пациентов, страдающих РЛ в сочетании с тяжелой ХОБЛ, легочные объемы, емкости, пока-

затели ПО и бронхиального сопротивления не отличались от пациентов ХОБЛ с аналогичной степенью бронхиальной обструкции.

3. При РЛ в сочетании с ХОБЛ с большей степенью обструктивных нарушений в отличие от страдающих ХОБЛ такой же степени снижения ОФВ₁ установлено развитие генерализованной бронхиальной обструкции на уровне бронхов крупного, среднего и мелкого диаметра (ПОС, МОС₂₅, МОС₅₀, МОС₇₅), при отсутствии различий в статических и динамических легочных объемах, и величине бронхиального сопротивления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Лещенко И.В., Мещерякова Н.Н., Овчаренко С.И., Шме-

- лев Е.И. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2014; 3: 15–36.
2. Dai J., Yang P., Cox A., Jiang G. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: From a clinical perspective. *Oncotarget*. 2017; 8 (11): 18513–18524. DOI: 10.18632/oncotarget.14505.
3. Миллер Д.С., Пашковская Д.В., Поровский Я.В., Родионов Е.О., Миллер С.В., Тузиков С.А. Ранние клинические симптомы рака легкого в практике врача. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7 (2): 240–246. DOI: 10.23888/HMJ201972240-246.
4. Винник Ю.А., Гаврилов А.Ю. Особенности развития и профилактика осложнений плановой пульмонэктомии у больных раком легких в зависимости от функционального состояния респираторной системы. *Украинский журнал хирургии*. 2012; 3 (18): 12–16.
5. Kim E.S., Kim Y.T., Kang C.H., Park I.K., Bae W., Choi S.M., Lee J., Park Y.S., Lee C.H., Lee S.M., Yim J.J., Kim Y.W., Han S.K. Prevalence of and risk factors for postoperative pulmonary complications after lung cancer surgery in patients with early-stage COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2016; 11: 1317–1326. DOI: 10.2147/COPD.S105206.
6. Шустов С.Б., Куренкова И.Г., Харитонов М.А., Асямов К.В. Нарушения функции внешнего дыхания при различных формах легочной патологии. *Пульмонология*. 2017; 27 (3): 410–418. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-3-410-418.
7. Савушкина О.И., Черняк А.В. Клиническое применение метода бодиплетизмографии. *Практическая пульмонология*. 2013; 2: 38–41.
8. Авдеев С.Н. Легочная гиперинфляция у больных ХОБЛ. *Consilium medicum*. 2006; 8 (3): 75–80.
9. Давыдов М.И., Петровский А.В. Онкология. Клинические рекомендации. М.: Ассоциация онкологов России, 2018: 976.
10. Чаулин А.М., Дупляков Д.В. Сердечно-сосудистые заболевания и хроническая обструктивная болезнь легких: этиопатогенетическая взаимосвязь и клиническое значение (обзор литературы). *Сибирский медицинский журнал*. 2020; 35 (2): 26–34. DOI: 10.29001/2073-8552-2020-35-2-26-34.
11. Поровский Я.В., Тетенов Ф.Ф. Коморбидность во врачебной практике. *Сибирское медицинское обозрение*. 2015; 4 (92): 5–10.
12. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (updated 2019). URL: <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/11/GOLD-2020-REPORT-ver1.1wms.pdf>.
13. Тетенов К.Ф., Тетенов Ф.Ф., Агеева Т.С., Бодрова Т.Н., Карзилов А.И., Месько П.Е. Механизмы противодействия клапанной обструкции бронхов при обструктивной эмфиземе легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2015; 14 (4): 75–81. DOI: 10.20538/1682-0363-2015-4-75-81.
14. Авдеев С.Н. Неинвазивная вентиляция легких у больных ХОБЛ, госпитализированных в стационар. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (2): 6–19. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-2-6-19.
15. Котив Б.Н., Дзидзава И.И., Попов В.А., Кузнецов И.М. Хирургическое лечение рака легкого у пациентов с низкими функциональными резервами системы дыхания и кровообращения. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2016; 2 (54): 241–246.

Вклад авторов

Добнер С.Ю., Поровский Я.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Тузиков С.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Дубаков А.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Миллер С.В., Родионов Е.О. – анализ и интерпретация данных.

Сведения об авторах

Добнер Светлана Юрьевна, врач-терапевт, кардиолог, врач функциональной диагностики, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0338-3786.

Дубаков Алексей Владимирович, канд. мед. наук, врач, отделение функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Поровский Ярослав Витальевич, д-р мед. наук, профессор, кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-3378-0608.

Тузиков Сергей Александрович, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения торакальной онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; профессор, кафедра онкологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0884-1838.

Миллер Сергей Викторович, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение торакальной онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-5365-9840.

Родионов Евгений Олегович, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение торакальной онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; ассистент, кафедра онкологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-4980-8986.

(✉) Добнер Светлана Юрьевна, e-mail: dobnersv@gmail.com.

Поступила в редакцию 23.12.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Параметры глутатионовой системы и тиоредоксина в плазме крови и асците и полиморфизм гена *GSTP1* Ile105Val как факторы резистентности к платиносодержащей химиотерапии у больных раком яичников

Долгова Д.Р.¹, Генинг Т.П.¹, Абакумова Т.В.¹, Генинг С.О.^{1,2}, Антонеева И.И.^{1,2}, Федотова А.Ю.¹

¹ Ульяновский государственный университет (УлГУ)
Россия, 432017, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42

² Областной клинический онкологический диспансер (ОКОД)
Россия, 432017, г. Ульяновск, ул. 12 Сентября, 90

РЕЗЮМЕ

Введение. Химиотерапия является одним из основных видов лечения распространенного рака яичников (РЯ). У каждой пятой пациентки развивается химиорезистентность после платиносодержащей терапии первой линии. Система детоксикации глутатиона играет важную роль в утилизации платиновых препаратов из опухолевых клеток.

Цель. Оценить окислительно-восстановительный статус плазмы крови и асцитической жидкости у больных РЯ до и после неoadъювантной платиносодержащей химиотерапии (НАХТ).

Материалы и методы. Мы определили активность глутатионовой системы и уровень тиоредоксина в плазме крови до и после НАХТ и в асцитической жидкости до НАХТ у 30 пациентов на III–IV стадиях (по FIGO) рака яичников. Пациенты были разделены на три группы: БР – без рецидивов в течение 2 лет после завершения химиотерапии; P1 – рецидив заболевания в течение 6 мес после завершения химиотерапии первой линии; P2 – рецидив после 6 мес от момента завершения химиотерапии первой линии.

Результаты. Установлено увеличение активности GT и снижение уровня GSH в плазме после химиотерапии у пациентов с P1, а также противоположная динамика GT и GSH в группе P2. Уровень тиоредоксина в плазме у всех пациентов был ниже, чем в контрольной группе; различия в уровнях между группами не были статистически значимыми. Аллельный вариант 105Val гена *GSTP1* выявлялся с более высокой частотой у пациентов с РЯ, чем в контроле, и чаще в группе P2, чем у P1.

Заключение. Повышение активности GST и GR в плазме больных РЯ может быть прогностическим маркером раннего рецидива. Динамика тиоредоксина не коррелирует с ответом на химиотерапию. Присутствие аллеля 105Val в гене *GSTP1* является фактором риска развития рака яичников, но защитным фактором против раннего рецидива.

Ключевые слова: рак яичников, асцитическая жидкость, химиорезистентность, глутатионовая система, полиморфизм гена *GSTP1*.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-3196.2018.7).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Института медицины, экологии и физической культуры УлГУ (протокол № 9 от 15.09.2015). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Долгова Динара Ришатовна, e-mail: dolgova.dinara@yandex.ru.

Для цитирования: Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Генинг С.О., Антонеева И.И., Федотова А.Ю. Параметры глутатионовой системы и тиоредоксина в плазме крови и асците и полиморфизм гена *GSTP1* Ile105Val как факторы резистентности к платиносодержащей химиотерапии у больных раком яичников. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 67–72. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-67-72>.

Parameters of the glutathione system and thioredoxin in blood plasma and ascites and *GSTP1* Ile105Val gene polymorphism as factors of resistance to platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer patients

Dolgova D.R.¹, Gening T.P.¹, Abakumova T.V.¹, Gening S.O.^{1, 2}, Antoneeva I.I.^{1, 2}, Fedotova A.Yu.¹

¹*Ulyanovsk State University*

42, Lva Tolstogo Str., Ulyanovsk, 432017, Russian Federation

²*Regional Clinical Oncologic Center*

90, 12 Sentyabrya Str., Ulyanovsk, 432017, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Chemotherapy is one of the main types of treatment in ovarian cancer. Standard first-line treatment includes platinum drugs. Every fifth patient develops chemoresistance after platinum-containing first line therapy. Glutathione detoxification systems play an important role in platinum drugs utilization.

Purpose. To assess the redox status of blood plasma and ascitic fluid in ovarian cancer patients before and after neoadjuvant platinum-containing chemotherapy (NACT).

Materials and methods. We determined the activity of the glutathione system and thioredoxin levels in blood plasma before and after NACT and in the ascitic fluid before NACT, and the presence of *GSTP1* gene polymorphism (Ile105Val (rs1695), Ala114Val (rs1138272)) in 30 III–IV FIGO stage ovarian cancer patients. Patients were divided into 3 groups: NR – no relapse in 2 years after last chemotherapy course; R1 – relapse in less than 6 months; R2 – relapse in more than 6 months.

Results. We established an increase of the glutathione-transferase activity and a decrease of the GSH level in plasma after chemotherapy in R1 patients, and an opposite dynamic of glutathione-transferase and GSH in the R2 group. Thioredoxin level in plasma of all patients was lower than in the control group; differences in levels between groups were not statistically significant. *GSTP1* 105Val allele was more frequently present in patients than in the control group, and more frequently in R2 than in R1.

Conclusion. The increase in plasma glutathione-transferase and glutathione-reductase levels can be a prognostic marker of early relapse. Thioredoxine dynamics do not correlate with the chemotherapy response. The presence of the *GSTP1* 105Val allele is a risk factor for ovarian cancer development, but a protective factor against early relapse.

Key words: ovarian cancer, ascites, chemoresistance, glutathione system, *GSTP1* gene polymorphism.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation (MK-3196.2018.7).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee of the Institute of Medicine, Ecology and Physical Education of the UISU (Protocol No. 9 of 15.09.2015). All patients signed informed consent.

For citation: Dolgova D.R., Gening T.P., Abakumova T.V., Gening S.O., Antoneeva I.I., Fedotova A.Yu. Parameters of the glutathione system and thioredoxin in blood plasma and ascites and *GSTP1* Ile105Val gene polymorphism as factors of resistance to platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 67–72. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-67-72>.

ВВЕДЕНИЕ

В основе формирования фенотипа опухолевых клеток, резистентного к платиносодержащей химиотерапии (ХТ) при раке яичников (РЯ), лежит в том числе и повышенная активность системы глутатиона. Инактивация цисплатина возможна при связывании с SH-группами глутатиона, причем нейтрализующий эффект прежде всего реализуется глутатион-S-трансферазами (GST) [1]. Показана высокая активность GST в цитозоле платинорезистентных клеток по сравнению с исходными платиночувствительными клеточными линиями SKOV3 и SGC7901, причем ингибирование фермента GSTP увеличило в 4 раза цитотоксичность препаратов платины [2].

Считается, что GST участвует в развитии лекарственной устойчивости с помощью прямого детоксицирующего действия, а также как ингибитор MAP-киназного пути. Установлена роль GST в реализации ответа опухоли на платиносодержащую ХТ при РЯ [3]. При этом увеличение активности GST в асците больных с РЯ коррелирует с низкой чувствительностью к препаратам платины и риском рецидивирования. Экспрессия генов глутатион-зависимых ферментов отражает адаптивный антиоксидантный потенциал организма-опухоленосителя и может служить фактором формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток [4].

Данные литературы относительно тиоловых детоксикационных систем в клетке, представленных тиоредоксином (Trx) и глутаредоксином – регуляторов окислительно-восстановительного потенциала, клеточной пролиферации, репарации ДНК, немногочисленны. Обсуждается роль тиоредоксина в формировании резистентности к доксорубину и цисплатину за счет повышения устойчивости к окислительному стрессу, ингибирования апоптоза через протеинкиназы ASK1 и JNK1 [5].

Цель исследования – изучить параметры глутатионовой системы и тиоредоксина в плазме крови и асците и полиморфизм гена *GSTP1* Ile105Val в качестве факторов химиорезистентности у больных распространенным раком яичников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Больным ($n = 30$, возраст 62 (45–65) года) с верифицированным асцитным РЯ (общее состояние по ECOG 0–2, ожидаемая продолжительность жизни не менее 6 мес), получавшим неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) по схеме AP (цисплатин 75 мг/м² и доксорубин 40 мг/м² внутривенно в 1-й день каждые 3 нед) в объеме 2–4 курсов, в последующем была выполнена циторедуктивная операция и адьювантная ХТ. Асцит для анализа отбирали до начала

ХТ. Безклеточную фракцию отбирали после центрифугирования при 1 500 об./мин в течение 10 мин. При динамическом наблюдении все больные были разделены на группы: БР – без рецидива; Р1 – ранний рецидив, безрецидивный период до 6 мес; Р2 – поздний рецидив, безрецидивный период от 6 до 12 мес.

В плазме и асцитической жидкости (АЖ) больных РЯ до начала лечения и после НАХТ определяли активность компонентов глутатионовой системы: GST, глутатион-редуктазы (GR), глутатион-пероксидазы (GPO), уровень восстановленного глутатиона (GSH) [6, 7]; уровень Trx методом иммуноферментного анализа (Cloud Clone Corp., США). Геномную ДНК для анализа полиморфизмов гена *GSTP1* Ile105Val (rs1695), Ala114Val (rs1138272) выделяли набором «ДНК-экспресс-кровь» (Литех, г. Москва, Россия). Генотипирование образцов проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени с Taq-Man зондами (Синтол, г. Москва, Россия). Контрольную группу составили 20 практически здоровых женщин в возрасте 52 (45–58) лет. Количественные данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля $Me (Q_1-Q_3)$. Ввиду отсутствия нормального распределения в группах для описания статистических различий использовался непараметрический критерий Краскела – Уоллиса (значимыми различия считали при $p \leq 0,05$). Частоты генотипов полиморфизма гена *GSTP1* Ile105Val, а также соответствие распределения наблюдаемых частот генотипов теоретически ожидаемым по равновесию Харди – Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Для оценки относительного риска развития заболевания/события вычисляли значение отношения шансов (ОШ) и 95%-е доверительные интервалы (95%-е ДИ) с помощью онлайн-калькулятора в исследованиях «случай – контроль» (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 13.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность GST статистически значимо различается в группах больных РЯ в зависимости от времени наступления рецидива заболевания. Активность GST в плазме у пациентов группы Р1 как до, так и после НАХТ в несколько раз превышала значения активности фермента в контроле и в группах Р2 и БР (рис. 1, а). Данная динамика сохраняется и в АЖ: раннее наступление рецидива связано с высокой активностью фермента до начала ХТ (рис. 1, б). Можно предположить, что высокий детоксикационный потенциал GST наряду с уменьшением свободного GSH, направленные на конъюгирование цитоста-

тика, снижают эффективность платиносодержащей НАХТ. После НАХТ активность фермента во всех изученных группах незначительно снижается, оставаясь повышенной в группе P1. Снижение активности GST в плазме после НАХТ положительно коррелирует с длительностью безрецидивного периода.

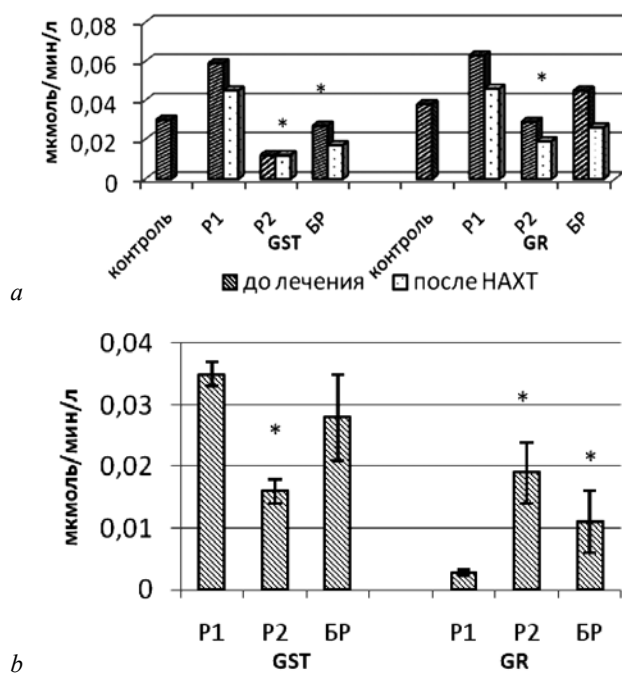


Рис. 1. Уровень GST и GR в плазме крови (a) и асцитической жидкости (b) в зависимости от длительности безрецидивного периода: *данные статистически значимо отличаются от аналогичных в группе P1

Главной функцией GR является поддержание восстановленной формы глутатиона, конъюгирующего с экзогенными токсинами. Изменение активности GR в плазме больных РЯ сходно с динамикой GST в плазме (см. рис. 1, a), что позволяет предположить снижение ферментативного восстановления GSSG после НАХТ.

В плазме крови в группе P1 выявлены наиболее низкие значения GSH по сравнению с остальными исследованными группами (таблица). В группе БР наблюдаются низкие значения GSH в плазме до начала НАХТ, и резкое повышение (в 3,5 раза) – после НАХТ, что, возможно, отражает повышение антиоксидантного статуса организма и, вероятно, может выступать положительным фактором, препятствующим формированию лекарственной устойчивости при применении доксорубина и цисплатина.

Активность GPO, утилизирующей перекись водорода, в плазме крови во всех группах ниже контроля и значимо не различается (см. таблицу).

Анализ асцита позволяет обнаружить дополнительные факторы для уточнения молекулярно-биологического «портрета» опухоли яичников [8]. Нами установлено, что в группе P1 фиксируются наиболее низкие значения GSH в АЖ, максимальный уровень – в группе P2 (см. таблицу). Таким образом, маркерами ранних рецидивов могут быть повышение GST и снижение GSH в плазме после НАХТ. Напротив, низкая активность GST и высокий уровень GSH в плазме и в асците имеют место в группе пациенток БР.

Таблица

Уровень GSH и GPO в плазме и асцитической жидкости у больных распространенным раком яичников до и после НАХТ, Me (Q_1 – Q_3)						
Параметр	GSH, ммоль/л			GPO, мкмоль/мин/л		
	P1, n = 12	P2, n = 8	БР, n = 10	P1, n = 12	P2, n = 8	БР, n = 10
Плазма первичных больных	19,72 (15,64–22,44)	72,8 (54,0–95,5) $p = 0,00005$	25,16 (23,8–30,2) $p = 0,003$	9,075 (3,675–11,835)	7,905 (4,372–12,278) $p = 0,653$	11,048 (10,83–11,67) $p = 0,101$
Плазма больных после проведения курсов НАХТ	28,9 (14,96–44,4)	47,5 (27,3–74,45) $p = 0,219$	105,5 (53,16–121,00) $p = 0,0006$	10,477 (10,41–11,07)	10,695 (6,405–17,10) $p = 0,477$	8,28 (8,1–9,24) $p = 0,619$
Асцитическая жидкость больных раком яичников до начала лечения	19,72 (17–27,2)	101 (93–112,5) $p = 0,003$	32 (20,4–98,5) $p = 0,160$	19,2 (12,3–30,3)	7,073 (4,22–9,82) $p = 0,037$	19,83 (15,75–25,62) $p = 0,802$
Контроль	80,72 (76,5–82,3)			52,01 (50,5–54,0)		

Обсуждается роль Тгх в механизмах противоопухолевой лекарственной устойчивости, однако данное влияние является тканеспецифичным и зависит от микроокружения [9]. Нами установлено, что уровень Тгх в плазме крови, сниженный во всех группах по сравнению с контролем, значимо не отличался до и после платиносодержащей ХТ (рис. 2).

Известно, что чувствительность опухоли к цисплатину определяется активностью ферментов детоксикации, к которым относится GST, и зависит от полиморфизма генов [10]. При сравнении двух групп – больных РЯ и контроля – установлено, что наличие в генотипе функционально ослабленного аллеля GSTP1 (генотип Ile/Val или Val/Val) является фак-

тором риска возникновения РЯ (ОШ = 1,82; 95%-й ДИ 1,1–2,8; $p = 0,035$). В случае второго SNP – Ala114Val – показано, что аллель GSTP1114Val, связанный со снижением функциональной активности фермента, также чаще встречается в выборке

больных РЯ по сравнению с контролем (19% против 5,5%; ОШ = 3,20; 95%-й ДИ 1,5–6,8; $p = 0,023$). Выявлено, что в группе P1 по сравнению с пациентами группы P2 чаще встречается генотип Ile/Ile GSTP1 (ОШ = 4,30; 95%-й ДИ 1,25–14,81; $p = 0,034$).

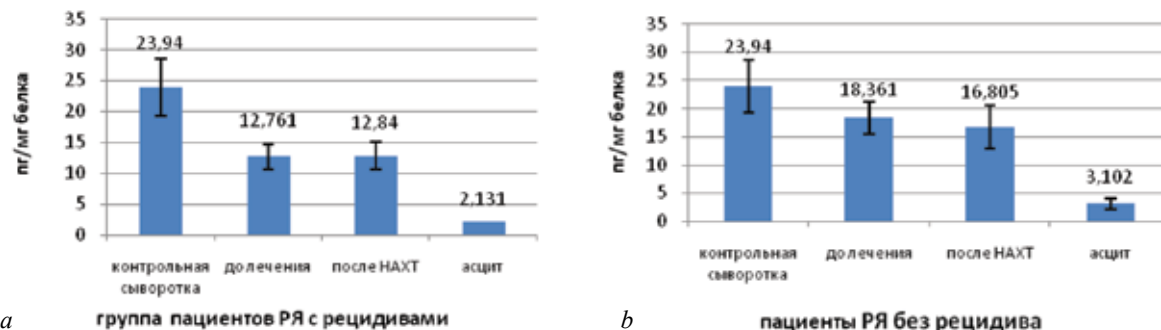


Рис. 2. Уровень тиоредоксина в сыворотке и асцитической жидкости больных раком яичника до и после НАХТ с ранним и поздним рецидивом (а) и без рецидива (б)

ОБСУЖДЕНИЕ

Канцерогенез яичников провоцирует прооксидантное состояние как в опухоли, так и нормальных тканях, а последующая химиотерапия усугубляет это состояние. На поздних стадиях РЯ возникает истощение антиоксидантных ресурсов. При этом система глутатиона в плазме крови может переходить на более высокий уровень функционирования и обеспечивает защиту макромолекул от активных форм кислорода. Данная ситуация в нашем исследовании наблюдается в группе пациентов с длительным безрецидивным периодом. Напротив, при снижении уровня антиоксидантных белков создаются условия для выживания и метастазирования опухоли.

Так, значимо более низкие значения уровня GSH и Trx в плазме наблюдаются в группе пациентов РЯ с рецидивами. Показано, что глутатионовая система играет двойственную роль в процессе канцерогенеза [11]. С одной стороны, ее низкая активность способствует нарушению инактивации канцерогенов. Снижение концентрации GSH и GSH-зависимых ферментов в плазме и асците наблюдается при прогрессировании опухоли. Ранее в эксперименте мы установили тенденцию к снижению перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в асците при прогрессировании РЯ [12]. С другой стороны, белки GSH и Trx в опухоли снижают цитотоксический эффект цисплатина, низкие уровни Trx в цитоплазме клеток РЯ ассоциированы с повышением выживаемости без прогрессирования [13]. Наблюдаемая нами динамика Trx в плазме и асците больных РЯ свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения роли данного редокс-бел-

ка в формировании опухолевых клонов с высоким антиоксидантным статусом.

Согласно данным литературы, активность GSTP различается в зависимости от субстрата: аллель GSTP1105Val снижает общую выживаемость у больных РЯ, получавших платиносодержащую химиотерапию [14]. Таким образом, можно предположить, что гиперэкспрессия гена *GSTP* определяет резистентность опухолевых клеток РЯ к платиносодержащей ХТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, платиносодержащая НАХТ оказывает существенное влияние на функциональное состояние глутатионовой системы в плазме больных с РЯ. Так, для пациенток группы P1 характерно снижение уровня GSH и Trx, повышение активности GST и GR в плазме после НАХТ. Напротив, у больных группы BP наблюдается повышение антиоксидантного статуса плазмы за счет уровня GSH и тиоредоксина на фоне сниженной активности GST. В целом система глутатиона и глутатион-зависимых ферментов плазмы крови при канцерогенезе яичников динамично изменяет свой профиль и может быть рекомендована для оценки индивидуальной чувствительности на платиносодержащую химиотерапию как прогностический маркер ранних рецидивов. Присутствие аллеля Ile105Val в гене *GSTP1* является не только фактором риска развития РЯ, но защитным фактором против раннего рецидива.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siddik Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22 (47): 7265–7279. DOI: 10.1038/sj.onc.1206933.

2. Zou M., Hu X., Xu B., Tong T., Jing Y., Xi L., Zhou W., Lu J., Wang X., Yang X., Liao F. Glutathione S-transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer. *Oncol. Rep.* 2019; 41 (2): 989–998. DOI: 10.3892/or.2018.6861.
3. Boss E.A., Peters W.H., Roelofs H.M., Boonstra H., Steegers E.A., Massuger L.F. Glutathione-S-transferases P1-1 and A1-1 in ovarian cystfluids. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2001; 22 (6): 427–432.
4. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н., Котова Я.М., Ремизов В.И., Щербак Н.П. Экспрессия генов редокс-зависимых изоформ глутатион-S-трансферазы GSTP1-1 и STA4-4 при развитии резистентности опухолевых клеток к доксорубину. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2007; 143 (3): 298–301.
5. Kalinina E., Chernov N., Novichkova M., Nurmuradov N. Thioredoxins, glutaredoxins and peroxiredoxins in redox-dependent formation of cancer cell resistance. *Free Radical Biology and Medicine.* 2017; 108 (S1): 34–35.
6. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249 (22): 7130–7139.
7. Мальцев Г.Ю., Тышко Н.В. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионредуктазы эритроцитов. *Гигиена и санитария.* 2002; 2: 67–69.
8. Виллерт А.Б., Коломиец Л.А., Юнусова Н.В., Иванова А.А. Асцит как предмет исследований при раке яичников. *Сибирский онкологический журнал.* 2019; 18 (1): 116–123. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-116-123.
9. Pontikakis S., Papadaki C., Tzardi M., Trypaki M., Sfakianaki M., Koinis F., Lagoudaki E., Giannikaki L., Kalykaki A., Kontopodis E., Saridaki Z., Malamos N., Georgoulas V., Souglakos J. Predictive value of *ATP7b*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PARP1*, *UIMC1* (*RAP80*), *HOXA9*, *DAXX*, *TXN* (*TRX1*), *THBS1* (*TSP1*) and *PRR13* (*TXR1*) genes in patients with epithelial ovarian cancer who received platinum-taxane first-line therapy. *Pharmacogenomics J.* 2017; 17 (6): 506–514. DOI: 10.1038/tpj.2016.63.
10. Woolston C.M., Deen S., Al-Attar A., Shehata M., Chan S.Y., Martin S.G. Redox protein expression predicts progression-free and overall survival in ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49 (8): 1263–1272. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.008.
11. Nunes S.C., Serpa J. Glutathione in ovarian cancer: a double-edged sword. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (7): 1882. DOI: 10.3390/ijms19071882.
12. Абакумова Т.В., Долгова Д.Р., Генинг С.О., Генинг Т.П., Антонеева И.И. Прогностическая роль параметров редокс-системы асцитической жидкости у больных распространенным раком яичников. *Ульяновский медико-биологический журнал.* 2018; (3): 80–86. DOI: 10.23648/UMBJ.2018.31.17218.
13. Greenwood H.E., McCormick P.N., Gendron T., Glaser M., Pereira R., Maddocks O.D.K., Sander K., Zhang T., Koglin N., Lythgoe M.F., Årstad E., Hochhauser D., Witney T.H. Measurement of tumor antioxidant capacity and prediction of chemotherapy resistance in preclinical models of ovarian cancer by positron emission tomography. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25(8): 2471–2482. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3423.
14. Моисеев А.А., Хрунин А.В., Павлюшина Е.М., Пирогова Н.А., Горбунова В.А., Лимборская С.А. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз и результаты химиотерапии рака яичников. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* 2008; 19 (1): 59–63.

Вклад авторов

Долгова Д.Р. – разработка концепции и дизайна, интерпретация данных. Антонеева И.И. – подбор клинической базы для анализа. Федотова А.Ю. – анализ и интерпретация данных. Генинг С.О. – обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания. Абакумова Т.В. – анализ и интерпретация данных. Генинг Т.П. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Долгова Динара Ришатовна, канд. биол. наук, доцент, кафедра физиологии и патофизиологии, Институт медицины, экологии и физической культуры, УлГУ, г. Ульяновск. ORCID 0000-0001-5475-7031.

Генинг Татьяна Петровна, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой физиологии и патофизиологии, Институт медицины, экологии и физической культуры, УлГУ, г. Ульяновск. ORCID 0000-0002-5117-1382.

Абакумова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, доцент, кафедра физиологии и патофизиологии, Институт медицины, экологии и физической культуры, УлГУ, г. Ульяновск. ORCID 0000-0001-7559-5246.

Генинг Снежанна Олеговна, аспирант, кафедра онкологии и лучевой диагностики, Институт медицины, экологии и физической культуры, УлГУ; врач-онколог, отделение химиотерапии гемобластозов и солидных опухолей, ОКОД, г. Ульяновск. ORCID0000-0001-6970-6659.

Антонеева Инна Ивановна, д-р мед. наук, доцент, кафедра физиологии и патофизиологии, Институт медицины, экологии и физической культуры, УлГУ; зав. гинекологическим отделением, ОКОД, г. Ульяновск. ORCID 0000-0002-1525-2070.

Федотова Антонина Юрьевна, инженер-исследователь, Научно-исследовательский медико-биологического центр, УлГУ, г. Ульяновск. ORCID 0000-0003-1027-8885.

(✉) Долгова Динара Ришатовна, e-mail: dolgova.dinara@yandex.ru.

Поступила в редакцию 08.07.2019

Подписана в печать 30.04.2019

Полиморфизм 3435C>T гена ABCB1 (rs1045642) не влияет на профиль эффективности и безопасности мirtазапина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью

Застрожин М.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Скрыбин В.Ю., Копоров С.Г., Брюн Е.А., Сычѳв Д.А.

¹ Московский научно-практический центр (МНПЦ) наркологии
Россия, 109390, г. Москва, ул. Люблинская, 37/1

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)
Россия, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

РЕЗЮМЕ

Введение. Миртазапин используется для лечения пациентов с депрессивными расстройствами. Немалая доля пациентов данной группы не отвечает должным образом на терапию миртазапином, при этом у многих отмечается развитие нежелательных лекарственных реакций типа А. По результатам ранее проводимых исследований показано, что в биотрансформации миртазапина принимает участие гликопротеин Р, активность которого в высокой степени зависит от полиморфизма кодирующего его гена.

Цель. Изучить влияние полиморфизма гена ABCB1 на эффективность и безопасность терапии миртазапином у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью.

Материалы и методы. В исследование было включено 119 пациентов мужского пола с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью (средний возраст $38,7 \pm 16,0$ лет). В качестве терапии использовали миртазапин в дозе $(37,8 \pm 13,8)$ мг/сут. Оценка профиля эффективности производилась с помощью психометрических шкал. Профиль безопасности оценивался с помощью валидизированной шкалы UKU Side-Effect Rating Scale. Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. По результатам исследования не получены статистически значимые результаты в показателях оценки эффективности и безопасности (баллы по шкале HAM-D в конце курса терапии: (CC) 2,5 [2,0; 4,0], (CT) 2,0 [1,0; 3,0] и (TT) 2,0 [1,0; 3,0], $p > 0,999$; по шкале UKU: (CC) 3,0 [2,8; 3,0], (CT) 3,0 [3,0; 3,0] и (TT) 3,0 [3,0; 3,0], $p > 0,999$).

Заключение. Продemonстрировано отсутствие влияния полиморфизма 3435C>T гена ABCB1 (rs1045642) на показатель клинической эффективности и безопасности миртазапина.

Ключевые слова: миртазапин, ABCB1, фармакогенетика, биотрансформация, персонализированная медицина, депрессивные расстройства, алкогольная зависимость.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-10073).

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России (протокол № 6 от 16.05.2017). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Застрожин Михаил Сергеевич, e-mail: mszastrozhin@gmail.com.

Для цитирования: Застрожин М.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Скрябин В.Ю., Копоров С.Г., Брюн Е.А., Сычёв Д.А. Полиморфизм 3435C>T гена ABCB1 (rs1045642) не влияет на профиль эффективности и безопасности миртазапина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 73–79. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-73-79>.

Polymorphism 3435c> t of the ABCB1 gene (rs1045642) does not affect the mirtazapine efficiency and safety profile in patients with depressive disorders comorbid with alcohol use disorder

Zastrozhin M.S.^{1,2}, Grishina E.A.², Ryzhikova K.A.², Skryabin V.Yu.¹, Koporov S.G.¹, Bryun E.A.^{1,2}, Sychev D.A.²

¹ Moscow Research and Practical Centre on Addictions
37/1, Lyublinskaya Str., Moscow, 109390, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
Build. 1, 2/1 Barrikadnaya Str., Moscow, 123995, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Mirtazapine is used to treat patients with depressive disorders. A large proportion of patients in this group do not adequately respond to mirtazapine therapy, while many develop undesirable drug reactions of type A. According to the previous studies, P-gp is involved in the biotransformation of mirtazapine, the activity of which is highly dependent on the polymorphism of the gene encoding it.

Aim. The aim of our study was to study the effect of mirtazapine gene polymorphism on the efficacy and safety of mirtazapine therapy in patients with depressive disorders, comorbid with alcohol dependence.

Materials and methods. The study included 119 male patients with depressive disorders, comorbid with alcohol dependence (age 38.7 ± 16.0 years). As a therapy, mirtazapine was used at a dose of 37.8 ± 13.8 mg / day. Evaluation of the effectiveness profile was carried out using psychometric scales. The safety profile was evaluated using the UKU Side-Effect Rating Scale. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction in real time.

Results. In the course of the study, results statistically significant in terms of evaluating efficacy and safety were not obtained (HAMD scores at the end of the course of therapy: (CC) 2.5 [2.0; 4.0], (CT) 2.0 [1.0; 3.0] and (TT) 2.0 [1.0; 3.0], $p > 0.999$; according to the UKU scale: (CC) 3.0 [2.8; 3.0], (CT) 3.0 [3.0; 3.0] and (TT) 3.0 [3.0; 3.0], $p > 0.999$).

Conclusion. The study of 119 patients with depressive disorders comorbid with alcohol dependence showed that 3435C>T polymorphism of the ABCB1 gene (rs1045642) does not affect the clinical efficacy and safety of mirtazapine.

Key words: mirtazapine, ABCB1, pharmacogenetics, biotransformation, personalized medicine, depressive disorder, alcohol use disorder.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this manuscript.

Source of financing. This work was supported by the grant of the Russian Science Foundation (Project No. 18-75-10073).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethical Committee under the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 6 of 16.05.2017). All patients signed an informed consent.

For citation: Zastrozhin M.S., Grishina E.A., Ryzhikova K.A., Skryabin V.Yu., Koporov S.G., Bryun E.A., Sychev D.A. Polymorphism 3435c> t of the ABCB1 gene (rs1045642) does not affect the mirtazapine efficiency

ВВЕДЕНИЕ

Депрессивные расстройства являются одними из наиболее часто встречающихся коморбидных расстройств у пациентов с алкогольной зависимостью [1]. Для лечения пациентов с депрессивными расстройствами применяются антидепрессанты [2]. Одним из представителей данной группы является миртазапин [2]. Несмотря на то, что тетрациклические антидепрессанты включены в рекомендации по лечению депрессивных расстройств, количество резистентных пациентов и пациентов с зарегистрированными нежелательными лекарственными реакциями (НЛР) остается высоким [3].

Гликопротеин Р (P-glycoprotein, P-gr) участвует в фармакокинетике многих лекарств, используемых в психофармакотерапии пациентов с депрессивными расстройствами [4]. При этом ген, кодирующий ABCB1, является высокополиморфным, что может оказывать влияние на активность P-gr, как повышать ее, так и понижать [5]. Изменение активности может приводить к изменению скорости элиминации ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств (ЛС) субстратов, что в свою очередь может сказываться на их эффективности и безопасности [6].

Выделяют четыре группы метаболизаторов: «экстенсивные» (распространенные, extensive metabolizers) – с нормальной скоростью метаболизма. «Медленные» (poor metabolizers), имеющие мутации в гене *ABCB1*, приводящие к значительному снижению активности кодируемого белка и замедлению метаболизма ЛС-субстратов, что может вызывать риск развития НЛР. «Промежуточные» (intermediate metabolizers): имеют мутацию только в одной из гомологичной хромосоме, что снижает активность P-gr, но не настолько выражено, как у медленных метаболизаторов. «Ультрабыстрые» (ultra-rapid metabolizers) – обладают генетически детерминированной высокой активностью P-gr, что приводит к ускорению элиминации ЛС-субстратов и снижению терапевтической эффективности [7].

Цель данного исследования – оценить влияние полиморфизма гена *ABCB1* на профиль эффективности и безопасности миртазапина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническая характеристика испытуемых. В исследовании принимали участие 119 пациентов

мужского пола (средний возраст $(38,71 \pm 15,96)$ лет). Критерии включения в исследование: «F32.x Депрессивный эпизод», а также наличие коморбидного диагноза и «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя. Синдром зависимости средней стадии неосложненный. Воздержание в условиях, ограничивающих потребление алкоголя (F10.212)»; наличие подписанного информированного согласия; терапия, содержащая миртазапин, длительностью 16 сут, монотерапия. Критерии исключения: наличие других психических расстройств; наличие выраженных соматических расстройств (за исключением алкогольного гепатита и токсической энцефалопатии); применение в терапии иных психотропных препаратов; клиренс креатинина <50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови $>1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению миртазапина.

Оценка эффективности и безопасности терапии. Для оценки эффективности миртазапина применяли международные психометрические шкалы: Пенсильванскую шкалу патологического влечения (Pennsylvanian Alcohol Craving Scale, PACS) [8], Визуально-аналоговую шкалу оценки влечения к алкоголю (ВАШ) [9], Шкалу общего клинического впечатления (Clinical Global Impression, CGI) [10], Госпитальную шкалу тревоги и депрессии (HADS) [11], Шкалу депрессии Гамильтона (HAM-D) [12]. Профиль безопасности исследовали с помощью шкал оценки побочного действия (UKU Side-Effect Rating Scale, UKU) [13]. Исследование пациентов проводили на 1-, 9- и 16-е сут терапии, включавшей миртазапин.

Генотипирование. Для проведения генотипирования использовали венозную кровь, собранную на 16-е сут после начала применения миртазапина в вакуумные пробирки VACUETTE (Greiner Bio-One, Австрия). Для определения однонуклеотидных генетических полиморфизмов (SNP's) 3435C>T гена *ABCB1* (rs1045642) использовался метод полимеразной цепной реакции в реальном времени на ДНК-амплификаторах Dtlite (ДНК-Технология, Россия) и CFX96 Touch Real Time System с ПО CFX Manager (BioRad, США) и наборы «SNP-Скрин» (Синтол, г. Москва, Россия). В каждом наборе «SNP-Скрин» использовались два аллель-специфичных зонда, которые позволили отдельно определять сразу два

аллеля исследуемого полиморфизма на двух каналах флуоресценции.

Статистический анализ. Статистический анализ результатов исследования проводили методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statsoft Statistica v. 10.0 (Dell Statistica, Tulsa, США). При выборе метода брали во внимание результаты статистической проверки выборок на соответствие нормальному закону распределения, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро – Уилка. Различия считали статистически значимыми при уровне статистической значимости $p < 0,05$ (при статистической мощности свыше 80%). Для сравнения двух выборок непрерывных независимых данных использовали U-тест Манна – Уитни, с дальнейшей коррекцией полученных уровней значимости с помощью теста Бенджамини – Хохберга, ввиду проведения процедуры множественного сравнения. Анализ нескольких выборок данных непрерывного типа производили с помощью H-теста

Краскела – Уоллиса. Корреляционный анализ проводился с помощью непараметрического теста Спирмена. Данные в работе представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1; Q_3]$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам генотипирования *ABCB1* по полиморфному маркеру 3435C>Т (rs1045642) у 119 испытуемых, были получены следующие данные: количество пациентов, являющихся носителями генотипа CC, составило 20 (16,8%), генотипа CT – 70 (58,8%), генотипа TT – 29 (24,4%).

Распределение генотипов соответствовало закону Харди – Вайнберга для европейской популяции (результат теста $\chi^2 = 4,00$; $p\text{-value} = 0,05$).

Результаты анализа данных психометрических шкал (PACS, ВАШ, CGI, HADS, HAMD) и шкалы оценки побочного действия ЛС (UKU) для пациентов, получавших миртазапин на 1-, 9- и 16-е сут исследования, представлены в табл. 1–3.

Таблица 1

Данные психометрических шкал и шкалы оценки выраженности НЛР у пациентов, получавших миртазапин, на 1-е сут исследования, $Me [Q_1; Q_3]$				
Шкала	CC	CT	TT	$p\text{-value}$
PACS	11,0 [11,0; 11,0]	11,0 [11,0; 11,0]	11,0 [11,0; 11,0]	>0,999
ВАШ	51,0 [50,8; 52,0]	49,0 [46,0; 52,8]	49,0 [47,0; 51,0]	>0,999
CGI	5,0 [5,0; 5,0]	5,0 [5,0; 5,0]	5,0 [5,0; 5,0]	0,086
HADS	37,0 [36,0; 38,0]	36,0 [34,2; 38,0]	37,0 [36,0; 38,0]	>0,999
HAMD	22,0 [21,0; 22,0]	22,0 [21,0; 23,0]	22,0 [21,0; 22,0]	0,636
UKU	0,5 [0,0; 1,0]	1,0 [0,0; 1,0]	0,0 [0,0; 1,0]	>0,999

Таблица 2

Данные психометрических шкал и шкалы оценки выраженности НЛР у пациентов, получавших миртазапин, на 9-е сут исследования, $Me [Q_1; Q_3]$				
Шкала	CC	CT	TT	$p\text{-value}$
PACS	7,5 [7,0; 8,0]	7,0 [7,0; 8,0]	7,0 [7,0; 7,0]	>0,999
ВАШ	32,5 [31,0; 35,2]	32,0 [31,0; 33,8]	32,0 [30,0; 36,0]	>0,999
CGI	3,0 [3,0; 3,0]	3,0 [3,0; 4,0]	3,0 [3,0; 3,0]	>0,999
HADS	25,0 [24,0; 26,2]	24,0 [23,0; 25,0]	24,0 [22,0; 25,0]	>0,999
HAMD	15,0 [14,0; 16,0]	15,0 [13,0; 16,0]	14,0 [14,0; 15,0]	>0,999
UKU	2,0 [2,0; 2,2]	2,0 [2,0; 2,0]	2,0 [2,0; 3,0]	>0,999

Таблица 3

Данные психометрических шкал и шкалы оценки выраженности НЛР у пациентов, получавших миртазапин, на 16-е сут исследования, $Me [Q_1; Q_3]$				
Шкала	CC	CT	TT	$p\text{-value}$
PACS	1,0 [1,0; 1,2]	1,0 [1,0; 1,0]	1,0 [0,0; 2,0]	>0,999
ВАШ	5,5 [3,5; 7,2]	4,0 [3,0; 5,8]	5,0 [4,0; 6,0]	>0,999
CGI	0,0 [0,0; 1,0]	1,0 [0,0; 1,0]	1,0 [0,0; 1,0]	>0,999
HADS	4,0 [3,0; 4,0]	3,0 [1,2; 5,0]	4,0 [2,0; 5,0]	>0,999
HAMD	2,5 [2,0; 4,0]	2,0 [1,0; 3,0]	2,0 [1,0; 3,0]	>0,999
UKU	3,0 [2,8; 3,0]	3,0 [3,0; 3,0]	3,0 [3,0; 3,0]	>0,999

Динамика изменения баллов по шкале HAMD у пациентов с разными генотипами представлена на рис. 1. К 1-м сут исследования изучаемые выборки уже имели статистически значимые различия: (CC) 22,0 [21,0; 22,0], (CT) 22,0 [21,0; 23,0] и (TT) 22,0 [21,0; 22,0], $p = 0,035$. К 9-м сут исследования статистически значимые различия перестали наблюдаться у носителей разных генотипов по изучаемому полиморфному маркеру: (CC) 15,0 [14,0; 16,0], (CT) 15,0 [13,0; 16,0] и (TT) 14,0 [14,0;

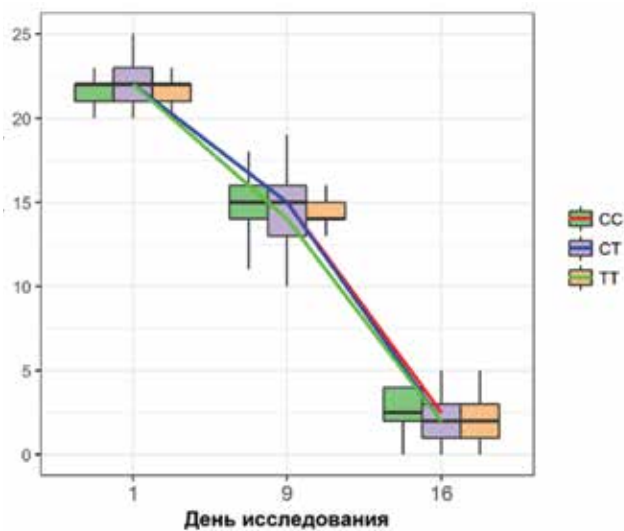


Рис. 1. Изменение баллов по шкале HAMD у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру 3435C>T гена *ABCB1* (rs1045642)

В 1-е сут исследования баллы статистически значимо не отличались у носителей разных генотипов: (CC) 0,5 [0,0; 1,0], (CT) 1,0 [0,0; 1,0] и (TT) 0,0 [0,0; 1,0], $p = 0,535$. К 9-м сут статистически значимые различия пропали: (CC) 2,0 [2,0; 2,2], (CT) 2,0 [2,0; 2,0] и (TT) 2,0 [2,0; 3,0], $p = 0,502$. Статистически значимая разница не получена и на 16-е сут терапии: (CC) 3,0 [2,8; 3,0], (CT) 3,0 [3,0; 3,0] и (TT) 3,0 [3,0; 3,0], $p > 0,999$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Статистический анализ данных профиля клинической эффективности и безопасности мirtазапина у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру 3435C>T гена *ABCB1* (rs1045642) показал отсутствие статистически значимых различий в показателях эффективности и безопасности ($p > 0,999$).

Это может говорить о том, что данный полиморфный маркер не оказывает влияния на клиническую эффективность и безопасность терапии пациентов изучаемой группы.

15,0], $p = 0,627$. В последние, 16-е сут исследования, как и на втором визите, статистической разницы не получено: (CC) 2,5 [2,0; 4,0], (CT) 2,0 [1,0; 3,0] и (TT) 2,0 [1,0; 3,0], $p > 0,999$. По другим психометрическим шкалам была получена аналогичная динамика в изменении баллов, что и по шкале HAMD.

Сравнение баллов по шкале выраженности НЛР (UKU) в разные дни исследования представлено на рис. 2.

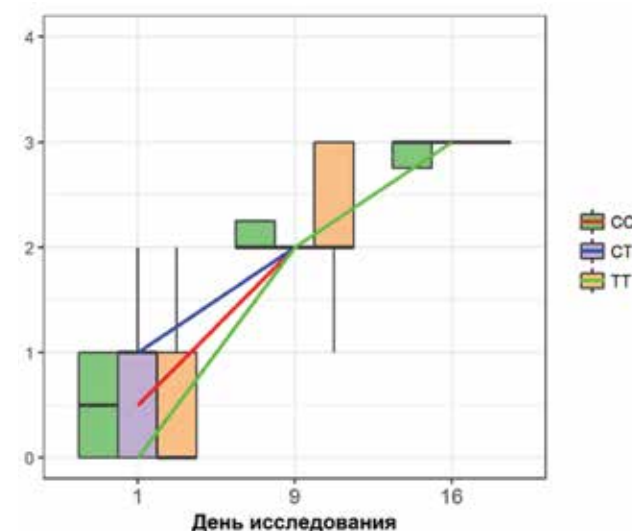


Рис. 2. Изменение баллов по шкале UKU у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру 3435C>T гена *ABCB1* (rs1045642)

Таким образом, исходя из полученных результатов о том, что полиморфизм гена не оказывает влияния на эффективность и безопасность терапии мirtазапином у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью, возможно предположить, что перед назначением мirtазапина пациентам данной категории учитывать результаты генотипирования по локусам данного гена не нужно. В то же время при назначении мirtазапина необходимо принимать во внимание полиморфизм гена *CYP2D6*, так как показано, что его полиморфизм может оказывать влияние на профиль эффективности и безопасности мirtазапина у пациентов данной категории [14–16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании на группе из 119 пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью, было продемонстрировано отсутствие влияния полиморфизма 3435C>T гена *ABCB1* (rs1045642) на показатели профиля эффективности и безопасности мirtазапина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boschloo L., Vogelzangs N., Smit J.H., van den Brink W., Veltman D.J., Beekman A.T., Penninx B.W. Comorbidity and risk indicators for alcohol use disorders among persons with anxiety and/or depressive disorders: findings from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J. Affect Disord.* 2011; 131 (1–3): 233–242. DOI: 10.1016/j.jad.2010.12.014.
2. Shiv G., Akhilesh J., Manaswi G. Guidelines for the pharmacological management of depression. *Indian J. Psychiatry.* 2017; 59 (1): 34–50. DOI: 10.4103/0019-5545.196973.
3. Spear B.B., Heath-Chiozzi M., Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol. Med.* 2001; 7 (5): 201–204. DOI: 10.1016/s1471-4914(01)01986-4.
4. Peters E.J., Reus V., Hamilton S.P. The ABCB1 transporter gene and antidepressant response. *F1000 Biol. Rep.* 2009; 1: 23. DOI: 10.3410/B1-23.
5. Wolking S., Schaeffeler E., Lerche H., Schwab M., Nies A.T. Impact of genetic polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clin. Pharmacokinet.* 2015; 54 (7): 709–735. DOI: 10.1007/s40262-015-0267-1.
6. Ieiri I., Takane H., Otsubo K. The MDR1 (*ABCB1*) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 2004; 43 (9): 553–576. DOI: 10.2165/00003088-200443090-00001.
7. Ahmed S., Zhou Z., Zhou J., Chen S.Q. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: relevance to precision medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016; 14 (5): 298–313. DOI: 10.1016/j.gpb.2016.03.008.
8. Flannery B.A., Volpicelli J.R., Pettinati H.M. Psychometric properties of the Penn Alcohol Craving Scale. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999; 23 (8): 1289–1295.
9. Gould D., Kelly D., Goldstone L., Gammon J. Visual Analogue Scale (VAS). *Journal of Clinical Nursing.* 2001; 10 (5): 697–706. DOI: 10.1046/j.1365-2702.2001.00525.x.
10. Busner J., Targum S.D. The clinical global impressions scale: applying a research tool in clinical practice. *Psychiatry (Edgmont).* 2007; 4 (7): 28–37.
11. Zigmond A.S., Snaith R.P. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr. Scand.* 1983; 67 (6): 361–370. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x.
12. Hamilton M. A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1960; 23 (1): 56–62. DOI: 10.1136/jnnp.23.1.56.
13. Lingjaerde O., Ahlfors U.G., Bech P., Dencker S.J., Elgen K. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* 1987; 334: 1–100. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1987.tb10566.x.
14. Zastrozhin M.S., Skryabin V.Y., Smirnov V.V., Grishina E.A., Ryzhikova K.A., Chumakov E.M., Bryun E.A., Sychev D.A. Effects of CYP2D6 activity on the efficacy and safety of mirtazapine in patients with depressive disorders and comorbid alcohol use disorder. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2019; 97 (8): 781–785. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0177.
15. Zastrozhin M.S., Sorokin A.S., Agibalova T.V., Grishina E.A., Antonenko A.P., Rozochkin I.N., Duzhev D.V., Skryabin V.Y., Galaktionova T.E., Barna I.V., Orlova A.V., Aguzarov A.D., Savchenko L.M., Bryun E.A., Sychev D.A. Using a personalized clinical decision support system for bromdihydrochlorophenylbenzodiazepine dosing in patients with anxiety disorders based on the pharmacogenomic markers. *Hum. Psychopharmacol.* 2018; 33 (6): e2677. DOI: 10.1002/hup.2677.
16. Zastrozhin M.S., Skryabin V.Y., Miroshkin S.S., Bryun E.A., Sychev D.A. Pharmacogenetics of alcohol addiction: current perspectives. *Appl. Clin. Genet.* 2019; 12: 131–140. DOI: 10.2147/TACG.S206745.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность всем врачам и заведующим Московского научно-практического центра наркологии Департамента здравоохранения города Москвы за неоценимую помощь в проведении данного исследования, а также сотрудникам и администрации учреждений, на базе которых проводились лабораторные исследования.

Вклад авторов

Застрожин М.С. – разработка дизайна исследования, набор участников исследования, взятие биоматериала, проведение генотипирования, статистическая обработка данных, написание статьи. Скрыбин В.Ю. – набор участников исследования, взятие биоматериала, проведение генотипирования, статистическая обработка данных, написание статьи. Рыжикова К.А. – проведение генотипирования, проверка и редактирование текста статьи. Гришина Е.А. – разработка дизайна лабораторной части исследования, проведение генотипирования, проверка и редактирование текста статьи. Копоров С.Г. – разработка дизайна исследования, помощь в решении административных и этических вопросов, проверка и редактирование текста статьи. Брюн Е.А. – разработка дизайна исследования, проверка и редактирование текста статьи. Сычёв Д.А. – идея проведения исследования, разработка дизайна исследования, проверка и редактирование текста статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию текста перед публикацией.

Сведения об авторах

Застрожин Михаил Сергеевич, канд. мед. наук, руководитель лаборатории генетики и фундаментальных исследований, МНПЦ наркологии; доцент, кафедра наркологии, РМАНПО, г. Москва. ORCID 0000-0003-0607-4812.

Скрябин Валентин Юрьевич, канд. мед. наук, зав. 16-м наркологическим отделением, МНПЦ наркологии, г. Москва. ORCID 0000-0002-4942-8556.

Гришина Елена Анатольевна, д-р биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, отдел молекулярной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО, г. Москва. ORCID 0000-0002-5621-8266.

Рыжикова Кристина Анатольевна, науч. сотрудник, отдел молекулярной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО, г. Москва. ORCID 0000-0003-3505-8520.

Копоров Сергей Георгиевич, канд. мед. наук, директор, МНПЦ наркологии, г. Москва. ORCID 0000-0003-2584-4832.

Брюн Евгений Алексеевич, д-р мед. наук, профессор, президент МНПЦ наркологии; зав. кафедрой наркологии, РМАНПО, г. Москва. ORCID 0000-0002-8366-9732.

Сычёв Дмитрий Алексеевич, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии, ректор РМАНПО, г. Москва. ORCID 0000-0002-4496-3680.

(✉) **Застрожин Михаил Сергеевич**, e-mail: mszastrozhin@gmail.com.

Поступила в редакцию 09.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Метилирование промотора гена *ABCA1* и внезапная сердечная смерть

Иванова А.А.¹, Гуражева А.А.¹, Акиншина Е.И.¹, Максимова С.В.², Малютина С.К.¹, Новоселов В.П.³, Родина И.А.³, Хамович О.В.³, Максимов В.Н.¹

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины (НИИТПМ) – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)
Россия, 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

³ Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы (НОКБСМЭ)
Россия, 630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 134

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование ассоциации метилирования промотора гена *ABCA1* с внезапной сердечной смертью (ВСС).

Материалы и методы. Дизайн исследования построен по принципу «случай – контроль». Группа ВСС включала 150 мужчин (средний возраст $46,7 \pm 9,2$ года), умерших внезапной сердечной смертью согласно данным судебно-медицинской экспертизы (основные патологоанатомические диагнозы – острая недостаточность кровообращения, острая коронарная недостаточность). Контрольная группа включает 150 мужчин (средний возраст $42,6 \pm 1,2$ года), умерших внезапно, но не вследствие сердечно-сосудистой патологии. ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда. Оценка статуса метилирования промотора гена *ABCA1* проведена методом метил-специфической полимеразной цепной реакции. Полученные результаты статистически обработаны в SPSS 16.0 с применением критерия Пирсона, критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

Результаты. При сравнении групп выявлены статистически значимые различия по статусу метилирования промотора гена *ABCA1* между группами ($p = 0,015$). В группе ВСС доля лиц, у которых промотор гена *ABCA1* метилирован, статистически значимо больше по сравнению с контрольной группой ($p = 0,020$; ОШ = 5,86; 95%-й доверительный интервал (1,28–26,89)).

Заключение. Метилирование промотора гена *ABCA1* ассоциировано с внезапной сердечной смертью.

Ключевые слова: внезапная сердечная смерть, метилирование, *ABCA1*, промотор.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области (проект № 19-415-543001).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИТПМ – филиалом ФИЦ ИЦиГ СО РАН (протокол № 77 от 04.06.2019).

Для цитирования: Иванова А.А., Гуражева А.А., Акиншина Е.И., Максимова С.В., Малютина С.К., Новоселов В.П., Родина И.А., Хамович О.В., Максимов В.Н. Метилирование промотора гена *ABCA1* и внезапная сердечная смерть. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 80–85. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-80-85>.

ABCA1 gene promoter methylation and sudden cardiac death

Ivanova A.A.¹, Gurazheva A.A.¹, Akinshina E.I.¹, Maksimova S.V.², Malyutina S.K.¹,
Novoselov V.P.³, Rodina I.A.³, Khamovich O.V.³, Maksimov V.N.¹

¹ Institution of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

175/1, B. Bogatkova Str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University

52, Krasny Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

³ Novosibirsk Regional Office of Forensic Medical Examination

134, Nemirovicha-Danchenko Str., Novosibirsk, 630087, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. A study of the association of the methylation of the promoter of the *ABCA1* gene with sudden cardiac death (SCD).

Materials and methods. The study design is based on the case-control principle. The SCD group included 150 men (mean age (46.7 ± 9.2) years) who died of sudden cardiac death according to forensic medical examination data (the main pathological diagnoses are acute circulatory failure, acute coronary insufficiency). The control group included 150 men (mean age (42.6 ± 1.2) years) who died suddenly, but not due to cardiovascular pathology. DNA was isolated by phenol-chloroform extraction from myocardial tissue. The methylation status of the *ABCA1* gene promoter was assessed by methyl-specific polymerase chain reaction. The results obtained were statistically processed in SPSS 16.0 using Pearson's test and Fisher's test with Yates' correction for continuity. $P < 0.05$ was used as a level of significance.

Results. Comparing the groups revealed statistically significant differences in the methylation status of the gene promoter ($p = 0.015$). In the SCD group, the proportion of individuals whose *ABCA1* gene promoter is methylated is statistically significantly higher compared to the control group ($p = 0.020$; OR = 5.86; 95% CI (1.28–26.89)).

Conclusion. Methylation of the promoter of the *ABCA1* gene is associated with sudden cardiac death.

Key words: sudden cardiac death, methylation, *ABCA1*, promoter.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Novosibirsk Region (project No. 19-415-543001).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee of IIPM (Protocol No. 77 of 04.06.2019).

For citation: Ivanova A.A., Gurazheva A.A., Akinshina E.I., Maksimova S.V., Malyutina S.K., Novoselov V.P., Rodina I.A., Khamovich O.V., Maksimov V.N. *ABCA1* gene promoter methylation and sudden cardiac death. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 80–85. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-80-85>.

ВВЕДЕНИЕ

Термин «внезапная сердечная смерть» (ВСС), согласно последним рекомендациям Европейского общества кардиологов, используется, когда летальный исход развился в течение 1 ч с момента возникновения острых симптомов в случае известной при жизни фатальной кардиальной патологии/найденной на аутопсии фатальной кардиальной патологии/не найденных на аутопсии причин развития внезапной смерти (внезапная аритмическая смерть). При отсут-

ствии свидетелей смерти временной критерий ВСС увеличивается до 24 ч.

Считается, что в этиологии ВСС в молодом возрасте преобладают нарушения ритма сердца, кардиомиопатии, миокардиты и другие более редкие заболевания, вклад которых в возникновение ВСС на популяционном уровне невелик. В более старшем возрасте на первое место выходят ишемическая болезнь сердца (ИБС), сердечная недостаточность, клапанные пороки, вторичные нарушения ритма сердца. В молодом возрасте даже после проведения

качественного судебно-медицинского исследования причина развития внезапного летального исхода может остаться неизвестной [1].

В настоящее время смертность по причине сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) занимает ведущую позицию в структуре смертности населения России (583,1 человека на 100 тыс. населения в год по данным Федеральной службы государственной статистики за 2018 г.) [2]. В почти половине случаев ВСС развивается у условно здорового человека, который не имел ранее каких-либо проявлений сердечно-сосудистой патологии. Выживаемость пациентов после эпизода ВСС, даже при нахождении в лечебном учреждении, все еще остается низкой [1].

В связи с этим идентификация биомаркеров, которые помогут определить предрасположенность к развитию ВСС, особенно у пациента без симптомов сердечной патологии, является важной задачей современного здравоохранения, поскольку имеющиеся клинико-диагностические критерии для стратификации риска ВСС играют значимую роль только для пациентов с уже выявленной патологией сердца, перенесенным инфарктом миокарда и внезапной сердечной смертью в анамнезе. Таким образом, новые биомаркеры крайне необходимы для проведения ранней первичной профилактики развития ВСС.

ВСС – мультифакторная нозология, вклад в развитие которой вносят генетические факторы и факторы окружающей среды. На сегодняшний день идентифицировано огромное количество полиморфизмов и мутаций генов, ассоциированных с ВСС. Однако до сих пор остается неясным, как гены с критической ролью в патогенезе ВСС взаимодействуют на клеточном уровне. Использовать отдельные однонуклеотидные варианты генов в качестве диагностических маркеров ВСС пока не представляется возможным. Полученные в ходе исследования метилирования ДНК данные могут помочь понять механизмы реализации генетической информации в патогенезе ВСС.

В ряде исследований показано, что оценка метилирования отдельных генов, как и результаты полногеномного метилирования, могут быть использованы в качестве диагностических маркеров риска развития заболевания (например, атеросклероза, ИБС), тяжести симптомов, прогноза течения. Если для многих ССЗ проводятся такого рода эпигенетические исследования, то, по данным мировой литературы, для ВСС исследований метилирования ДНК до сих пор проведено не было.

Ген *ABCA1* (ATP binding cassette subfamily A member 1, 9q31.1) кодирует белок, который необходим для выведения холестерина из периферических тканей. Показано, что инактивация гена путем мети-

лирования его промотора ассоциирована с развитием ИБС, которая является наиболее частым субстратом ВСС среди лиц среднего и старшего возраста [3].

Таким образом, цель проекта – исследование ассоциации метилирования промотора гена *ABCA1* с ВСС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования построен по принципу «случай – контроль». Группа ВСС включала 150 мужчин (средний возраст $46,7 \pm 9,2$ года), умерших внезапной сердечной смертью согласно данным судебно-медицинской экспертизы (основные патологоанатомические диагнозы – острая недостаточность кровообращения, острая коронарная недостаточность). Критерии исключения из группы внезапной сердечной смерти: наличие морфологических изменений ткани сердца, характерных для инфаркта миокарда, кардиомиопатий. Кроме того, из группы исключены лица, находившиеся в состоянии алкогольного и наркотического опьянения. Контрольная группа включала 150 мужчин (средний возраст $42,6 \pm 1,2$ года), умерших внезапно (методика подбора 1 : 1), но не вследствие сердечно-сосудистой патологии. ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда в группе внезапной сердечной смерти и в группе контроля.

Подбор контрольной группы из банка ДНК лиц, умерших внезапно, и использование ДНК, выделенной из ткани миокарда, как в группе ВСС, так и в группе контроля, продиктованы доказанной тканеспецифичностью метилирования ДНК.

Оценка статуса метилирования промотора гена *ABCA1* проведена методом метил-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) на бисульфит-конвертированной ДНК. Для бисульфитной конверсии образцов ДНК использованы наборы EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Метил-специфическая ПЦР проведена в двух пробирках: с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю, согласно методикам, описанным в исследовании Н. Ghaznavi и соавт. [3].

Полученные результаты статистически обработаны в SPSS 16.0 с применением критерия Пирсона, критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе ВСС у 22% (33/150) промотор гена *ABCA1* полностью метилирован (ММ); у 1,3% (2/150) полностью неметилирован (УУ); у 76,7% (115/150) обнаружен как метилированный, так и неметилиро-

ванный промотор гена (MU). В контрольной группе у 27,3% (41/150) промотор гена *ABCA1* полностью метилирован; у 7,4% (11/150) полностью неметилирован; у 65,3% (98/150) обнаружен как метилированный, так и неметилированный промотор гена. При сравнении групп выявлены статистически значимые различия по статусу метилирования промотора гена *ABCA1* между группами ($p = 0,015$). В группе ВСС доля лиц, у которых промотор гена *ABCA1* метилирован, статистически значимо больше по сравнению с контрольной группой (ММ + МУ vs УУ: $p = 0,020$; ОШ = 5,86; 95%-й доверительный интервал (1,28–26,89)).

ОБСУЖДЕНИЕ

Эпигенетические изменения образуют границу между генотипом и окружающей средой. Считается, что эпигенетическая изменчивость может вносить существенный вклад в развитие ССЗ. В последние два десятилетия проведено множество исследований по поиску связи между метилированием ДНК и сердечно-сосудистыми заболеваниями. ДНК-метилирование обычно рассматривается в контексте CpG-динуклеотидной последовательности (CpG-сайтов). В соматических клетках млекопитающих большинство CpG-сайтов метилированы. Но CpG-сайты в регионах повышенной CpG плотности (CpG-островки) обычно описаны как сайты со сниженным уровнем метилирования. ДНК-метилирование промотора гена является важным фактором для регуляции транскрипции [4]. Известно, что гипометилирование промотора гена увеличивает его экспрессию, тогда как гиперметилирование – снижает. Важно отметить, что уровень метилирования отдельных генов является тканеспецифичным [5]. Накопленные знания позволяют предполагать, что эпигенетические изменения, такие как нарушения метилирования ДНК, могут помочь найти альтернативное объяснение патофизиологии ССЗ [6].

В отношении метилирования отдельных генов для каждого сердечно-сосудистого фенотипа изучено множество локусов. Исследований уровня метилирования при ВСС по данным доступной мировой литературы не проведено. Однако проведены исследования по изучению метилирования при других ССЗ, которые лежат в основе ВСС или имеют схожую с ней патофизиологическую основу. Наиболее изученной нозологией в отношении метилирования является ишемическая болезнь сердца и ее разновидности.

Ген *ABCA1* (ATP binding cassette subfamily A member 1, 9q31.1) кодирует транспортер молекул через вне- и внутриклеточные мембраны. Используя

холестерин в качестве субстрата, протеин функционирует как эффлюксный насос в обратном транспорте липидов в клетках. Мутации гена связывают с развитием семейного дефицита альфа-липопротеинов (гипоальфа-липопротеинемия) и семейного дефицита липопротеинов высокой плотности [7]. Экспрессия гена *ABCA1* идентифицирована как независимый предиктор развития ИБС, атеросклеротических бляшек, в том числе некальцифицированных [8]. Метилирование промотора гена *ABCA1* выявлено как значимый фактор риска развития, но не тяжести ИБС: частота метилирования промотора выше в группе лиц с ИБС по сравнению с контрольной группой, а также в более старшей возрастной группе [3]. Уровень метилирования промотора гена *ABCA1* негативно коррелирует с концентрацией холестерина липопротеинов высокой плотности у лиц с семейной гиперхолестеринемией. Также метилирование гена *ABCA1* связано с анамнезом ИБС [7].

В пилотном исследовании показано, что метилирование промотора гена *ABCA1* может быть использовано в качестве значимого биомаркера ранней диагностики атеросклероза [9]. У женщин в Японии подтверждена обратная зависимость между метилированием промотора гена и уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности и найдена связь между уровнем метилирования промотора гена *ABCA1* и диетой: у женщин с диетой, обогащенной овощами, витаминами, уровень метилирования промотора гена значимо ниже [10, 11]. Полиморфизмы гена *ABCA1* ассоциированы с уровнем ряда показателей липидного обмена: rs363717, rs2230806, rs4149313, rs9282541 – с риском ИБС, rs2230808 – с уровнем общего холестерина в крови, rs363717, rs4149339, rs4149338 – с повышенным уровнем триглицеридов в крови [9, 12, 13]. Полиморфизм rs2230806 связан с уровнем триглицеридов у пациентов с тяжелой дислипидемией [14]. По данным проведенного метаанализа, уровень холестерина липопротеинов высокой плотности ассоциирован с полиморфизмом rs2246293 [15].

Согласно полученным нами данным, метилирование промотора гена *ABCA1* ассоциировано с риском ВСС. В группе ВСС доля лиц, у которых промотор гена *ABCA1* метилирован, статистически значимо больше по сравнению с контрольной группой. Согласно данным мировой научной литературы, исследования по поиску связи метилирования промотора гена *ABCA1* с ВСС не проводились. Тем не менее в зарубежных исследованиях показано, что метилирование промотора гена ассоциировано с риском ИБС, нарушениями липидного гомеостаза. Так как ИБС является наиболее распространенным субстратом

развития ВСС в старшей возрастной группе, полученные нами результаты являются закономерными. Однако в силу небольшой численности групп, включенных в исследование, требуется дополнительная проверка выявленной ассоциации в группах с большей численностью, с включением в исследование женщин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метилирование промотора гена *ABCA1* статистически значимо ассоциировано с внезапной сердечной смертью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Priori S.G., Blomström-Lundqvist C., Mazzanti A., Blom N., Borggrefe M., Camm J., Elliott P.M., Fitzsimons D., Hatala R., Hindricks G., Kirchhof P., Kjeldsen K., Kuck K.H., Hernandez-Madrid A., Nikolaou N., Norekvål T.M., Spaulding C., van Veldhuisen D.J. The task force for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death of the European Society of Cardiology (ESC). *G. Ital. Cardiol.* 2016; 17 (2): 108–170. DOI: 10.1714/2174.23496.
2. Федеральная служба государственной статистики. Информационно-аналитические материалы. Естественное движение населения. URL: <https://gks.ru/compendium/document/13269>.
3. Ghaznavi H., Mahmoodi K., Soltanpour M.S. A preliminary study of the association between the *ABCA1* gene promoter DNA methylation and coronary artery disease risk. *Mol. Biol. Res. Commun.* 2018; 7 (2): 59–65. DOI: 10.22099/mbrc.2018.28910.1312.
4. Nazarenko M.S., Markov A.V., Lebedev I.N., Freidin M.B., Sleptcov A.A., Koroleva I.A., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0122601. DOI: 10.1371/journal.pone.0122601.
5. Wang X., Liu A.H., Jia Z.W., Pu K., Chen K.Y., Guo H. Genome-wide DNA methylation patterns in coronary heart disease. *Herz.* 2018; 43 (7): 656–662. DOI: 10.1007/s00059-017-4616-8.
6. Banerjee S., Ponde C.K., Rajani R.M., Ashavaid T.F. Differential methylation pattern in patients with coronary artery disease: pilot study. *Mol. Biol. Rep.* 2019; 46 (1): 541–550. DOI: 10.1007/s11033-018-4507-y.
7. Guay S.P., Légaré C., Brisson D., Mathieu P., Bossé Y., Gaudet D., Bouchard L. Epigenetic and genetic variations at the *TNNT1* gene locus are associated with HDL-C levels and coronary artery disease. *Epigenomics.* 2016; 8 (3): 359–371. DOI: 10.2217/epi.15.120.
8. Infante T., Forte E., Schiano C., Punzo B., Cademartiri F., Cavaliere C., Salvatore M., Napoli C. Evidence of association of circulating epigenetic-sensitive biomarkers with suspected coronary heart disease evaluated by cardiac computed tomography. *PLoS One.* 2019; 14 (1): e0210909. DOI: 10.1371/journal.pone.0210909.
9. Ma S.C., Zhang H.P., Kong F.Q., Zhang H., Yang C., He Y.Y., Wang Y.H., Yang A.N., Tian J., Yang X.L., Zhang M.H., Xu H., Jiang Y.D., Yu Z. Integration of gene expression and DNA methylation profiles provides a molecular subtype for risk assessment in atherosclerosis. *Mol. Med. Rep.* 2016; 13 (6): 4791–4799. DOI: 10.3892/mmr.2016.5120.
10. Fujii R., Yamada H., Munetsuna E., Yamazaki M., Mizuno G., Tsuboi Y., Ohashi K., Ishikawa H., Ando Y., Hagiwara C., Maeda K., Hashimoto S., Hamajima N., Suzuki K. Dietary vegetable intake is inversely associated with ATP-binding cassette protein A1 (*ABCA1*) DNA methylation levels among Japanese women. *Nutrition.* 2019; 65: 1–5. DOI: 10.1016/j.nut.2019.02.010.
11. Fujii R., Yamada H., Munetsuna E., Yamazaki M., Ando Y., Mizuno G., Tsuboi Y., Ohashi K., Ishikawa H., Hagiwara C., Maeda K., Hashimoto S., Suzuki K. Associations between dietary vitamin intake, *ABCA1* gene promoter DNA methylation, and lipid profiles in a Japanese population. *Am. J. Clin. Nutr.* 2019; 110 (5): 1213–1219. DOI: 10.1093/ajcn/nqz181.
12. Lu Y., Liu Y., Li Y., Zhang H., Yu M., Kanu J.S., Qiao Y., Tang Y., Zhen Q., Cheng Y. Association of ATP-binding cassette transporter A1 gene polymorphisms with plasma lipid variability and coronary heart disease risk. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8 (10): 13441–13449.
13. Wang F., Ji Y., Chen X., Song Y., Huang S., Zhou C., Huang C., Chen Z., Zhang L., Ge J. *ABCA1* variants rs2230806 (R219K), rs4149313 (M8831I), and rs9282541 (R230C) are associated with susceptibility to coronary heart disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 2019; 33 (6): e22896. DOI: 10.1002/jcla.22896.
14. Smirnov G.P., Malyshev P.P., Rozhkova T.A., Zubareva M.Y., Shuvalova Y.A., Rebrikov D.V., Titov V.N. The effect of *ABCA1* rs2230806 common gene variant on plasma lipid levels in patients with dyslipidemia. *Klin. Lab. Diagn.* 2018; 63 (7): 410–413. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-7-410-413.
15. Ma Y., Follis J.L., Smith C.E., Tanaka T., Manichaikul A.W., Chu A.Y., Samieri C., Zhou X., Guan W., Wang L., Biggs M.L., Chen Y.D., Hernandez D.G., Borecki I., Chasman D., Rich S.S., Ferrucci L., Irvin M.R., Aslibekyan S., Zhi D., Tiwari H.K., Claas S.A., Sha J., Kabagambe E.K., Lai C.Q., Parnell L.D., Lee Y.C., Amouyel P., Lambert J.C., Psaty B.M., King I.B., Mozaffarian D., McKnight B., Bandinelli S., Tsai M.Y., Ridker P.M., Ding J., Mstat K.L., Liu Y., Sotoodehnia N., Barberger-Gateau P., Steffen L.M., Siscovick D.S., Absher D., Arnett D.K., Ordovas J.M., Lemaitre R.N. Interaction of methylation-related genetic variants with circulating fatty acids on plasma lipids: a meta-analysis of 7 studies and methylation analysis of 3 studies in the cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology consortium. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016; 103 (2): 567–578. DOI: 10.3945/ajcn.115.112987.

Вклад авторов

Иванова А.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Гуражева А.А. – выполнение бисульфитной конверсии ДНК. Акиншина Е.И., Максимова С.В. – проведение метилспецифической ПЦР. Малютин С.К. – разработка концепции и дизайна. Новоселов В.П., Родина И.А., Хамович О.В. – проведение судебно-медицинского этапа исследования. Максимов В.Н. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Иванова Анастасия Андреевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-9460-6294.

Гуражева Анна Александровна, мл. науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-1547-624X.

Акиншина Елена Игоревна, мл. науч. сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-2924-9147.

Максимова Софья Владимировна, студентка, 3-й курс, педиатрический факультет, НГМУ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-2472-181X.

Малютин Софья Константиновна, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний, НИИТПМ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-6539-0466.

Новоселов Владимир Павлович, д-р мед. наук, профессор, начальник, НОКБСМЭ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-6312-5543.

Родина Ирина Александровна, канд. мед. наук, врач судебно-медицинский эксперт, НОКБСМЭ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-2799-0756.

Хамович Олеся Викторовна, канд. мед. наук, врач судебно-медицинский эксперт, НОКБСМЭ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-2960-193X.

Максимов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, доцент, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-7165-4496.

(✉) **Иванова Анастасия Андреевна**, e-mail: ivanova_a_a@mail.ru.

Поступила в редакцию 18.03.2019

Подписана в печать 29.09.2019

Роль восстановленных тиолов в адаптации венозного эндотелия при аутовенозной реконструкции артерий нижних конечностей

Калинин Р.Е., Абаленихина Ю.В., Пшенников А.С., Виноградов С.А.

Рязанский государственный медицинский университет (РязГМУ) им. акад. И.П. Павлова
Россия, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить изменения тиолового статуса, выявить корреляционные связи между содержанием SH-групп и уровнем метаболитов оксида азота (NO), васкулоэндотелиальным фактором роста A (VEGF-A) плазмы крови пациентов с критической ишемией нижних конечностей (КИНК) после аутовенозных реконструкций артерий бедренно-подколенного сегмента в условиях артериального русла.

Материалы и методы. Обследованы 54 пациента с КИНК, которые разделены на три группы: шунтирование с использованием синтетического протеза, аутовенозное шунтирование по методу реверсированной вены и аутовенозное шунтирование по методу *in situ*. Забор периферической венозной крови производили на 1-е, 10-е сут, через 1, 3 и 6 мес после операции. Уровень метаболитов оксида азота оценивали фотоколориметрическим методом по реакции с реактивом Грисса на микропланшетном анализаторе (Awareness Technology, США). Определение концентрации VEGF-A осуществлялось путем иммуноферментного анализа (Personal Lab., Италия) с использованием Human VEGF-A Platinum ELISA. Содержания тиоловых (SH-) групп определяли с помощью реактива Элмана (SERVA, Германия) на спектрофотометре СФ-2000 (г. Санкт-Петербург, Россия).

Результаты. Концентрация VEGF-A и уровень SH-групп возрастают на 10-е сут, через 1 мес в группе пациентов, оперированных с использованием синтетического протеза. Уровень метаболитов NO, концентрация VEGF-A, содержание SH-групп статистически значимо возрастают, а затем снижаются до исходных значений в группе пациентов, оперированных по методу реверсированной вены. В группе пациентов, оперированных по методу *in situ*, уровень метаболитов оксида азота повышается, концентрация VEGF-A увеличивается на 10-е сут, уровень SH-групп возрастает и выявлена положительная корреляционная связь между содержанием SH-групп и концентрацией VEGF-A.

Заключение. Метаболиты NO способствуют нарастанию SH-групп и VEGF-A у пациентов, оперированных по методу реверсированной вены, а у пациентов в группе *in situ* не влияют на концентрацию VEGF-A и уровень SH-групп, что может иметь клиническое значение при назначении доноров NO. Выявленные закономерности изменения уровня восстановленных тиолов, метаболитов оксида азота, VEGF-A в совокупности с анализом ранних и поздних послеоперационных осложнений позволяют сделать вывод о преимуществе аутовенозной реконструкции бедренно-подколенного сегмента за счет функциональной адаптации венозного эндотелия по сравнению с группой пациентов, оперированных с использованием синтетического протеза. Метод *in situ* по биохимическим и ангиологическим показателям оказался более благоприятным с точки зрения клинического течения, чем метод реверсированной вены.

Ключевые слова: метаболиты оксида азота, васкулоэндотелиальный фактор роста, белковые и небелковые тиоловые группы, аутовенозная реконструкция артерий нижних конечностей, реперфузионное повреждение эндотелия.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-00129) и стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам,

✉ Абаленихина Юлия Владимировна, e-mail: abalenihiina88@mail.ru.

осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (№ СП-2164.2018.4).

Соответствие принципам этики. Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом РязГМУ им. акад. И.П. Павлова (протокол № 1 от 16.10.2018).

Для цитирования: Калинин Р.Е., Абаленихина Ю.В., Пшениников А.С., Виноградов С.А. Роль восстановленных тиолов в адаптации венозного эндотелия при аутовенозной реконструкции артерий нижних конечностей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 86–93. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-86-93>.

The role of recovered thiols in venous endothel adaptation in case of autovenous reconstruction of lower limb arteries

Kalinin R.E., Abalenikhina Yu.V., Pshennikov A.S., Vinogradov S.A.

Ryazan State Medical University

9, Vysokovoltnaya Str., Ryazan, 390026, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose. To evaluate the role of thiol status and its correlative relationship with the level of nitric oxide metabolites and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in the blood plasma of patients with critical lower limb ischemia (CLI) after autovenous reconstructions of femoropopliteal segment's arteries in the setting of venous endothelium of the arterial bed.

Materials and methods. 54 patients with critical lower limb ischemia had been examined and divided into groups: synthetic prosthesis, *in situ* autovenous bypass procedure and reversed vein autovenous bypass procedure. Peripheral venous blood was taken on the 1st and 10th days, and in 1, 3 and 6 months after the operation. Nitric oxide metabolites level was examined with photocolormetric method by reaction with Griess reagent on a microplate analyzer (Awareness Technology, USA). VEGF-A number estimation was done by ELISA test (PersonalLab, Italy) with the use of Human VEGF-A Platinum ELISA. The level of thiol (SH-) groups was estimated with the use of Ellman's reagent (SERVA, Germany) on spectrophotometer (Saint-Petersburg, Russian Federation).

Results. The concentration of VEGF-A and the level of SH-groups increase on the 10th day and after 1 month in the group of patients operated on using a synthetic prosthesis. The level of NO metabolites, the concentration of VEGF-A, and the content of SH-groups increase statistically significantly and then decrease to the initial values in the group of patients operated on by reversed vein autovenous bypass procedure. In the group of patients operated on by the *in situ* method, the level of nitric oxide metabolites increases, the concentration of VEGF-A increases on the 10th day, the level of SH-groups increases, and a positive correlation was found between the content of SH-groups and the concentration of VEGF-A.

Conclusion. NO metabolites contribute to the build-up of SH groups and VEGF-A in patients operated by the "reversed vein" method, and in patients in the *in situ* group, the concentration of VEGF-A and the level of SH groups are not affected, which may be of clinical importance when prescribing NO donors.

The revealed patterns of change in the level of recovered thiols, nitrogen oxide metabolites, VEGF-A in combination with analysis of early and late postoperative complications make it possible to conclude the advantage of autovenous reconstruction of the femoropopliteal segment due to functional adaptation of the venous endothelium compared to the group of patients, operated on by the method of "synthetic prosthesis". Method *in situ* on biochemical and angiological indicators proved to be more favorable in terms of the clinical course, than the "reversed vein" method.

Key words: nitric oxide metabolites, vascular endothelial growth factor, protein and nonprotein thiol groups, autovenous reconstruction of lower limbs arteries, reperfusion endothelial injury.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. The research work is done with financial support from the Russian Foundation for Basic Research in the frame of scientific project № 18-315-00129 and scholarship of the President of Russian Federation to young researchers and postgraduate students conducting advanced research in priority fields of the Russian economic modernization № SP-2164.2018.4.

Conformity with the principles of ethics. All research participants gave personal informed consent approved by Ryazan State Medical University Ethics Committee (Protocol No. 1 of 16.10.2018).

For citation: Kalinin R.E., Abalenikhina Yu.V., Pshennikov A.S., Vinogradov S.A. The role of recovered thiols in venous endothel adaptation in case of autovenous reconstruction of lower limb arteries. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 86–93. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-86-93>.

ВВЕДЕНИЕ

Использование аутовенозного кондуита из большой подкожной вены (БПВ) остается приемлемым методом открытой реконструктивной сосудистой хирургии. В настоящее время аутовенозное шунтирование выполняется по методу реверсированной вены и методу *in situ*. Дискуссия о преимуществах и недостатках обеих методик не прекращается более полувека: по пути адаптации или дезадаптации пойдет трансформация аутовены?

В литературе описано предложение о возможности рассматривать концентрацию SH-групп как показатель адаптивных возможностей организма [1]. С 1960-х гг. выполнено большое количество клинических исследований, в которых получено снижение концентрации SH-групп в сыворотке крови больных при разных заболеваниях: сердечно-сосудистые расстройства [2], сахарный диабет [3], хроническая почечная недостаточность [4], алкогольный цирроз [5] и другие патологии [6]. Динамика изменений SH-групп на фоне аутовенозных реконструкций артерий нижних конечностей в условиях реперфузионного повреждения эндотелия может оказаться маркерным для прогнозирования адаптационной трансформации артериализованной вены.

Известно, что наиболее важным и ранним маркером повреждения интимы выступает эндотелиальная дисфункция, связанная, прежде всего, с угнетением продукции оксида азота (NO) – важнейшего регулятора тонуса сосудов [7, 8]. Оксид азота, вследствие своих функций, является универсальным ангиопротективным веществом, от которого зависят структурные изменения сосудистой стенки [9, 10]. Доказано, что NO способствует замедлению образования неointимы в зоне хирургических анастомозов артерии с синтетическим протезом у пациентов после операций [11], поэтому было выдвинуто предположение, что лечение препаратами, стимулирующими выработку NO, может оказывать ингибирующее действие на развитие рестеноза после операций [12], выступая одним из механизмов долгосрочной компенсации кровообращения. Поскольку NO является «короткоживущей» молекулой, многие его защитные свойства связаны не только с прямым действием, но и с

активируемыми им эндогенными протекторными системами, в частности с активацией васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) [13].

В связи с этим актуальным представляется изучение тиолового статуса и выявление корреляционных связей между содержанием SH-групп и уровнем метаболитов оксида азота, VEGF-A плазмы крови в сочетании с анализом ранних и поздних осложнений у пациентов с критической ишемией нижней конечности (КИНК) после аутовенозных реконструкций артерий бедренно-подколенного сегмента для оценки степени адаптации венозного эндотелия в условиях артериального русла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 54 больных с КИНК (III–IV стадия по классификации Покровского – Фонтейна), из них мужчин – 48 (88,9%), женщин – 6 (11,1%). Средний возраст составил ($64,6 \pm 6,6$) лет. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биопроб. Пациенты разделены на три группы в зависимости от типа трансплантата, используемого для реваскуляризации артерий бедренно-подколенного сегмента: группа А – синтетический протез, группа В – реверсированная вена и группа С – аутовенозное шунтирование по методу *in situ*. В качестве синтетического трансплантата во всех наблюдениях использовались конические протезы из политетрафторэтилена 4/8 мм. У больных с аутовенозной реваскуляризацией во всех наблюдениях использовалась ипсилатеральная большая подкожная вена. Клинические группы были сопоставимы по полу, возрасту, стадии заболевания, сопутствующей патологии, исходному минимальному диаметру БПВ, баллу оттока по Рутерфорду (табл. 1).

После оперативного лечения на 1-е, 10-е сут, через 1, 3 и 6 мес производился забор периферической венозной крови для определения исследуемых биохимических показателей.

Уровень метаболитов оксида азота (суммарную концентрацию нитратов и нитритов) определяли фотокolorиметрическим методом по развитию окраски в реакции диазотирования нитратом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса (НеваРеактив, Россия).

Таблица 1

Клиническая характеристика исследуемых групп			
Показатель	Группа А	Группа В	Группа С
Количество пациентов, <i>n</i>	18	18	18
Возраст, г, $M \pm m$	64,15 $\pm$ 6,5	64,9 $\pm$ 6,5	65,6 $\pm$ 6,9
Мужчины, <i>n</i> (%)	16 (88,9%)	16 (88,9%)	16 (88,9%)
Женщины, <i>n</i> (%)	2 (11,1%)	2 (11,1%)	2 (11,1%)
Стадия заболевания по классификации Покровского – Фонтейна			
III стадия, <i>n</i> (%)	11 (61,1%)	10 (55,6)	11 (61,1%)
IV стадия, <i>n</i> (%)	7 (38,9%)	8 (44,4)	7 (38,9%)
Сопутствующие заболевания			
Ишемическая болезнь сердца, <i>n</i> (%)	12 (66,7%)	11 (61,1%)	14 (77,8%)
Гипертоническая болезнь, <i>n</i> (%)	15 (83,3%)	16 (88,9%)	18 (100%)
Цереброваскулярные болезни, <i>n</i> (%)	4 (22,2%)	3 (16,7%)	5 (27,8%)
Исходная анатомо-морфологическая характеристика			
Диаметр БПВ по данным УЗДС, мм, $M \pm m$	–	3,5 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,7
Состояние путей оттока по Рутерфорду, балл, $M \pm m$	6,1 $\pm$ 1,1	6,7 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 1,6
Вид реконструкции артерий инфраингвинального сегмента			
Метод	Синтетический протез	Реверсированная вена	<i>In situ</i>
Выше щели коленного сустава	13 (72,2%)	10 (55,6%)	13 (72,2%)
Ниже щели коленного сустава	5 (27,8%)	8 (44,4%)	5 (27,8%)

Нитриты диазотируют сульфаниламид, и образующееся вещество вступает в реакцию азосочетания с нафтилэтилендиамином с образованием соединения розового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна суммарной концентрации нитритов и нитратов в образце [14]. Интенсивность окраски оценивали в видимой области спектра с регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 3200 (AwarenessTechnology, США) при длине волны 540 нм и выражали в нмоль/мг белка.

Определение активной формы человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (VEGF-A) осуществлялся путем иммуноферментного анализа на приборах Personal Lab (Италия) с использованием Human VEGF-A Platinum ELISA человеческий VEGF-A (BMS277/2) (БиоХимМак, г. Москва, Россия). Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации VEGF-A, присутствующего в образцах. Концентрация VEGF-A в образцах определяли с использованием стандартной кривой и выражали в пг/мл.

Уровень внутриклеточных и внеклеточных восстановителей оценивали по изменению содержания тиольных (SH-) групп, которые определяли с помощью реактива Элмана на спектрофотометре СФ-2000 (г. Санкт-Петербург, Россия) [15]. При реакции сульфгидрильных (тиоловых) групп с реактивом Элмана (5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота, SERVA, Германия) происходит разрыв дисульфидной связи в реактиве и образование 2-нитро-5-тиобензойной кислоты, которая при щелочных pH в воде переходит в хиноидную форму и имеет ярко-желтую

окраску. Образующийся тионитрофильный анион количественно определяется на спектрофотометре при 412 нм. Для расчета уровня восстановленных тиолов в плазме крови (в мкмоль/мл) коэффициент молярной экстинкции реактива Элмана принимали за 14150 М⁻¹ см⁻¹.

Статистический анализ результатов экспериментального исследования проводился с использованием программы Statistica 10.0. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка (*W*-критерий). Результаты представлены в формате $Me [Q_1; Q_3]$, где *Me* – медиана, *Q*₁ – первый квартиль (25%), *Q*₃ – третий квартиль (75%), средней арифметической и ее ошибки $M \pm m$. Для анализа статистической значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна – Уитни (*U*-тест). Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли критерий Краскела – Уоллиса. Для оценки ранговой корреляции использовали коэффициент Спирмена (*R*). Критический уровень статистической значимости различий нулевой гипотезы (*p*) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень метаболитов оксида азота статистически значимо не изменяется в группе А и возрастает в послеоперационном периоде в группах В и С.

В группах В и С уровень метаболитов NO статистически значимо возрастает на 1-е и 10-е сут, в период с 1-го по 6-й мес уровень оксида азота стабилен, но статистически значимо выше, чем до операции (рис. 1).

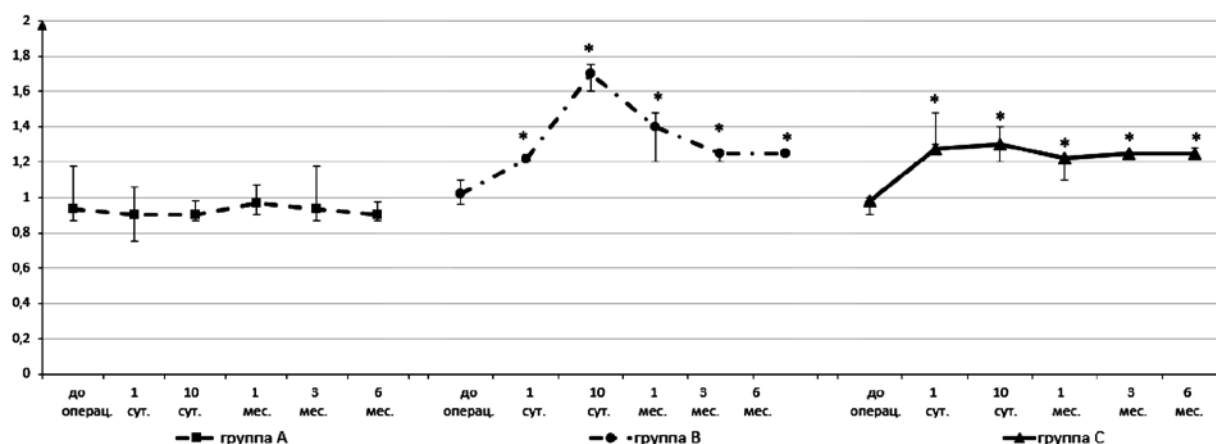


Рис. 1. Уровень метаболитов оксида азота (нмоль/мг белка) в плазме крови пациентов с КИНК до и после реконструкций артерий бедренно-подколенного сегмента, $Me [Q_1; Q_3]$

* $p < 0,05$ – статистически значимые отличия между значениями до операции и в послеоперационном периоде (здесь и на рис. 2, 3)

Любое оперативное вмешательство на артериях приводит к нарушению/повреждению целостности эндотелия, что вызывает воспаление с адгезией и агрегацией тромбоцитов, пролиферацией и миграцией гладкомышечных клеток в интиму. Повреждение эндотелия индуцирует продукцию синтазы оксида азота – 2 (NOS-2) в гладкомышечных клетках и эндотелии [16, 17], что может объяснять полученные результаты в группах В и С. Венозный кондуит из БКВ имеет функциональную эндотелиальную выстилку и реагирует как на местные, так и системные молекулярные и гемодинамические стимулы, регулируя сосудистый тонус и гомеостаз, что нельзя сказать о синтетическом протезе вследствие отсутствия в нем эндотелия, именно поэтому в группе А уровень метаболитов оксида азота не изменяется (см. рис. 1).

Наряду с изменением уровня метаболитов оксида азота сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF является одним из наиболее хорошо изученных показателей ангиогенеза, указывающим на

тяжесть поражения [18]. Доказано, что VEGF обеспечивает нормальный рост и развитие организма, заживление ран. Однако высокие уровни VEGF были выявлены при развитии раковых опухолей и ревматоидном артрите [19].

Концентрация активной формы человеческого VEGF-A в экспериментальной группе А статистически значимо возрастает с 1-х сут до 6 мес, достигая максимума на 10-е сут. В экспериментальной группе В количество VEGF-A статистически значимо возрастает через 1 мес относительно значений до операции. В группе С статистически значимо возрастает на 10-е сут после операции и снижается в период с 1-го по 6-й мес относительно значений до операции.

Известно, что выживаемость пациентов с высоким уровнем VEGF значительно ниже, чем у больных с низкой экспрессией VEGF-A [18], поэтому полученные результаты указывают на положительную тенденцию при аутовенозном шунтировании по методике *in situ*.

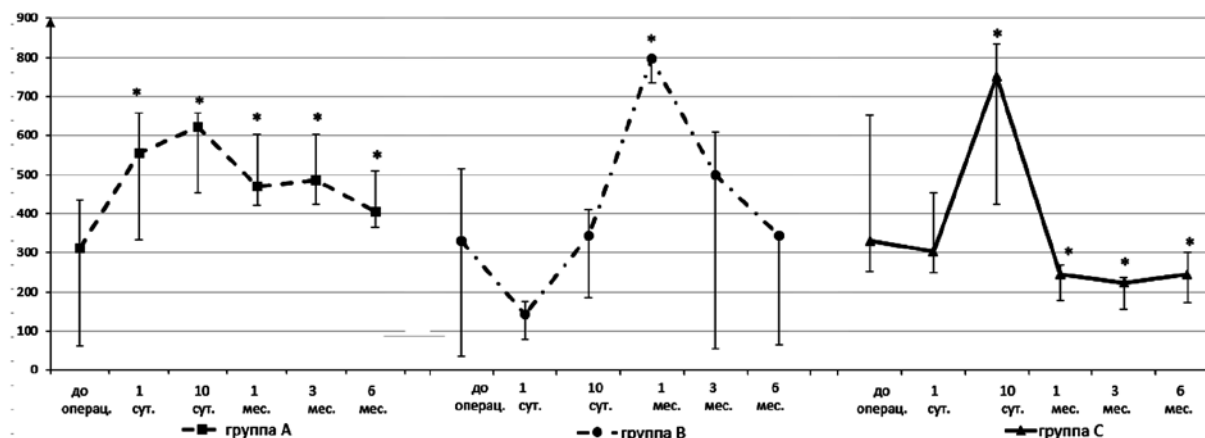


Рис. 2. Концентрация активной формы VEGF-A (пг/мл) в плазме крови пациентов с КИНК до и после реконструкций артерий бедренно-подколенного сегмента, $Me [Q_1; Q_3]$

После оперативного вмешательства восстановление организма сопровождается адаптацией к новым условиям. В настоящее время тиолсодержащие соединения (молекулы, имеющие в своем составе -SH-группы) рассматривают не только как новый маркер окислительного стресса, но и показатель го-

меостаза и адаптации в патофизиологических условиях [20].

Уровень восстановленных тиолов в плазме крови пациентов групп А и В увеличивается на 10-е сут и через 1 мес, в группе С – статистически значимо возрастает в период с 10-х сут по 6-й мес (рис. 3).

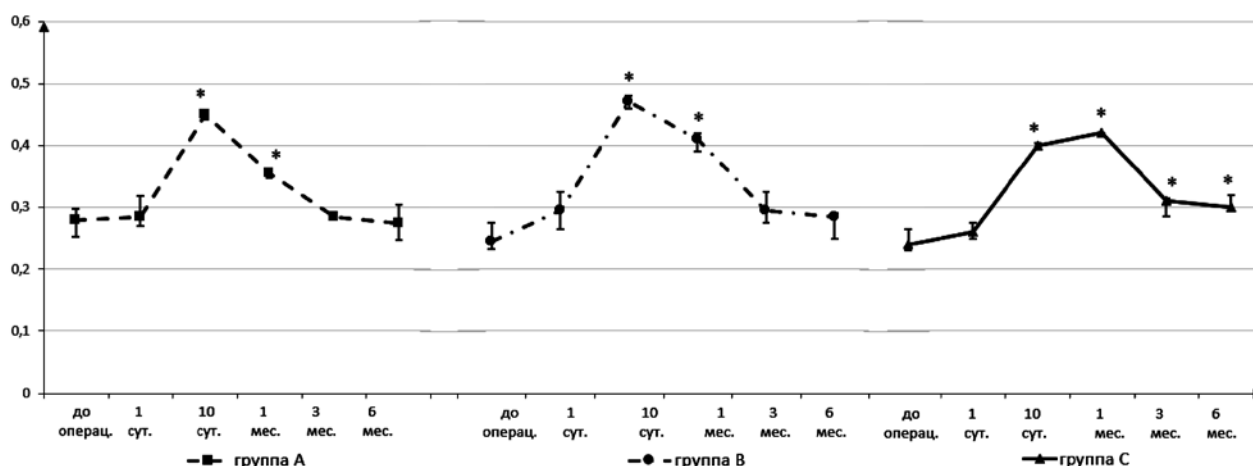


Рис. 3. уровень восстановленных тиолов (мкмоль/мл) в плазме крови пациентов с КИНК до и после реконструкции артерий бедренно-подколенного сегмента, $Me [Q_1; Q_3]$

Степень адаптации напрямую зависит от концентрации тиолов: чем выше степень адаптации, тем выше уровень SH-групп в сыворотке крови. Из этого следует, что функциональная адаптация венозного эндотелия выше у пациентов, оперированных по методу *in situ*, по сравнению с методом реверсированной вены.

Тиолы способны образовывать обратимые смешанные дисульфидные связи между белковыми и низкомолекулярными SH-группами. Полученные результаты в группе пациентов С указывают на то, что окислительный стресс снижается, дисульфидные связи снова восстановлены до тиоловых групп и тиол-дисульфидный гомеостаз сохраняется, а устой-

чивость организма к реконструктивной хирургии повышается.

Отклонения в тиол-дисульфидном гомеостазе могут играть существенную роль в качестве биомаркера в развитии патофизиологических состояний. У пациентов в группах А и В после мобилизации защитных реакций организма, которые выражаются в повышении уровня тиолов, наблюдается их снижение до исходного уровня, что указывает на адаптацию или компенсацию без истощения.

Полученные биохимические результаты подтверждают клинические наблюдения, приведенные в табл. 2.

Таблица 2

Клиническая характеристика ранних и поздних осложнений у пациентов в исследуемых группах			
Параметр	Группа А	Группа В	Группа С
Ближайшие результаты (до 30 сут)			
Тромбоз, n (%)	2 (10%)	2 (10%)	1 (4,5%)
Первичная проходимость, %	90	90	95,5
Вторичная проходимость, %	90	95	100
Сохранение конечности, %	90	95	95,5
Большие ампутации, n (%)	2 (10%)	1 (5%)	1 (4,5%)
Малые ампутации, n (%)	1 (5%)	5 (25%)	2 (9%)
Отдаленные результаты (6 мес)			
Тромбоз, n (%)	4 (20%)	3 (15%)	1 (4,5%)
Первичная проходимость, %	70	75	91
Вторичная проходимость, %	75	80	95,5
Сохранение конечности, %	80	85	95,5
Большие ампутации, n (%)	2 (10%)	2 (10%)	0
Малые ампутации, n (%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (4,5%)

С позиции ранних и поздних послеоперационных осложнений пациенты группы С имеют более благоприятную клиническую картину, на что указывает высокий процент первичной и вторичной проходности шунтов, снижение летальности, повышение степени сохранения конечности. Самый неблагоприятный послеоперационный период по перечню заявленных ангиологических признаков у пациентов в группе А (см. табл. 2).

Интересно, что по биохимическим показателям в группе В выявлены положительные корреляционные

взаимосвязи: чем выше уровень метаболитов оксида азота, тем выше количество VEGF-A и SH-групп. У пациентов группы С получена положительная корреляционная взаимосвязь между количеством VEGF-A и свободными тиолами, независимо от уровня метаболитов оксида азота (табл. 3). Таким образом, в группе В метаболиты NO способствуют нарастанию SH-групп и VEGF-A, а в группе С не влияют на концентрацию VEGF-A и уровень SH-групп, что может иметь клиническое значение при назначении доноров NO.

Таблица 3

Коэффициент корреляции R между уровнем метаболитов оксида азота, VEGF-A, SH-группами у пациентов до операции и в послеоперационный период в исследуемых группах			
Показатель	Группа А	Группа В	Группа С
Метаболиты NO/VEGF-A	$R = 0,1; p > 0,05$	$R = 0,47; p < 0,01$	$R = 0,15; p > 0,05$
Метаболиты NO/SH-группы	$R = 0,15; p > 0,05$	$R = 0,48; p < 0,01$	$R = 0,065; p > 0,05$
VEGF-A/SH-группы	$R = 0,40; p < 0,01$	$R = 0,35; p < 0,01$	$R = 0,41; p < 0,01$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные закономерности изменения уровня восстановленных тиолов, метаболитов оксида азота, VEGF-A у пациентов с КИНК свидетельствуют об адаптации венозного эндотелия в условиях артериального русла при аутовенозной реконструкции бедренно-подколенного сегмента по сравнению с группой пациентов, оперированных с использованием синтетического протеза, что подтверждает анализ ранних и поздних послеоперационных осложнений. Метод *in situ* по биохимическим и ангиологическим показателям демонстрирует развитие более благоприятной клинической картины, чем метод реверсированной вены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Земцова И., Станкевич Л. Роль тиоловых соединений в поддержании окислительного гомеостаза в процессе спортивной подготовки. *Наука в олимпийском спорте*. 2015; 2: 37–44.
2. Mangoni A.A., Zinellu A., Carru C., Attia J.R., McEvoy M. Serum thiols and cardiovascular risk scores: a combined assessment of transsulfuration pathway components and substrate/product ratios. *J. Transl. Med.* 2013; 11: 99. DOI: 10.1186/1479-5876-11-99.
3. Emmelien E.M., Pasch A., Feelisch M., Waanders F., Hendriks S.H., Mencke R., Harms G., Groenier K.H., Bilo H.J.G., Hillebrands J.-L., Goor H., Dijk P.R. Serum free thiol in type 2 diabetes mellitus: A prospective study. *J. Clin. Transl. Endocrinol.* 2019; 16: 100182. DOI: 10.1016/j.jcte.2019.100182.
4. Otal Y., Şener A., Demircan S., Alisik M. Acute renal failure and thiol-disulfide homeostasis. *J. Nephrol. Ther.* 2018; 8: 312. DOI: 10.4172/2161-0959.1000312.
5. Mungli P., Jeevan K., Sudeshna T. Serum total thiol status in

- alcohol abusers. *Asian Journal of Biochemistry*. 2008; 34 (1): 8–51. DOI: 10.3923/ajb.2008.48.51.
6. Rodosskaia N.K., Chernousova G.M. Immune system and thiols: some peculiarities of thioexchange. *Compimmunol. Microbiol. Infect.* 2010; 33 (1): 65–71. DOI: 10.1016/j.cim.2008.08.001.
7. Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115 (10): 1285–1295. DOI: 10.1161/CIRCULATION-AHA.106.652859.
8. Morin F.C., Beierwaltes W.H., Solhaug M., Feld L.G., Waz W.R. Nitric oxide: from molecular biology to clinical nephrology. *Pediatr. Nephrol.* 1998; 12 (6): 504–511.
9. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства. *Терапевтический архив*. 2005; 77 (1): 82–87.
10. Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Petřivalský M. Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Sci.* 2013; 207: 57–65. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.02.010.
11. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Никифоров А.А., Пшенников А.С. Динамика некоторых биохимических показателей у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в различные сроки после реконструктивных операций. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. 2012; 20 (1): 42–45.
12. Сучков И.А., Пшенников А.С., Герасимов А.А., Агапов А.Б., Камаев А.А. Профилактика рестеноза в реконструктивной хирургии магистральных артерий. *Наука молодых – Eruditio Juvenium*. 2013; 2: 12–19.
13. Dulak J., Józkowicz A., Dembinska-Kiec A., Guevara I., Zdzenicka A., Zmudzinska-Grochot D., Florek I., Wójtowicz A., Szuba A., Cooke J.P. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular

- smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20 (3): 659–666. DOI: 10.1161/01.atv.20.3.659.
14. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005; 6: 15–18.
 15. Hu M.L. Measurements of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymology*. 1994; 233: 381–385.
 16. Воробьев Р.И. К вопросу исследования функции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика (приложение)*. 2006; 5 (6): 76–77.
 17. Курьянов П.С., Разуваев А.С., Вавилов В.Н. Гиперплазия интимы в зоне сосудистого анастомоза. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2008; 14 (4): 146–151.
 18. Светозарский Н.Л., Артифексова А.А., Светозарский С.Н. Фактор роста эндотелия сосудов: биологические свойства и практическое значение. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2015; 5: 24.
 19. Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Адамян Л.В., Огнерубов Н.А. Фактор роста эндотелия сосудов – клинически значимый показатель при злокачественных новообразованиях. *Вестник ТГУ*. 2014; 19 (1): 10–20.
 20. Asoğlu M., Kiliçaslan F., Beginoğlu Ö., Fedai Ü., Akil Ö., Çelik H., Büyükaslan H. Thiol/disulphide homeostasis as a new oxidative stress marker in untreated patients with generalized anxiety disorder. *Anatolian Journal of Psychiatry*. 2018; 19 (2): 143–149. DOI: 10.5455/apd.261956.

Вклад авторов

Калинин Р.Е. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Абаленихина Ю.В., Пшенников А.С., Виноградов С.А. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи. Абаленихина Ю.В. – проведение биохимических анализов. Пшенников А.С., Виноградов С.А. – курация пациентов в отделении сосудистой хирургии ОКБ г. Рязани, лечение и хирургическая коррекция магистрального кровотока, забор биологического материала у пациентов.

Сведения об авторах

Калинин Роман Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор, ректор, зав. кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, РязГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань. ORCID 0000-0002-0817-9573.

Абаленихина Юлия Владимировна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биологической химии с курсом КЛД, РязГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань. ORCID 0000-0003-0427-0967.

Пшенников Александр Сергеевич, д-р мед. наук, доцент, декан лечебного факультета, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, РязГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань. ORCID 0000-0002-1687-332X.

Виноградов Сергей Андреевич, аспирант, кафедра сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, РязГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань. ORCID 0000-0001-8547-4798.

(✉) Абаленихина Юлия Владимировна, e-mail: abalenihiina88@mail.ru.

Поступила в редакцию 06.09.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Оказывает ли влияние изменение нейротрансмиссивного статуса мозга на рост перевивной меланомы?

Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Сурикова Е.И.,
Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д., Котиева И.М.

Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) онкологии
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить влияние особенностей аминергического статуса головного мозга у мышей при нокауте гена урокиназы и хронической нейрогенной боли (ХНБ) на развитие меланомы B16/F10.

Материалы и методы. Работа выполнена на самках мышей ($n = 68$) C57BL/6 – с полноценным геном урокиназы (+uPA) и C57BL/6-PlautmI.IBug-This Plau6FDhu/GFDhu – с нокаутом гена урокиназы (–uPA). Животным моделировали состояние ХНБ, через 14 сут подкожно перевивали меланому B16/F10. Забой производили через 21 сут после перевивки. В головном мозге определяли содержание адреналина (А), норадреналина (НА), дофамина (ДА), гистамина (Г), серотонина (5НТ), 5-оксииндолуксусной кислоты (5ОИУК) с помощью иммуноферментных стандартных тест-систем (Cusabio, Китай).

Результаты. У самок (+uPA) ХНБ приводила к снижению содержания практически всех исследованных биогенных аминов (БА). У самок (–uPA), напротив, отмечался рост концентрации НА, ДА, 5НТ и снижение Г. Обнаружено увеличение уровня 5ОИУК при ХНБ и нокауте. У самок (+uPA) с ХНБ снижался уровень 5НТ, но сохранялось его физиологическое содержание у мышей с нокаутом. Через 3 нед роста опухоли на фоне ХНБ у мышей (+uPA) обнаружено увеличение уровня всех изученных БА, кроме 5ОИУК, по сравнению с уровнем у мышей только с ХНБ. У мышей (–uPA) в аналогичной группе было увеличение только гистамина.

Заключение. ХНБ приводила к угнетению А-, НА-, Г-, 5НТ-ергических систем мозга мышей, а при нокауте гена урокиназы наблюдались противоположные эффекты, за исключением Г-ергической системы. Сочетание ХНБ и меланомы у самок мышей (+uPA) приводило к активации всех изученных систем БА, а у самок (–uPA) – только Г-ергической системы. Стрессорное воздействие – ХНБ, генетическое нарушение (нокаут гена урокиназы), способствовали изменению функционирования систем БА мозга, разнонаправленно влияя на противоопухолевые механизмы.

Ключевые слова: меланома, хроническая нейрогенная боль, нокаут гена урокиназы uPA, мыши, головной мозг, биогенные амины.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено биоэтическим комитетом по работе с животными Ростовского научно-исследовательского онкологического института (протокол № 4 от 10.08.2018).

Для цитирования: Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д., Котиева И.М. Оказывает ли влияние изменение нейротрансмиссивного статуса мозга на рост перевивной меланомы? *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 94–101. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-94-101>.

Does change in neurotransmitter brain status affect the growth of transplantable melanoma?

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Kotieva I.M.

National Medical Research Centre for Oncology
63, 14 Liniya Str., Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. Studying the influence of the features of aminergic brain status on the development of B16/F10 melanoma in mice with urokinase gene knockout and chronic neurogenic pain (CNP).

Material and methods. The study included female ($n = 68$) C57BL/6 mice with the normal urokinase gene (+*uPA*) and C57BL/6-PlautmI.Bug-This Plau6FDhu/GFDhu mice with urokinase gene knockout (–*uPA*). The model of CNP was created in the animals, and in 14 days B16/F10 melanoma was transplanted. The mice were euthanized 21 days after the transplantation. Levels of adrenaline (A), noradrenaline (NA), dopamine (DA), histamine (H), serotonin (5HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) were determined in the brain using standard ELISA test systems (Cusabio, China).

Results. CNP in (+*uPA*) females resulted in the reduction of almost all studied biogenic amines (BA). On the opposite, (–*uPA*) females showed an increase in NA, DA, 5HT and a decrease of H. 5HIAA increased in both CNP and gene knockout. 5HT in (+*uPA*) females with CNP decreased, while its physiological level in gene knockout mice was maintained. After 3 weeks of tumor growth in animals with CNP, (+*uPA*) mice demonstrated increased levels of studied BA (except for 5HIAA) compared to mice with CNP alone. Only H increase was observed in (–*uPA*) mice from the similar group.

Conclusion. CNP in mice inhibited A-, NA-, H- and 5HT-ergic systems of the brain; the opposite effects were registered in urokinase gene knockout, except for the H-ergic system. Combination of CNP and melanoma in (+*uPA*) female mice activated all studied BA systems, and in (–*uPA*) females – H-ergic system only. Different stressful effects, CNP, and genetic disorders (urokinase gene knockout) contributed to changes in the brain BA system functions, leading to the activation of pro- or antitumor mechanisms.

Key words: B16/F10 melanoma, melanoma course, chronic neurogenic pain, *uPA* urokinase gene knockout, mice, brain, biogenic amines.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the National Medical Research Center for Oncology, Bioethical Committee for Working with Animals (Protocol No. 4 of 10.08.2018).

For citation: Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Surikova E.I., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Kotieva I.M. Does change in neurotransmitter brain status affect the growth of transplantable melanoma? *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 94–101. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-94-101>.

ВВЕДЕНИЕ

Мозг включает в себя уникальную микросреду, которая поддерживает физиологический гомеостаз и реагирует на патологические изменения, включая рак [1]. Клетки кожи, воспринимающие как внешние, так и внутренние изменения и участвующие в регуляции гомеостаза организма, способны влиять на системные регуляторы и, в частности, нейроаминный статус мозга [2]. Наличие тесной связи между клетками

кожи и нейронами головного мозга подтверждается исследованиями при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, в частности болезни Паркинсона [3], а также психические расстройства часто сочетаются с хроническими кожными заболеваниями и меланомой [4, 5]. Многофункциональные биогенные амины модулируют ответ центральной регуляторной системы на различные внутренние и внешние влияния, участвуют в реакции организма на стресс, играя решающую роль в поддержании гомеостаза [6].

В ряде работ показано, что стресс может оказывать тормозящее влияние на рост опухоли посредством воздействия нейромедиаторов на гипоталамус и иммунную систему [7]. Разрозненные экспериментальные данные свидетельствуют о роли биогенных аминов мозга в противоопухолевой защите [8, 9]. При остром и хроническом стрессе в мозге изменяется уровень гистамина, который регулирует секрецию гормонов гипоталамуса, передней доли гипофиза, модулирует влияние некоторых трансмисмиттеров [10], играет важную роль при множественных заболеваниях центральной нервной системы [11]. Сопутствующие опухолевому росту коморбидные заболевания связаны с различиями в лечении, клиническом ведении, прогнозе, выживаемости, прогрессировании рака, а также способны вызывать более высокий риск осложнений и снижения качества жизни.

Несмотря на важность учета коморбидных заболеваний, связи между меланомой и сопутствующей патологией уделяется мало внимания [12]. Если влияние хронической нейрогенной боли (ХНБ) на трансмисмиттерный статус мозга не вызывает сомнений [13, 14], то связь нокаута по гену урокиназы и баланса биогенных аминов мозга не столь очевидна. Имеются экспериментальные данные о существенной роли активаторов плазминогена в процессах восстановления мозга после ишемического повреждения [15]. Модели животных с повреждением нервов, вызывающих хроническую нейропатическую боль, а также животные с измененным генотипом позволяют исследовать множественные изменения, происходящие в основных регуляторных системах, а также их возможное влияние на развитие опухолевого процесса.

Цель работы – изучить влияние особенностей аминергического статуса головного мозга у мышей при нокауте гена урокиназы и хронической нейрогенной боли на развитие меланомы B16/F10.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самках мышей ($n = 68$). Все животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Мыши линии C57BL/6 ($n = 34$) – с полноценным геном урокиназы (+uPA), получены из Научного центра биомедицинских технологий «Андреевка». Животные линии C57BL/6-Plautm.I.Bug-This Plau6FDhu/GFDhu ($n = 34$) – с нокаутом гена уроки-

назы (–uPA) (целевая мутация с получением белка, неспособного связываться с рецептором активатора плазминогена урокиназного типа), получены из питомника лабораторных животных «Пушино».

Животные были разделены на восемь групп: интактные самки (+uPA) ($n = 7$); самки (+uPA) с ХНБ ($n = 9$); интактные самки (–uPA) ($n = 7$); самки (–uPA) с ХНБ ($n = 9$); самки (+uPA) с меланомой ($n = 9$); самки (+uPA) с ХНБ и меланомой ($n = 9$); самки (–uPA) с меланомой ($n = 9$); самки (–uPA) с ХНБ и меланомой ($n = 9$).

Моделирование ХНБ перевязкой седалищного нерва с обеих сторон, процедура подкожной перевивки меланомы B16/F10 в правую подлопаточную область, ход эксперимента и подготовка 10%-х цитозольных фракций описаны ранее [13]. В работе использовали мышиную меланому B16/F10, полученную из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Пролиферативный пул опухоли – 71,6%. Материал для перевивки меланомы B16/F10 получали от мышей-доноров (+uPA) линии C57BL/6, второй пассаж, на 12–16-е сут развития опухолей. Забой животных с опухолью проводили через 21 сут после перевивки меланомы. Из выделенного головного мозга получали 10%-е цитозольные фракции, приготовленные на 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, все манипуляции проводили на льду. В полученных образцах с помощью стандартных тест-систем методом иммуноферментного анализа определяли содержание биогенных аминов – адреналина (А), норадреналина (НА), дофамина (ДА), гистамина (Г), серотонина (5НТ), 5-оксииндоуксусной кислоты (5ОИУК) (Cusabio, Китай).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы Statistica 10,0, определяли средние значения и стандартные ошибки ($M \pm m$). Значимость различий средних показателей оценивали с помощью *U*-критерия Манна – Уитни и *t*-критерия Стьюдента (после проверки на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка). Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сначала провели исследование влияния ХНБ, нокаута по урокиназе и их сочетания на содержание биогенных аминов в мозге самок мышей. Результаты исследования биогенных аминов в мозге у самок (+uPA) с ХНБ показали снижение уровня адреналина в 2,4 раза, норадреналина – в 2,3; гистамина – в 2,1 и серотонина в 1,9 раза ($p < 0,05$) на фоне повышения 5ОИУК в 3,3 раза, по сравнению с показателями у интактных самок (+uPA) (таблица). Содержание дофамина в мозге у самок (+uPA) под влиянием ХНБ

не изменилось, однако в 2,3 раза повысилось соотношение ДА/НА, в 1,3 раза ($p < 0,05$) снизилось А/5НТ и в 4,8 раза – 5НТ/5ОИУК.

Нокаут по гену урокиназы у самок мышей не оказал влияния на содержание в мозге адреналина и серотонина, в 3,2 раза повысил уровень норадреналина, в 2,9 – дофамина, в 2,0 раза – 5ОИУК, но в 2,1 раза снизил содержание гистамина (см. таблицу). В результате коэффициент соотношения 5НТ/5ОИУК снизился

в 2,5 раза, соотношение ДА/НА и А/5НТ не отличалось от показателей у интактных самок (+uPA).

Моделирование ХНБ у самок (–uPA) привело к уменьшению уровня НА и ДА в мозге в 1,5 раза по сравнению с самками (–uPA) без боли ($p < 0,05$), однако относительно самок (+uPA), как интактных, так и на фоне ХНБ, концентрация этих нейромедиаторов была выше: НА – в 1,7 и 4 раза соответственно, ДА – в 2 раза ($p < 0,05$).

Таблица

Содержание биогенных аминов в мозге самок мышей линии C57Bl/6, $M \pm m$

Показатель	Интактные (+uPA)	(+uPA) + меланома B16/F10	(+uPA) + ХНБ	(+uPA) + ХНБ + меланома B16/F10	Интактные (–uPA)	(–uPA) + меланома B16/F10	(–uPA) + ХНБ	(–uPA) + ХНБ + меланома B16/F10
Адреналин, нг/г тк	8,5 ± 0,7	9,0 ± 0,8	3,5 ± 0,3 ¹	5,0 ± 0,6 ^{1,3,4}	8,6 ± 0,85	7,4 ± 0,69 ⁴	8,6 ± 0,82 ³	8,1 ± 0,78
Норадреналин, нг/г тк	19,4 ± 1,8	23,2 ± 2,2	8,5 ± 1,1 ¹	18,9 ± 2,0 ³	61,4 ± 5,9 ¹	40,3 ± 0,38 ^{2,4}	33,7 ± 3,1 ^{2,3}	37,0 ± 3,2
Дофамин, нг/г тк	17,5 ± 1,8	31,0 ± 3,1 ¹	17,9 ± 1,5	25,0 ± 2,2 ^{1,3}	50,0 ± 4,7 ¹	33,4 ± 0,31 ²	35,8 ± 3,4 ^{2,3}	41,2 ± 3,9
Гистамин, нг/г тк	34,9 ± 3,2	30,4 ± 2,9	16,6 ± 1,2 ¹	33,5 ± 2,9 ³	16,4 ± 1,5 ¹	34,0 ± 0,32 ²	18,9 ± 1,6	28,2 ± 2,7 ⁵
Серотонин, нг/г тк	0,43 ± 0,03	0,97 ± 0,05 ¹	0,23 ± 0,02 ¹	0,4 ± 0,03 ^{3,4}	0,35 ± 0,03	1,9 ± 0,15 ^{2,4}	1,2 ± 0,11 ^{2,3}	1,2 ± 0,10 ⁶
5-ОИУК, мкг/г тк	0,15 ± 0,03	0,23 ± 0,03 ¹	0,5 ± 0,03 ¹	0,2 ± 0,01 ^{1,3}	0,3 ± 0,03 ¹	0,4 ± 0,03 ^{2,4}	0,5 ± 0,04 ²	0,4 ± 0,03
А/5НТ	19,77 ± 1,4	9,28 ± 0,73 ¹	15,22 ± 1,2 ¹	12,5 ± 1,2 ^{1,4}	26,1 ± 0,24 ¹	3,89 ± 0,35 ^{2,4}	7,17 ± 0,69 ^{2,3}	6,75 ± 0,66 ⁶
5НТ/5ОИУК	2,9 ± 0,25	4,22 ± 0,39 ¹	0,6 ± 0,05 ¹	2,0 ± 0,18 ^{1,3,4}	1,1 ± 0,09 ¹	4,75 ± 0,47 ²	2,4 ± 0,18 ^{2,3}	3,0 ± 0,03 ⁶
ДА/НА	0,9 ± 0,08	1,34 ± 0,12 ¹	2,1 ± 0,20 ¹	1,32 ± 0,13 ^{1,3}	0,81 ± 0,07	0,83 ± 0,08	1,06 ± 0,09 ³	1,11 ± 0,1

Примечание. Статистически значимые различия по сравнению со следующими группами животных: 1 – интактными (+uPA); 2 – интактными (–uPA); 3 – (+uPA) + ХНБ; 4 – (+uPA) + меланома B16/F10; 5 – (–uPA) + ХНБ; 6 – (–uPA) + меланома B16/F10.

У самок (–uPA) ХНБ вызвала снижение уровня гистамина в 1,8 раза по сравнению с интактными животными (–uPA) и (+uPA) ($p < 0,05$), без статистически значимых отличий по сравнению с показателями у самок (+uPA) с ХНБ. При этом установлено повышение содержания серотонина в среднем в 3 раза по сравнению с интактными животными (–uPA) и (+uPA) и в 5,2 раза – по сравнению с самками (+uPA) с ХНБ ($p < 0,05$). Моделирование ХНБ у мышей (–uPA) привело к повышению концентрации в мозге 5ОИУК в 1,7 и в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными (–uPA) и (+uPA) соответственно, при этом по сравнению с самками (+uPA) с ХНБ значимых отличий не выявлено. В результате соотношение А/5НТ в мозге снизилось более чем в 3,4 и в 2,8 раза по сравнению с интактными самками (–uPA) и (+uPA) и в 2,1 раза по сравнению с самками (+uPA) с ХНБ, а соотношение между серотином и его метаболитом 5ОИУК не отличалось от интактных (+uPA), но оказалось в 2,2 раза выше чем у интактных (–uPA) и в 4 раза, чем у самок (+uPA) с

ХНБ. Коэффициент ДА/НА в мозге у самок (–uPA) с ХНБ не имел значимых отличий от интактных (–uPA) и (+uPA), но оказался в 2 раза ниже, чем у самок (+uPA) с ХНБ.

Нокаут по гену урокиназы и ХНБ способствовали изменению биогенного статуса мозга, причем разнонаправленно. Если у самок (+uPA) ХНБ вызывала понижение уровня А и НА, то нокаут по гену урокиназы, напротив, приводил к росту содержания НА и ДА, но не влиял на показатели А. Развитие ХНБ у самок (–uPA) сопровождалось не только снижением уровня НА в мозге, как и у самок (+uPA) на фоне ХНБ, но и ДА, однако уровни этих катехоламинов оставались значительно выше, чем у самок с нормальным геномом как без, так и в сочетании с ХНБ.

Только у самок (–uPA) соотношение А/5НТ в мозге было выше показателей у самок (+uPA). ХНБ как в самостоятельном, так и в сочетании с нокаутом вариантах снижала соотношение А/5НТ. Следует отметить, что у самок любое из оказанных воздействий – ХНБ, нокаут по гену урокиназы, самостоятельный

или в сочетании с ХНБ – приводило к повышению в мозге уровня 5ОИУК – метаболита серотонина, а также к снижению концентрации гистамина.

Ранее нами установлено, что ХНБ у мышей с нормальным геномом оказывала стимулирующее действие на развитие перевивной меланомы, которое выражалось в снижении продолжительности жизни и латентного периода, а также в более активном метастазировании в неспецифические сайты на фоне меньшего объема опухоли [13]. Развитие перевивной меланомы у мышей с нокаутом по гену *uPA* отличалось меньшими объемами опухолей и отсутствием метастазирования через 3 нед на фоне отсутствия отличий в продолжительности жизни и латентного периода. У самок мышей с нокаутом по гену урокиназы и ХНБ с перевивной меланомой фиксировалась меньшая продолжительность жизни, характерная для животных с ХНБ и опухолевым ростом, однако с большим латентным периодом [16].

Учитывая разнонаправленные изменения в нейротрансмиттерном статусе головного мозга у самок мышей под влиянием ХНБ и нокаута по гену урокиназы, а также различия в протекании у них злокачественного процесса, проведено исследование содержания биогенных аминов в мозге у самок мышей с ХНБ, нокаутом по гену урокиназы и их сочетанием через 3 нед роста перевивной меланомы B16/F10.

В качестве контроля сначала исследовали уровень биогенных аминов у самок мышей (*+uPA*) с самостоятельно развивающейся меланомой (без сопутствующей ХНБ). Через 3 нед роста меланомы B16/F10 уровень дофамина в мозге повысился в 1,8 раза ($p < 0,05$), серотонина – в 2,3 и 5 ОИУК – в 1,5 раза ($p < 0,05$), содержание норадреналина, гистамина и адреналина не имело значимых отличий от показателей у интактных (*+uPA*) самок (см. таблицу). В результате соотношение А/5НТ снизилось в 2,1 раза, а 5НТ/5ОИУК и ДА/НА повысилось в 1,5 раза ($p < 0,05$).

У самок (*+uPA*) с ХНБ через 3 нед роста меланомы в мозге повысился уровень адреналина и дофамина в 1,4 раза ($p < 0,05$), норадреналина – в 2,2; гистамина – в 2,0 и серотонина в 1,3 раза ($p < 0,05$), на фоне снижения содержания 5ОИУК в 2,5 раза, по сравнению с показателями в мозге у самок (*+uPA*) только с ХНБ (см. таблицу). В результате соотношение А/5НТ не отличалось от показателей в мозге у самок (*+uPA*) только с ХНБ, 5НТ/5ОИУК было выше в 3,3 раза, а ДА/НА напротив, в 1,6 раза ($p < 0,05$) ниже. Следует отметить, что по сравнению с показателями содержания аминов у животных со стандартной перевивкой меланомы также установлены различия – более низкий уровень адреналина, серотонина и соотно-

шения 5НТ/5ОИУК – в 1,8 раза ($p < 0,05$), в 2,4 и в 2,1 раза соответственно (см. таблицу).

Уровень катехоламинов в мозге мышей (*-uPA*) через 3 нед после перевивки опухоли снизился: адреналина – в 1,2 раза ($p < 0,05$), норадреналина и дофамина – в 1,5 раза ($p < 0,05$), а гистамина, серотонина и 5ОИУК, напротив, повысился в 2,1; 5,8 и в 1,3 раза ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с самками (*-uPA*). При этом соотношение А/5НТ оказалось ниже в 6,7 раза, а 5НТ/5ОИУК выше в 4,3 раза. Следует отметить, что по сравнению с показателями у самок (*-uPA*) с меланомой без сопутствующей ХНБ, в мозге у мышей (*-uPA*) было выше содержание НА в 1,7 раза ($p < 0,05$), серотонина в 2,0 раза, 5 ОИУК в 1,7 раза ($p < 0,05$), но ниже соотношение А/5НТ в 2,4 раза и ДА/НА в 1,6 раза ($p < 0,05$).

Рост меланомы у самок мышей с нокаутом гена урокиназы и ХНБ характеризовался низкой продолжительностью жизни – в 1,6 раза ($p < 0,05$) меньше, чем у самок с нокаутом гена урокиназы без ХНБ, но в 1,7 раза ($p < 0,05$) большим латентным периодом. При этом в мозге самок (*-uPA*) с ХНБ через 3 нед роста меланомы выявлено только повышение в 1,5 раза ($p < 0,05$) уровня гистамина, по сравнению с показателями в мозге у самок (*-uPA*) с ХНБ без перевивки опухоли (см. таблицу). Основным отличием по сравнению с нейротрансмиттерным статусом у самок (*-uPA*) с меланомой через 3 нед роста опухоли оказался сниженный в 1,6 раза ($p < 0,05$) уровень серотонина, в результате чего в 1,7 раза ($p < 0,05$) повысилось соотношение А/5НТ и в 1,6 раза ($p < 0,05$) снизилось 5НТ/5ОИУК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие перевивной меланомы сопровождается нарушением центральных регуляторных механизмов, при этом особенности развития опухоли могут зависеть от первоначального статуса и реактивности аминергических систем головного мозга. В ходе настоящего исследования установлено, что рост меланомы при стандартной перевивке самкам мышей через 3 нед эксперимента приводил к дисбалансу дофаминергической и норадренергической систем, с превалированием первой, а также к активации серотонинергической системы, выражающейся в повышении уровня как серотонина, так и его метаболита.

Прежде всего, обращает на себя внимание тот факт, что ХНБ у самок (*+uPA*) и нокаут по гену урокиназы в самостоятельных вариантах по-разному влияют на адренергическую, норадренергическую и серотонинергическую системы, но одинаково на гистаминергическую. Из полученных результатов видно, что у самок (*+uPA*) ХНБ приводит к снижению

в мозге практически всех исследованных биогенных аминов, результатом чего является нарушение основных механизмов центральной регуляции. Нокаут по гену урокиназы напротив, активирует норадренергическую, серотонинергическую и дофаминергическую системы в мозге у самок, а также изменяет соотношение биогенных аминов.

Модель хронической нейрогенной боли является моделью хронического пролонгированного стресса, в то время как животные с нокаутом по урокиназе, хотя и имеют генетически детерминированное нарушение, фенотипически не отличаются от мышей линии C57BL/6 (*+uPA*) [15]. Известно, что урокиназа и ее рецептор в большом количестве обнаруживаются в развивающемся мозге [17], однако их экспрессия во взрослом состоянии ограничена определенными группами нейронов, в основном в гиппокампе и некоторых подкорковых структурах [18].

В нашем исследовании показано, что нокаут по гену урокиназы, хотя и не имел фенотипических проявлений в поведении мышей, характеризовался существенным ростом содержания в мозге уровня норадреналина, дофамина и серотонина, но снижением гистамина. Мы предполагаем, что установленное повышение абсолютных уровней дофамина, норадреналина и серотонина, а также изменение баланса биогенных аминов в мозге у самок с нокаутом по гену урокиназы является одним из механизмов, способствующих восстановлению нейрогенеза и синаптической передачи нервных окончаний в случае различных стрессорных воздействий в условиях генетического повреждения одного из звеньев системы урокиназы.

Рост большинства видов злокачественных опухолей зависит от баланса между факторами, способствующими пролиферации, ангиогенезу, миграции и выживанию клеток, и теми, которые участвуют в дифференцировке клеток, тормозят пролиферацию и приводят к апоптозу [19]. Следовательно, после перевивки клеток злокачественной меланомы животным с различным нейротрансмиттерным статусом головного мозга, генетически детерминированным или измененным в результате длительного хронического воздействия нейрогенной боли, развитие злокачественного процесса может оказаться модифицированным, по причине различных фоновых состояний центральных регуляторных систем.

Следствием снижения содержания БА в мозге у самок под влиянием ХНБ оказалась ослабление противоопухолевой защиты организма, что выразилось в уменьшении продолжительности жизни, латентного периода, увеличении активности и сайтов метастазирования у животных. В то же время рост пере-

вивной меланомы у самок мышей с нокаутом по гену урокиназы значимых отличий в продолжительности жизни и латентном периоде не имел, однако прирост объема опухоли был значительно более медленным, чем при перевивке меланомы мышам с диким типом гена урокиназы.

Мы предполагаем, что нокаут по гену урокиназы мог иметь противоопухолевое действие на локальном уровне, так как ранее нами показано участие системы факторов роста и фибринолиза в патогенезе роста меланомы у самок мышей [20]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что серотонинергическая и дофаминергическая системы взаимодействуют друг с другом, влияя на пластичность мозга и способность организма в целом к восстановлению и адаптации [21]. Норадреналин участвует в защите дофаминергических нейронов за счет усиления экспрессии тирозин-гидроксилазы [22]. Истощение норадренергической системы головного мозга часто связывают с гиперактивацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что характеризует различные психические расстройства, связанные со стрессом, такие как тревожность и депрессия, и нейродегенеративные состояния, такие как болезнь Альцгеймера и рассеянный склероз [23]. Недавние исследования свидетельствуют о том, что данная реакция имеет половые различия и особи женского пола менее устойчивы к продолжительному стрессу [24].

В настоящем исследовании у животных с ХНБ и нокаутом по гену урокиназы установлено снижение в мозге уровня гистамина. Данный факт, с одной стороны, может объясняться многофункциональностью гистамина, принимающего участие как в ноцицептивных реакциях, так и в восстановительных процессах в мозге. Сложность интерпретации результатов изменения нейрональных аминов вообще и гистамина в частности заключается в активации различных рецепторов, приводящей к различным эффектам. С другой стороны, повышение активности аминоксидаз может оказаться причиной снижения уровня гистамина. Нами установлен рост уровня метаболита серотонина – 5ОИУК как при ХНБ, так и у нокаутных животных. Значимым отличием оказалось снижение серотонина у самок с ХНБ, но сохранение его физиологических концентраций у нокаутных животных.

При этом сочетанное воздействие ХНБ и (*-uPA*) приводит только к снижению степени влияния нокаута по гену урокиназы и активации метаболизма серотонинергической системы на фоне роста уровня серотонина. Возможно, что именно повышение уровня серотонина в мозге у самок с сочетанием

нокаута по гену с ХНБ повлияло на повышение латентного периода развития опухоли, хотя и не привело к повышению продолжительности жизни животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты указывают на несомненное влияние изменений нейромедиаторного баланса головного мозга под действием хронической нейрогенной боли и генетически детерминированного дефицита урокиназы на рост перивисцеральной меланомы. Лучшее понимание механизмов, лежащих в основе нейромедиаторной функции при онкогенезе, нейрогенезе и хронических коморбидных заболеваниях, позволит прогнозировать возможное течение заболевания и разработать персонализированную противоопухолевую терапию.

ЛИТЕРАТУРА

- Valiente M., Ahluwalia M.S., Boire A., Brastianos P.K., Goldberg S.B., Lee E.Q., Le Rhun E., Preusser M., Winkler F., Soffietti R. The evolving landscape of brain metastasis. *Trends Cancer*. 2018; 4 (3): 176–196. DOI: 10.1016/j.trecan.2018.01.003.
- Jozic I., Stojadinovic O., Kirsner R.S.F., 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.
- Planken A., Kurvits L., Reimann E., Kadastik-Eerme L., Kingo K., Kõks S., Taba P. Looking beyond the brain to improve the pathogenic understanding of Parkinson's disease: implications of whole transcriptome profiling of Patients' skin. *BMC Neurol.* 2017; 17 (1): 6. DOI: 10.1186/s12883-016-0784-z.
- Dalvin L.A., Damento G.M., Yawn B.P., Abbott B.A., Hodge D.O., Pulido J.S. Parkinson disease and melanoma: confirming and reexamining an association. *Mayo Clin. Proc.* 2017; 92 (7): 1070–1079. DOI: 10.1016/j.mayocp.2017.03.014.
- Xie Q.W., Dai X., Tang X., Chan C.H.Y., Chan C.L.W. Risk of mental disorders in children and adolescents with atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Front Psychol.* 2019; 10: 1773. DOI: 10.3389/fpsyg.2019.01773.
- Shukla R.K., Dhuriya Y.K., Chandravanshi L.P., Gupta R., Srivastava P., Pant A.B., Kumar A., Pandey C.M., Siddiqui M.H., Khanna V.K. Influence of immobilization and forced swim stress on the neurotoxicity of lambda-cyhalothrin in rats: effect on brain biogenic amines and BBB permeability. *Neurotoxicology*. 2017; 60: 187–196. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.07.002.
- Kusuhara M., Maruyama K., Ishii H., Masuda Y., Sakurai K., Tamai E., Urakami K. A fragrant environment containing α -pinene suppresses tumor growth in mice by modulating the hypothalamus/sympathetic nerve/leptin axis and immune system. *Integr. Cancer Ther.* 2019; 18: 1534735419845139. DOI: 10.1177/1534735419845139.
- Ben-Shaanan T.L., Schiller M., Azulay-Debby H., Korin B., Boshnak N., Koren T., Krot M., Shakya J., Rahat M.A., Hakim F., Rolls A. Modulation of anti-tumor immunity by the brain's reward system. *Nat. Commun.* 2018; 9 (1): 2723. DOI: 10.1038/s41467-018-05283-5.
- Menezes A.C., Carvalheiro M., Ferreira de Oliveira J.M.P., Ascenso A., Oliveira H. Cytotoxic effect of the serotonergic drug 1-(1-Naphthyl)piperazine against melanoma cells. *Toxicol. in Vitro*. 2018; 47: 72–78. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.11.011.
- Passani M.B., Panula P., Lin J.S. Histamine in the brain. *Front Syst. Neurosci.* 2014; 8: 64. DOI: 10.3389/fnsys.2014.00064.
- Hu W., Chen Z. The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacol. Ther.* 2017; 175: 116–132. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.039.
- Bebe F.N., Hu S., Brown T.L., Tulp O.L. Role, extent, and impact of comorbidity on prognosis and survival in advanced metastatic melanoma: a review. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2019; 12 (1): 16–23.
- Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепятаки Л.К., Бандовкина В.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Российский журнал боли*. 2017; 2 (53): 14–20.
- Taylor B.K., Westlund K.N. The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator. *J. Neurosci. Res.* 2017; 95 (6): 1336–1346. DOI: 10.1002/jnr.23956.
- Семина Е.В., Рубина К.А., Степанова В.В., Ткачук В.А. Участие рецептора урокиназы и его эндогенных лигандов в развитии головного мозга и формировании когнитивных функций. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102 (8): 881–903.
- Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Бандовкина В.А., Трепятаки Л.К., Лесовая Н.С., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Немашкалова Л.А. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 62–70. DOI: 10.15372/SSMJ20190408.
- Merino P., Diaz A., Manrique L.G., Cheng L., Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain. *J. Biol. Chem.* 2018; 293 (24): 9234–9247. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002534.
- Merino P., Diaz A., Jeanneret V., Wu F., Torre E., Cheng L., Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) binding to the uPA receptor (uPAR) promotes axonal regeneration in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 2017; 292 (7): 2741–2753. DOI: 10.1074/jbc.M116.761650.
- Cao L., Liu X., Lin E.J., Wang C., Choi E.Y., Riban V., Lin B., During M.J. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell*. 2010; 142 (1): 52–64. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05.029.
- Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Погорелова Ю.А., Ткаля Л.Д., Черярина Н.Д. Активность компонентов системы активации плазминогена и некоторых факторов неоплазии в динамике развития перевиваемой меланомы B16/F10. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 5: 617.
- Cordeiro L.M.S., Rabelo P.C.R., Moraes M.M., Teixeira-Coelho F., Coimbra C.C., Wanner S.P., Soares D.D. Physical exer-

- cise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2017; 50 (12): e6432. DOI: 10.1590/1414-431X20176432.
22. Zhu M.Y., Raza M.U., Zhan Y., Fan Y. Norepinephrine up-regulates the expression of tyrosine hydroxylase and protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine toxicity. *Neurochem. Int.* 2019; 31: 104549. DOI: 10.1016/j.neuint.2019.104549.
23. Urquhart M.A., Ross J.A., Reyes B.A.S., Nitikman M., Thomas S.A., Mackie K., van Bockstaele E.J. Noradrenergic depletion causes sex specific alterations in the endocannabinoid system in the Murine prefrontal cortex. *Neurobiol. Stress.* 2019; 10: 100164. DOI: 10.1016/j.ynstr.2019.100164.
24. Becker J.B., Chartoff E. Sex differences in neural mechanisms mediating reward and addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2019; 4 (1): 166–183. DOI: 10.1038/s41386-018-0125-6.

Вклад авторов

Франциянц Е.М., Каплиева И.В. – разработка концепции и дизайна эксперимента. Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Бандовкина В.А. – анализ и интерпретация результатов. Бандовкина В.А., Сурикова Е.И. – подготовка и редактирование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Трепитаки Л.К. – проведение эксперимента. Черярина Н.Д. – выполнение ИФА-анализа. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Кит Олег Иванович, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАМН, генеральный директор НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-3061-6108.

Франциянц Елена Михайловна, д-р биол. наук, профессор, зам. ген. директора по науке, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-3618-6890.

Бандовкина Валерия Ахтямовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-2302-8271.

Каплиева Ирина Викторовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-3972-2452.

Сурикова Екатерина Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-4318-7587.

Трепитаки Лидия Константиновна, науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-9749-2747

Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-3711-8155.

Котиева Инга Мовлиевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-0252-4708.

(✉) **Бандовкина Валерия Ахтямовна**, e-mail: super.gormon@yandex.ru.

Поступила в редакцию 08.11.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Сравнительный анализ результатов генотипирования гена N-ацетилтрансферазы 2 у пациентов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания, проживающих в Республике Саха (Якутия)

Краснова Н.М.¹, Ефремова Е.Н.², Егорова А.А.², Филиппова О.И.², Чертовских Я.В.³, Рудых З.А.³, Алексеева Е.А.³, Татаринова Т.Е.³, Соколутов Д.А.¹, Валь Н.С.², Винокурова М.К.², Кравченко А.Ф.², Венгеровский А.И.⁴, Сычѳв Д.А.⁵

¹ Северо-Восточный федеральный университет (СВФУ) им. М.К. Аммосова
Россия, 677000, г. Якутск, ул. Белинского, 58

² Научно-практический центр (НПЦ) «Фтизиатрия»
Россия, 677000, г. Якутск, ул. Петра Алексеева, 93

³ Республиканская клиническая больница (РКБ) № 3
Россия, 677027, г. Якутск, ул. Кирова, 34

⁴ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

⁵ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)
Россия, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить вариабельность гена N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2), провести сравнительный анализ распространённости его полиморфизмов гена NAT2 и типов ацетилирования среди якутов и русских с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания, проживающих в Республике Саха (Якутия).

Материалы и методы. В исследование включены 197 пациентов (132 якута и 65 русских) в возрасте (43,3 ± 14,4) года с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени исследованы однонуклеотидные полиморфизмы NAT2*5 (rs1801280, T341C), NAT2*6 (rs1799930, G590A), NAT2*7 (rs1799931, G857A), NAT2*11 (rs1799929, C481T), NAT2*12 (rs1208, A803G), NAT2*13 (rs1041983, C282T). Генетически детерминированную скорость метаболизма рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора NATpred.

Результаты. Полиморфные варианты гена NAT2, ассоциированные со скоростью биотрансформации изониазида, встречаются у 75% якутов и всех русских, проживающих в Якутии. Якуты являются частыми носителями аллельных вариантов NAT2*6 и *13 (с частотой встречаемости 40,9 и 64,4% соответственно), русские – носителями NAT2*5, *6, *11, *12 и *13 (с частотой встречаемости 69,2; 55,4; 67,7; 69,2 и 64,6% соответственно). Распределение полиморфизмов NAT2*5, *7, *11, *12 значительно зависит от национальности. Установлена большая распространённость промежуточного типа ацетилирования (58,3%) среди якутов, медленного типа – среди русских (61,5%). Различия распространённости быстрого, промежуточного и медленного типов ацетилирования у пациентов с туберкулезом зависят от национальности.

Заключение. Особенности распределения полиморфизмов гена NAT2 и типов ацетилирования изониазида среди пациентов якутской и русской национальности с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания свидетельствуют о том, что фармакологический ответ может значительно различаться среди пациентов национальных групп. Данные фармакогенетического исследования у якутов и русских необходимо учитывать в клинической практике для персонализированного применения изониазида.

✉ Краснова Наталья Михайловна, e-mail: krasnova14@mail.ru.

Ключевые слова: якуты, русские, туберкулез, изониазид, фармакогенетика, полиморфизм, NAT2, медленный, быстрый, промежуточный, тип ацетилирования.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке ГАУ РС(Я) «Республиканская клиническая больница № 3» Министерства здравоохранения Республики Саха (Якутия).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение исследования. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУ РС(Я) «Научно-практический центр «Фтизиатрия» (протокол № 3 от 26.09.2018).

Для цитирования: Краснова Н.М., Ефремова Е.Н., Егорова А.А., Филиппова О.И., Чертовских Я.В., Рудых З.А., Алексеева Е.А., Татарина Т.Е., Сокоротов Д.А., Валь Н.С., Винокурова М.К., Кравченко А.Ф., Венгеровский А.И., Сычёв Д.А. Сравнительный анализ результатов генотипирования гена N-ацетилтрансферазы 2 у пациентов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания, проживающих в Республике Саха (Якутия). *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 102–109. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-102-109>.

Comparative analysis of N-acetyltransferase 2 genotyping results among patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis residing in the Sakha Republic (Yakutia)

Krasnova N.M.¹, Efremova E.N.², Egorova A.A.², Filippova O.I.², Chertovskikh Y.V.³, Rudykh Z.A.³, Alekseeva E.A.³, Tatarinova T.E.³, Sokorotov D.A.¹, Val N.S.², Vinokurova M.K.², Karvchenko A.F.², Vengerovskii A.I.⁴, Sychev D.A.⁵

¹ M.K. Ammosov North-Eastern Federal University
58, Belinsky Str., Yakutsk, 677000, Russian Federation

² Phthisiatry Research-Practice Center
93, Petr Alekseev Str., Yakutsk, 677000, Russian Federation

³ Republican Clinical Hospital No. 3
34, Kirov Str., Yakutsk, 677027, Russian Federation

⁴ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

⁵ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
2/1, Barrikadnaya Str., Moscow, 125993, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To assess the variability of the NAT2 gene and to comparatively analyze the prevalence of NAT2 polymorphisms and acetylation types among Yakut and Russian patients newly diagnosed with pulmonary tuberculosis (TB), permanently residing in the Sakha Republic (Yakutia).

Materials and methods. The study included 197 patients with newly diagnosed pulmonary TB (132 Yakuts and 65 Russians) aged (43.3 ± 14.4). The following single-nucleotide polymorphisms were analyzed, using real-time polymerase chain reaction (PCR): NAT2*5 (rs1801280, T341C), NAT2*6 (rs1799930, G590A), NAT2*7 (rs1799931, G857A), NAT2*11 (rs1799929, C481T), NAT2*12 (rs1208, A803G), and NAT2*13 (rs1041983, C282T). Genetically determined basal metabolic rates were calculated using the NATpred online tool.

Results. 75% of residents, both of Yakut and Russian ethnicity, were identified as carriers of NAT2 polymorphic variants known to be related to isoniazid biotransformation. NAT2*6 and *13 allelic variants were more frequent in

Yakuts (occurring in 40.9% and 64.4%, respectively); variants *NAT2**5, *6, *11, *12, and *13 were more common in Russians (69.2; 55.4; 67.7; 69.2, and 64.6%, respectively). The *NAT2**5, *7, *11, and *12 polymorphisms were found to be significantly ethnicity-dependent. The study established substantial prevalence of medium acetylation type (58.3%) in Yakuts and slow acetylation type in Russians (61.5%). Correlations were shown between ethnicity and different prevalence rates of rapid, medium, or slow acetylation types among patients with TB.

Conclusion. The observed *NAT2* polymorphism distribution patterns and isoniazid acetylation types among Yakut and Russian patients with newly diagnosed pulmonary TB demonstrated that pharmacologic responses can be significantly different between ethnic groups. Findings of pharmacogenetic studies in Yakut and Russian populations should be incorporated in clinical practice for personalized administration of isoniazid.

Key words: Yakut, Russian, tuberculosis, isoniazid, pharmacogenetics, polymorphism, *NAT2*, acetylation, isoniazid acetyltransferase.

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

Source of financing. This study was financially supported by the Republican clinical hospital no. 3 of the Ministry of Health of the Sakha Republic (Yakutia).

Conformity to the principles of ethics. All patients signed an informed consent to take part in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Phthisiatry Research-Practice Center (Protocol No. 3 of 26.09.2018).

For citation: Krasnova N.M., Efremova E.N., Egorova A.A., Filippova O.I., Chertovskikh Y.V., Rudykh Z.A., Alekseeva E.A., Tatarinova T.E., Sokorutov D.A., Val N.S., Vinokurova M.K., Karvchenko A.F., Vengerovskii A.I., Sychev D.A. Comparative analysis of N-acetyltransferase 2 genotyping results among patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis residing in the Sakha Republic (Yakutia). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 102–109. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-102-109>.

ВВЕДЕНИЕ

Для лечения впервые выявленного лекарственно-чувствительного туберкулеза органов дыхания рекомендуется применять комбинацию из четырех наиболее эффективных противотуберкулезных средств – изониазида, рифампицина, пиразинамида и этамбутола в стандартных дозах (<http://sr.gosminzdrav.ru/#!/schema/943>). В практической фтизиатрии часто отмечаются индивидуальные различия в фармакологическом ответе на эти лекарственные средства: у части пациентов лечение оказывается малоэффективным, может сформироваться лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза, возникает рецидив заболевания, у других больных развиваются нежелательные побочные реакции на противотуберкулезные средства [1]. В частности, изониазид обладает гепатотоксическим действием, вызываемое им поражение печени проявляется от бессимптомной гиперферментемии (у 10–20% больных) до тяжелого гепатита и острой печеночной недостаточности (у 0,5–1%) [2]. Токсическое действие на печень оказывают высокоактивные метаболиты изониазида – гидразин и ацетилгидразин [3, 4].

Изониазид метаболизируется в печени в реакциях ацетилирования и гидролиза. Ацетилирование катализирует N-ацетилтрансфераза-2 (*NAT2*),

гидролиз – ациламидаза [5]. Изофермент *NAT2* кодируется высокополиморфным геном, в настоящее время установлено 106 его различных аллелей. Активность *NAT2* зависит от однонуклеотидных замен в структурной области кодирующего фермент гена [6, 7]. В зависимости от комбинаций аллелей гена *NAT2* формируются различные фенотипы ацетилирования изониазида: быстрый (носители одной или двух быстрых аллелей), промежуточный (носители одной медленной аллели) и медленный (носители двух медленных аллелей) тип [5, 8].

Распределение полиморфизма гена *NAT2* широко варьирует и связано с расовым, этническим происхождением людей и местом их проживания [9–11]. В настоящее время в научной литературе недостаточно сведений о распространенности генотипов полиморфных маркеров гена *NAT2* и типов ацетилирования среди пациентов якутской и русской национальности с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания, постоянно проживающих на территории Республики Саха (Якутия).

Цель данной работы – оценить вариабельность гена *NAT2*, провести сравнительный анализ распространенности его полиморфизмов и типов ацетилирования среди якутов и русских с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В одноцентровом одномоментном обсервационном выборочном исследовании приняли участие 197 пациентов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания из числа представителей двух этнических групп Республики Саха (Якутия): 132 якута (77 женщин, 55 мужчин) и 65 русских (35 женщин, 30 мужчин). Пациенты были госпитализированы в ГБУ РС(Я) «Научно-практический центр «Фтизиатрия» (г. Якутск) для проведения интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии. Средний возраст участников исследования составил $(43,3 \pm 14,4)$ года. Критерии включения в исследование: впервые в жизни установленный туберкулез органов дыхания, возраст 18 лет и старше, наличие подписанного информированного согласия, принадлежность к этническим группам якутов и русских. Этническую принадлежность устанавливали путем самоидентификации пациентов и их родителей, анализировали родословную до второго поколения. В ранее проведенных исследованиях самоидентификация в 99,9% случаев соответствовала микросателлитному анализу этнической принадлежности [12]. В исследование не включали потомков разнородных браков, а также людей, несоответствующих любому из критериев включения.

Для генетического исследования использовали кровь, полученную из вены локтевого сгиба. Из цельной крови, собранной с помощью закрытой вакуумной системы в пробирки объемом 4 мл с мелкодисперсным напылением этилендиаминтетрауксусной кислоты (Zhejiang Gongdong Medical Technology Co., Ltd., КНР), выделяли дезоксирибонуклеиновую кислоту с помощью наборов реагентов ExtractDNA Blood (Евроген, Россия). Носительство полиморф-

ных вариантов генов *NAT2**5 (rs1801280, T341C), *NAT2**6 (rs1799930, G590A), *NAT2**7 (rs1799931, G857A), *NAT2**11 (rs1799929, C481T), *NAT2**12 (rs1208, A803G), *NAT2**13 (rs1041983, C282T) определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью набора реагентов ГенТест-М *NAT2* (НОМОТЕК, Россия) на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Генетически детерминированную скорость метаболизма рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора NATpred [13].

Для статистического анализа данных применяли пакет прикладных программ IBM SPSS Statistics 23 с использованием классического критерия χ^2 Пирсона и его модификации с поправкой Йетса. Для проверки соответствия распределения частот генотипов закону равновесия Харди – Вайнберга рассчитывали 95%-й доверительный интервал (95%-й ДИ) методом Клоппера – Пирсона. Критический уровень значимости p принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациентов якутской и русской национальности с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания установлены частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *NAT2* – *NAT2**5, *6, *7, *11, *12 и *13, ассоциированные со скоростью биотрансформации изониазида. Распределение аллелей и генотипов полиморфизмов *NAT2* у якутов соответствовало закону Харди – Вайнберга ($p > 0,05$). У русских, проживающих в Республике Саха (Якутия), распределение аллелей и генотипов *NAT2**5, *6, *7, *12 и *13 также соответствовало закону Харди – Вайнберга, не соответствовал только полиморфизм *NAT2**11 (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена <i>NAT2</i> у якутов и русских с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания												
Полиморфный маркер	Якуты, $n = 132$						Русские, $n = 65$					
	Генотип, n (%)			Аллель, %		χ^2	p	Генотип, n (%)			Аллель, %	
<i>NAT2</i> *5 (T341C)	T/T	T/C	C/C	T	C	1,17	0,558	T/T	T/C	C/C	T	C
	91 (68,9)	35 (26,5)	6 (4,6)	0,82	0,18			20 (30,8)*	36 (55,4)*	9 (13,8)*	0,58	0,42
<i>NAT2</i> *6 (G590A)	G/G	G/A	A/A	G	A	0,64	0,727	G/G	G/A	A/A	G	A
	78 (59,1)	49 (37,1)	5 (3,8)	0,78	0,22			29 (44,6)	29 (44,6)	7 (10,8)	0,67	0,33
<i>NAT2</i> *7 (G857A)	G/G	G/A	A/A	G	A	0,01	0,993	G/G	G/A	A/A	G	A
	94 (71,2)	35 (26,5)	3 (2,3)	0,84	0,16			56 (86,2)*	9 (13,8)*	0 (0)*	0,93	0,07
<i>NAT2</i> *11 (C481T)	C/C	C/T	T/T	C	T	0,00	1,000	C/C	C/T	T/T	C	T
	90 (68,2)	38 (28,8)	4 (3,0)	0,83	0,17			21 (32,3)*	40 (61,5)*	4 (6,2)*	0,63	0,37
<i>NAT2</i> *12 (A803G)	A/A	A/G	G/G	A	G	0,17	0,916	A/A	A/G	G/G	A	G
	91 (68,9)	38 (28,8)	3 (2,3)	0,83	0,17			20 (30,8)*	37 (56,9)*	8 (12,3)*	0,59	0,41
<i>NAT2</i> *13 (C282T)	C/C	C/T	T/T	C	T	5,89	0,052	C/C	C/T	T/T	C	T
	47 (35,6)	74 (56,1)	11 (8,3)	0,64	0,36			23 (35,4)	34 (52,3)	8 (12,3)	0,62	0,38

Примечание. χ^2 – хи-квадрат Пирсона, p – статистически значимые различия ($<0,05$).

* значимые отличия по сравнению с якутами, $p < 0,05$.

Полиморфные варианты гена *NAT2* выявлены у 75% (99/132) пациентов якутской национальности и у всех русских (65/65). Среди якутов наиболее часто регистрировалось носительство аллельных вариантов NAT2*6 (у 40,9%) и NAT2*13 (у 64,4%). У русских полиморфные варианты NAT2*5, *6, *11, *12 и *13 встречались с примерно одинаковой частотой (69,2; 55,4; 67,7; 69,2 и 64,6% соответственно) (табл. 1).

Распространенность однонуклеотидных полиморфизмов NAT2*5, *7, *11, *12 статистически значимо различалась в зависимости от национальности (табл. 1). Полиморфные варианты NAT2*6 и NAT2*13 с одинаковой частотой встречались у якутов и русских.

У 58,3% (77/132) якутов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания определялся промежуточный тип ацетилирования изониазида, у 22,7% (30/132) – медленный, у 18,9% (25/132) – быстрый тип. У 61,5% (40/65) русских пациентов встречался медленный тип ацетилирования, у 35,4% (23/65) –

промежуточный, у 3,1% (2/65) – быстрый. Распространенность трех типов ацетилирования статистически значимо различалась в зависимости от национальности ($\chi^2 = 30,977$; $p = 0,000$).

Частота встречаемости генотипов NAT2*6, *7 и *11 среди промежуточных и медленных ацетиляторов у пациентов якутской и русской национальности значимо не различалась, но распространенность полиморфизмов NAT2*5, *12 и *13 оказалась значимо различной.

У 74% якутов (57/77; 95%-й ДИ [0,62–0,83]) с промежуточным типом ацетилирования установлено носительство гомозиготного генотипа Т/Т варианта NAT2*5 (Т341С). В группе больных русской национальности такое носительство выявлялось у 39,1% (9/23; 95%-й ДИ [0,19–0,61]), $p < 0,05$.

Гетерозиготный генотип Т/С варианта NAT2*5 определялся у 24,7% якутов (19/77; 95%-й ДИ [0,15–0,35]) и 60,9% русских (14/23; 95%-й ДИ [0,38–0,80]) с промежуточным типом ацетилирования, $p < 0,05$ (табл. 2).

Таблица 2

Типы ацетилирования у пациентов с туберкулезом органов дыхания при разных генотипах полиморфных вариантов гена <i>NAT2</i>							
Полиморфный маркер	Генотип	Якуты, $n = 132$			Русские, $n = 65$		
		Медленный ацетилятор ($n = 30$), n (%)	Промежуточный ацетилятор ($n = 77$), n (%)	Быстрый ацетилятор ($n = 25$), n (%)	Медленный ацетилятор ($n = 40$), n (%)	Промежуточный ацетилятор ($n = 23$), n (%)	Быстрый ацетилятор ($n = 2$), n (%)
NAT2*5 (Т341С)	Т/Т	9 (30,0)	57 (74,0)	25 (100,0)	9 (22,5)	9 (39,1)	2 (100,0)
	Т/С	16 (53,3)	19 (24,7)	0	22 (55,0)	14 (60,9)	0
	С/С	5 (16,7)	1 (1,3)	0	9 (22,5)	0	0
NAT2*6 (G590A)	G/G	12 (40,0)	41 (53,2)	25 (100,0)	11 (27,5)	16 (69,6)	2 (100,0)
	G/A	15 (50,0)	34 (44,2)	0	23 (57,5)	6 (26,1)	0
	A/A	3 (10,0)	2 (2,6)	0	6 (15,0)	1 (4,3)	0
NAT2*7 (G857A)	G/G	16 (53,3)	53 (68,8)	25 (100,0)	32 (80,0)	22 (95,7)	2 (100,0)
	G/A	12 (40,0)	23 (29,9)	0	8 (20,0)	1 (4,3)	0
	A/A	2 (6,7)	1 (1,3)	0	0	0	0
NAT2*11 (C481T)	С/С	9 (30,0)	56 (72,7)	25 (100,0)	9 (22,5)	10 (43,5)	2 (100,0)
	С/Т	18 (60,0)	20 (26,0)	0	27 (67,5)	13 (56,5)	0
	Т/Т	3 (10,0)	1 (1,3)	0	4 (10,0)	0	0
NAT2*12 (A803G)	A/A	9 (30,0)	57 (74,0)	25 (100,0)	10 (25,0)	8 (34,8)	2 (100,0)
	A/G	19 (63,3)	19 (24,7)	0	23 (57,5)	14 (60,9)	0
	G/G	2 (6,7)	1 (1,3)	0	7 (17,5)	1 (4,3)	0
NAT2*13 (C282T)	С/С	3 (10,0)	19 (24,7)	25 (100,0)	6 (15,0)	15 (65,2)	2 (100,0)
	С/Т	18 (60,0)	56 (72,7)	0	27 (67,5)	7 (30,4)	0
	Т/Т	9 (30,0)	2 (2,6)	0	7 (17,5)	1 (4,3)	0

В группе пациентов с промежуточным типом ацетилирования генотип А/А варианта (A803G) встречался у 74% якутов (57/77; 95%-й ДИ [0,62–0,83]) и 34,8% русских (8/23; 95%-й ДИ [0,16–0,57]), $p < 0,05$. У 60,9% русских пациентов чаще регистрировалось носительство гетерозиготного генотипа А/Г NAT2*12 (14/23; 95%-й ДИ [0,38–0,80]). В якутской популяции носительство этого генотипа встречалось реже (у 24,7%, 19/77; 95%-й ДИ [0,15–0,35]) ($p < 0,05$). Генотип С/С NAT2*13 (C282T) выявлялся у 24,7% якутов (19/77; 95%-й ДИ [0,15–0,35]) и у 65,2% русских (15/23; 95%-й ДИ [0,42–0,83])

($p < 0,05$). Носителями гетерозиготы Т/С варианта NAT2*13 чаще являлись якуты (72,7%; 56/77; 95%-й ДИ [0,61–0,82]), чем русские (30,4%; 7/23; 95%-й ДИ [0,13–0,52]) ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие гена *NAT2* и фенотипов ацетилирования сформировалось в результате адаптации людей к условиям жизни. Переход от кочевого к оседлому образу жизни значительно изменил рацион питания, организм подвергся воздействию новых патогенов и ксенобиотиков, для повышения

выживаемости изменялась активность ферментов детоксикации и формировался новый генетически передаваемый фенотип биотрансформации [14].

Во всем мире распространенность полиморфизмов гена *NAT2* зависит от расовой принадлежности. Согласно данным, опубликованным в базе The International Genome Sample Resource (<https://www.internationalgenome.org>), полиморфные варианты *NAT2**5, *11 и *12 наиболее распространены среди жителей Европы и Южной Азии (68,4 и 56,5% для первого; 67,6 и 53,1% для второго, 67,2 и 58,1% для третьего вариантов). *NAT2**5, *11 и *12 встречаются у 7,3; 7,1 и 7,7% жителей Восточной Азии соответственно. Полиморфизм *NAT2**7 распространен среди коренных жителей Восточной Азии (31,8%) и реже встречается у европейцев (4,6%). Полиморфизм *NAT2**6 определяется у 58,7% жителей Южной Азии и с одинаковой частотой распространен среди жителей Европы (46,9%) и Восточной Азии (43,2%). Люди азиатской и европеоидной рас примерно одинаково часто являются носителями полиморфного варианта *NAT2**13 (50,5% азиатов и 69,4% европейцев).

Проведенное нами исследование показало, что якуты наиболее часто являются носителями аллельных вариантов *NAT2**6 и *NAT2**13 (см. табл. 1), это согласуется с данными, опубликованными о распространенности таких вариантов среди азиатов. Частота носительства аллельных вариантов *NAT2**5 среди якутов составила 31,1%, *NAT2**11 – 31,8%, *NAT2**12 – 31,1%, что отличается от данных, полученных у представителей азиатской расы. Аллельный вариант *NAT2**7 с примерно одинаковой частотой встречается в популяции якутов (28,8%) и жителей Восточной Азии (31,8%), реже среди жителей Южной Азии (13,5%).

Полиморфные варианты *NAT2**5, *6, *11, *12 и *13 встречаются соответственно у 69,2; 55,4; 67,7; 69,2 и 64,6% русских (см. табл. 1). Полиморфизм *NAT2**7 у русских, проживающих в Якутии, встречается чаще, чем среди жителей Европы (13,8 и 4,6% соответственно).

Сравнительный анализ распределения генотипов гена *NAT2* показал, что русские пациенты намного чаще являются носителями полиморфных вариантов *NAT2**5, *11, *12, чем якуты (см. табл. 1). В настоящее время недостаточно данных о влиянии генотипов полиморфных вариантов *NAT2**5 и *11 на частоту и тяжесть течения поражения печени у больных туберкулезом, вызванного изониазидом. Известна связь носительства гомозиготных генотипов по минорным аллелям и более высоким риском гепатотоксичности изониазида по сравнению с риском у носителей основных аллелей *NAT**5 и *11 [15, 16].

Полиморфный вариант *NAT2**7 чаще встречался среди якутов (28,8%), чем у русских (13,8%), $p < 0,05$. Пациенты якутской национальности редко являлись носителями генотипа A/A *NAT2**7 (2,3%), у русских пациентов данный генотип не регистрировался (см. табл. 1). В немногочисленных научных публикациях приводятся неоднозначные данные об ассоциативной связи носительства минорного аллеля A *NAT2**7 и риском развития гепатотоксичности. Одни авторы указывают на более высокий риск развития гепатотоксичности противотуберкулезных средств первого ряда у носителей генотипа A/A, чем у носителей генотипа G/G [17, 18], другие исследователи подобные ассоциации не обнаружили [2, 19].

Основные аллели *NAT2**5, *6 и *NAT2**7 кодируют синтез *NAT2* с измененной последовательностью аминокислот и вследствие этого низкой активностью. У людей с аллелем *NAT2**5 и сочетанием с полиморфными вариантами *NAT2**6, *7 формируется медленный тип ацетилирования [8]. Географическое распределение медленных ацетиляторов хорошо изучено: такой фенотип встречается у 60% жителей Европы, Ближнего Востока, Северной Африки и Южной Азии и у 10% населения Восточной Азии и коренных американцев [20].

В якутской популяции наиболее распространен промежуточный тип ацетилирования (58,3%), у русских – медленный (61,5%). Среди якутов значительно чаще встречаются быстрые ацетиляторы (18,9%), чем среди пациентов русской национальности (3,1%). Это согласуется с сравнительными исследованиями азиатов и европеоидов.

Полиморфизм гена *NAT2* и генетически обусловленная вариабельность скорости ацетилирования изониазида в клинической практике существенно влияют на эффективность и безопасность фармакотерапии туберкулеза. Взаимосвязь между медленным типом ацетилирования и частотой поражения печени была подтверждена в нескольких метаанализах [21–24]. У медленных ацетиляторов в плазме определяются высокие концентрации изониазида и его токсических метаболитов [25]. В плазме быстрых ацетиляторов концентрация изониазида ниже, возрастает риск развития лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза [25–28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования свидетельствуют о большой распространенности среди якутов и русских полиморфных вариантов гена *NAT2*, ассоциированных со скоростью ацетилирования изониазида. Якуты являлись частыми носителями аллельных вариантов *NAT2**6 и *13, русские – *NAT2**5, *6, *11,

*12 и *13. Сравнительный анализ в анализируемой выборке показал значимые различия в частоте распределения полиморфизмов NAT2*5, *7, *11, *12 в зависимости от национальности. Среди якутов комбинации генотипов NAT2 наиболее часто приводили к формированию промежуточного типа ацетилирования, у русских – медленного. Особенности распределения полиморфизмов гена NAT2 и типов ацетилирования среди якутов и русских с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания свидетельствуют о том, что фармакологический ответ может значительно различаться у пациентов разных национальностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова Н.А., Стрельцова Е.Н., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Нежелательные побочные реакции на противотуберкулезные препараты основного ряда. *Туберкулез и болезни легких*. 2016; 94 (5): 42–45. DOI: 10.21292/2075-1230-2016-94-5-42-45.
2. Chan S.L., Chua A.P.G., Aminkeng F., Chee C.B.E., Jin S., Loh M., Gan S.H., Wang Y.T., Brunham L.R. Association and clinical utility of NAT2 in the prediction of isoniazid-induced liver injury in Singaporean patients. *PLoS One*. 2017; 12 (10): e0186200. DOI: 10.1371/journal.pone.0186200.
3. Uduv V.V., Dygai A.M., Vengerovsky A.I. Effects of phospholipid hepatoprotectors on apoptosis during experimental liver pathology induced by isoniazid and paracetamol. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012; 154 (11): 568–571. DOI: 10.1007/s10517-013-2012-9.
4. Richardson M., Kirkham J., Dwan K., Sloan D.J., Davies G., Jorgensen A.L. NAT2 variants and toxicity related to anti-tuberculosis agents: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2019; 23 (3): 293–316. DOI: 10.5588/ijtld.18.0324.
5. Сналина Н.Е., Сычев Д.А. Генетические предикторы гепатотоксичности изониазида. *Молекулярная медицина*. 2018; 16 (2): 31–36. DOI: 10.29296/24999490-2018-02-04.
6. Jarrar Y.B., Balasmeh A.A., Jarrar W. Sequence analysis of the N-acetyltransferase 2 gene (NAT2) among Jordanian volunteers. *Libyan J. Med.* 2018; 13 (1): 1408381. DOI: 10.1080/19932820.2017.1408381.
7. Khan S., Mandal R.K., Elsbali A.M., Dar S.A., Jawed A., Wahid M., Mahto H., Lohani M., Mishra B.N., Akhter N., Raban A.A., Haque S. Pharmacogenetic association between gene polymorphisms and isoniazid induced hepatotoxicity: trial sequence meta-analysis as evidence. *Biosci. Rep.* 2019; 39 (1): pii: BSR20180845. DOI: 10.1042/BSR20180845.
8. Yadav D., Kumar R., Dixit R.K., Kant S., Verma A., Srivastava K., Singh S.K., Singh S. Association of NAT2 gene polymorphism with antitubercular drug-induced hepatotoxicity in the Eastern Uttar Pradesh population. *Cureus*. 2019; 11 (4): e4425. DOI: 10.7759/cureus.4425.
9. Dursun R., Dursun H.G., Zamani A.G., Yıldırım M.S., Çınar İ. NAT2 gene polymorphisms in Turkish patients with psoriasis vulgaris. *Biomed. Res. Int.* 2018; 3258708. DOI: 10.1155/2018/3258708.
10. Birch Kristensen E., Yakimov V., Bjorn-Mortensen K., Söborg B., Koch A., Andersson M., Birch Kristensen K., Michelsen S.W., Skotte L., Ahrendt Bjerregaard A., Blaszkewicz M., Golka K., Hengstler J.G., Feenstra B., Melbye M., Geller F. Study of correlation between the NAT2 phenotype and genotype status among Greenlandic Inuit. *EXCLI J.* 2018; 17: 1043–1053. DOI: 10.17179/excli2018-1671.
11. Sabbagh A., Darlu P., Crouau-Roy B., Poloni E.S. Arylamine N acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: a worldwide population survey. *PLoS One*. 2011; 6 (4): e18507. DOI: 10.1371/journal.pone.0018507.
12. Tang H., Quertermous T., Rodriguez B., Kardia S.L., Zhu X., Brown A., Pankow J.S., Province M.A., Hunt S.C., Boerwinkle E., Schork N.J., Risch N.J. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Amer. J. Human Genet.* 2005; 76 (2): 268–275.
13. Kuznetsov I.B., McDuffie M., Moslehi R. A web-server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype. *Bioinformatics*. 2009; 25 (9): 1185–1186.
14. Magalon H., Patin E., Austerlitz F., Quintana-Murci L., Heyer E. Population genetic diversity of the NAT2 gene supports a role of acetylation in human adaptation to farming in Central Asia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008; 16 (2): 243–251. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201963.
15. Xiang Y., Ma L., Wu W., Liu W., Li Y., Zhu X., Wang Q., Ma J., Cao M., Wang Q., Yao X., Yang L., Wubuli A., Merle C., Milligan P., Mao Y., Gu J., Xin X. The incidence of liver injury in Uyghur patients treated for TB in Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China, and its association with hepatic enzyme polymorphisms NAT2, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e85905. DOI: 10.1371/journal.pone.0085905.
16. Possuelo L.G., Castelan J.A., de Brito T.C., Ribeiro A.W., Cafrune P.I., Picon P.D., Santos A.R., Teixeira R.L., Gregiani T.S., Hutz M.H., Rossetti M.L., Zaha A. Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2008; 64 (7): 673–681. DOI: 10.1007/s00228-008-0484-8.
17. Cramer J.P., Lohse A.W., Burchard G.D., Fischer L., Nashan B., Zimmermann M., Marx A., Kluge S. N-acetyltransferase 2 activity in isoniazid-associated acute hepatitis requiring liver transplantation. *Transpl. Int.* 2010; 23 (2): 231–233. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.00921.x.
18. An H.R., Wu X.Q., Wang Z.Y., Zhang J.X., Liang Y. NAT2 and CYP2E1 polymorphisms associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese patients. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012; 39 (6): 535–543. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2012.05713.x.
19. Kim S.H., Kim S.H., Bahn J.W., Kim Y.K., Chang Y.S., Shin E.S., Kim Y.S., Park J.S., Kim B.H., Jang I.J., Song J., Kim S.H., Park H.S., Min K.U., Jee Y.K. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and anti-TB drug-induced hepatitis. *Pharmacogenomics*. 2009; 10 (11): 1767–1779. DOI: 10.2217/pgs.09.100.
20. Hemanth Kumar A.K., Ramesh K., Kannan T., Sudha V., Haribabu H., Lavanya J., Swaminathan S., Ramachandran G. N-acetyltransferase gene polymorphisms plasma isoniazid concentrations in patients with tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 2017; 145 (1): 118–123. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_2013_15.

21. Shi J., Xie M., Wang J., Xu Y., Liu X. Susceptibility of N-acetyltransferase 2 slow acetylators to antituberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2015; 16 (18): 2083–2097. DOI: 10.2217/pgs.15.144.
22. Suvichapanich S., Fukunaga K., Zahroh H., Mushiroda T., Mahasirimongkol S., Toyo-Oka L., Chaikledkaew U., Jit-tikoon J., Yuliwulandari R., Yanai H., Wattanapokayakit S., Tokunaga K. NAT2 ultra-slow acetylator and risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a genotype-based meta-analysis. *Pharmacogenet. Genomics*. 2018; 28 (7): 167–176. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000339.
23. Wang P.Y., Xie S.Y., Hao Q., Zhang C., Jiang B.F. NAT2 polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2012; 16 (5): 589–595. DOI: 10.5588/ijtld.11.0377.
24. Zhang M., Wang S., Wilffert B., Tong R., van Soolingen D., van den Hof S., Alffenaar J.W. The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2018; 84 (12): 2747–2760. DOI: 10.1111/bcp.13722.
25. Lauterburg B., Smith C., Todd E., Mitchell J. Pharmacokinetics of the toxic hydrazine metabolites formed from isoniazid in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985; 235 (3): 566–570.
26. Donald P.R., Sirgel F.A., Venter A., Parkin D.P., Seifart H.I., van de Wal B.W., Werely C., van Helden P.D., Maritz J.S. The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. *Clin. Infect Dis.* 2004; 39 (10): 1425–1430.
27. Weiner M., Burman W., Vernon A., Benator D., Peloquin C.A., Khan A., Weis S., King B., Shah N., Hodge T. Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once weekly isoniazid and rifapentine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167 (10): 1341–1347.
28. Azuma J., Ohno M., Kubota R., Yokota S., Nagai T., Tsuyuguchi K., Okuda Y., Takashima T., Kamimura S., Fujio Y., Kawase I. Pharmacogenetics-based tuberculosis therapy research group. NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: A randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2013; 69 (5): 1091–1101. DOI: 10.1007/s00228-012-1429-9.

Вклад авторов

Краснова Н.М., Ефремова Е.Н., Егорова А.А., Филиппова О.И., Винокурова М.К., Алексеева Е.А. Чертовских Я.В., Рудых З.А., Татаринова Т.Е., Соколутов Д.А., Валь Н.С. – проведение исследования, статистический анализ и интерпретация данных. Кравченко А.Ф., Венгеровский А.И., Сычёв Д.А. – идея проведения исследования, разработка дизайна исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.

Сведения об авторах

Краснова Наталья Михайловна, канд. мед. наук, доцент, кафедра «Госпитальная терапия, профессиональные болезни и клиническая фармакология», СВФУ им. М.К. Аммосова, г. Якутск. ORCID 0000-0002-4811-7801.

Ефремова Ефросинья Николаевна, врач-фтизиатр, НПП «Фтизиатрия», г. Якутск. ORCID 0000-0001-6934-2971.

Егорова Александра Алексеевна, врач-фтизиатр, НПП «Фтизиатрия», г. Якутск. ORCID 0000-0002-3027-2731.

Филиппова Ольга Ивановна, врач-фтизиатр, зав. отделением для больных туберкулезом органов дыхания, НПП «Фтизиатрия», г. Якутск. ORCID 0000-0003-4213-2901.

Чертовских Яна Валерьевна, врач клинический фармаколог, зав. Центром персонализированной медицины, РКБ № 3, г. Якутск. ORCID 0000-0003-0941-8633.

Рудых Зоя Александровна, врач клинический фармаколог, Центр персонализированной медицины, РКБ № 3, г. Якутск. ORCID 0000-0001-8212-0150.

Алексеева Елизавета Александровна, биолог, Центр персонализированной медицины, РКБ № 3, г. Якутск. ORCID 0000-0001-6116-5720.

Татаринова Татьяна Евгеньевна, врач клинический фармаколог, Центр персонализированной медицины, РКБ № 3, г. Якутск. ORCID 0000-0002-2616-3655.

Соколутов Денис Андреевич, ординатор, СВФУ им. М.К. Аммосова, г. Якутск. ORCID 0000-0002-7255-5238.

Валь Наталья Семеновна, канд. мед. наук, зам. директора по медицинской части, НПП «Фтизиатрия», г. Якутск. ORCID 0000-0003-2910-1895.

Винокурова Мария Константиновна, д-р мед. наук, зам. директора по науке, НПП «Фтизиатрия», г. Якутск. ORCID 0000-0001-7673-3815.

Кравченко Александр Федорович, д-р мед. наук, директор, НПП «Фтизиатрия», г. Якутск. ORCID 0000-0002-9210-3407.

Венгеровский Александр Исаакович, д-р мед. наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, зав. кафедрой фармакологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5094-3742.

Сычёв Дмитрий Алексеевич, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии, РМАНПО, г. Москва. ORCID 0000-0002-4496-3680.

(✉) **Краснова Наталья Михайловна**, e-mail: krasnova14@mail.ru.

Поступила в редакцию 19.04.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Анальгетическое действие производного гексаазаизовюрцитана на моделях соматической боли, вызванной активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов

Крылова С.Г.¹, Лопатина К.А.¹, Зуева Е.П.¹, Сафонова Е.А.¹, Поветьева Т.Н.¹,
Нестерова Ю.В.¹, Афанасьева О.Г.¹, Кульпин П.В.¹, Суслов Н.И.¹, Кулагина Д.А.²,
Сысолятин С.В.², Жданов В.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФирМ)
им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской
академии наук
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

² Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук
(ИПХЭТ СО РАН)
Россия, 659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка анальгетического действия тиовюрцина в условиях активации TRPA1- и TRPV1-ионных каналов на моделях соматогенной ноцицепции.

Материалы и методы. Объектом исследования является соединение 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (тиовюрцин). Исследование анальгетической активности тиовюрцина проводили в условиях хемотропной модели активации TRPA1-каналов (формалиновый тест) и в селективном (капсаициновом тесте) с агонистом TRPV1-каналов – капсаицином. Соединение вводили однократно *per os* в диапазоне доз 50–200 мг/кг (водно-твинный растворитель) за 1 ч до экспериментальных воздействий. В качестве референс-препаратов использовали диклофенак натрия превентивно однократно *per os* в дозе 10 мг/кг на 1%-м растворе крахмальной слизи в объеме 0,2 мл/мышь, кеторолак – в дозе 6 мг/кг в аналогичном растворителе, объеме и пути введения.

Результаты. Установлено, что тиовюрцин при превентивном однократном *per os* введении в дозах 100 и 200 мг/кг эффективно блокирует ноцицептивные реакции, обусловленные активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов. При этом анальгетическая активность тиовюрцина оказалась сравнимой и (или) превосходящей действие кеторолака и диклофенака в зависимости от модельной ситуации. Кроме того, выявлено, что тиовюрцин (200 мг/кг *per os*) соответствует диклофенаку натрия (10 мг/кг *per os*) и превосходит кеторолак (6 мг/кг *per os*) по выраженности противовоспалительного действия в формалиновом тесте.

Заключение. Бифазность поведенческих реакций в прогностическом «Формалиновом тесте» не позволяет однозначно сделать вывод о направленности механизма действия тиовюрцина, что подтверждает гипотезу о полимодальности. Данные, полученные на двух моделях соматогенной ноцицепции, не исключают того, что модуляция активности рецепторов TRPA1- и TRPV1-ионных каналов является одним из механизмов его анальгетического действия. По сочетанию выявленных ключевых для анальгетика характеристик тиовюрцин является уникальным веществом с высоким терапевтическим и инновационным потенциалом.

Ключевые слова: гексаазаизовюрцитан, тиовюрцин, анальгетическая активность, соматогенная ноцицепция, TRP-ионные каналы, кеторолак, диклофенак, капсаицин, формалиновый тест, противовоспалительная активность.

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

✉ Крылова Светлана Геннадьевна, e-mail: krylova5935@gmail.com.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках реализации государственного контракта № 14.N08.11.0179.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол JACUC № 96092015 от 16.09.2015).

Для цитирования: Крылова С.Г., Лопатина К.А., Зуева Е.П., Сафонова Е.А., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Афанасьева О.Г., Кульпин П.В., Суслов Н.И., Кулагина Д.А., Сысолятин С.В., Жданов В.В. Анальгетическое действие производного гексаазановюрцитана на моделях соматической боли, вызванной активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 110–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-110-118>.

Analgesic action of hexaazaisowurtzitane derivative in somatic pain models caused by TRPA1 and TRPV1 Ion channels activation

Krylova S.G.¹, Lopatina K.A.¹, Zueva E.P.¹, Safonova E.A.¹, Povet'eva T.N.¹, Nesterova Yu.V.¹, Afanas'eva O.G.¹, Kul'pin P.V.¹, Suslov N.I.¹, Kulagina D.A.², Sysolyatin S.V.², Zhdanov V.V.¹

¹Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIP&RM), Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Sciences
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

²Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
1, Socialist Str., Biysk, 659322, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the analgesic action of thiowurtzine in somatogenic nociception models by activation of TRPA1 and TRPV1 ion channels.

Materials and methods. The object of the study is the compound 4-(3,4-dibromothiophenecarbonyl)-2,6,8,12-tetraacetyl-2,4,6,8,10,12-hexaazatetracyclo [5.5.0.^{03,11}.0^{6,9}]dodecane (thiowurtzine). The analgesic activity of thiowurtzine was studied under the conditions of a chemogenic activation model of TRPA1 channels (by the formalin test), and by a selective test with an agonist of TRPV1 channels (the capsaicin test). The compound was administered once *per os* in a dose range of 50–200 mg/kg (water-tween solvent) an hour before the experimental manipulations. The reference drugs were diclofenac sodium in a preventive single *per os* dose of 10 mg/kg in 1% starch gel in a volume of 0.2 ml/mouse, and ketorolac in a dose of 6 mg/kg in the same solvent, volume and route of administration.

Results. Thiowurtzine, when administered in *per os* doses of 100 and 200 mg/kg, was found to effectively block nociceptive reactions caused by activation of TRPA1 and TRPV1 ion channels. At the same time, the analgesic activity of thiowurtzine turned out to be comparable and/(or) superior to the ketorolac and diclofenac action, depending on the model situation. In addition, it was found that thiowurtzine (200 mg/kg *per os*) corresponds to diclofenac sodium (10 mg/kg *per os*) and is superior to ketorolac (6 mg/kg *per os*) in terms of anti-inflammatory severity in the formalin test.

Conclusion. The biphasicity of behavioral reactions in the prognostic formalin test do not allow for an unambiguous conclusion about the direction of the action mechanism of thiowurtzine, which confirms the polymodality hypothesis. The data obtained in the two models of somatogenic nociception do not exclude the fact that the modulation of the TRPA1 and TRPV1 activity is one of the mechanisms of the thiowurtzine analgesic action. By the key analgesic characteristics found herein, thiowurtzine proves to be a unique compound with a high therapeutic and innovation potential.

Conclusion. The biphasicity of behavioral reactions in the prognostic formalin test do not allow for an unambiguous conclusion about the direction of the action mechanism of thiowurtzine, which confirms the polymodality hypothesis. The data obtained in the two models of somatogenic nociception do not exclude the fact that the modulation of the TRPA1 and TRPV1 activity is one of the mechanisms of the thiowurtzine analgesic action. By the key analgesic characteristics found herein, thiowurtzine proves to be a unique compound with a high therapeutic and innovation potential.

Key words: hexaazaisowurtzitane, thiowurtzine, analgesic activity, somatogenic nociception, TRP ion channels, formalin test, capsaicin, ketorolac, diclofenac, anti-inflammatory activity

Conflict of interest. Authors declare no obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This study was carried out under the State Contract No. 14.N08.11.0179.

Conformity with the principles of ethics. Study was approved by the Bioethics Committee of the GRIP&RM, TNRC (JACUC protocol No. 96092015 of 16.09.2015).

For citation: Krylova S.G., Lopatina K.A., Zueva E.P., Safonova E.A., Povet'eva T.N., Nesterova Yu.V., Afanas'eva O.G., Kul'pin P.V., Suslov N.I., Kulagina D.A., Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V. Analgesic action of hexaazaisowurtzitane derivative in somatic pain models caused by TRPA1 and TRPV1 ion channels activation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 110–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-110-118>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из новых направлений фармацевтики является синтез молекул-кандидатов с целью разработки на их основе ненаркотических анальгетиков для купирования сильной и средней боли [1]. В стационарных и амбулаторных условиях для терапии боли различной этиологии у пациентов используются, главным образом, три типа анальгетиков: на основе опиатов и каннабиоидов с разной анальгетической активностью, нестероидных противовоспалительных веществ, а также их комбинации в схемах мультимодальной терапии [1–3]. Для купирования сильной и средней боли альтернативой опиатам могут служить ненаркотические анальгетики, действующие на центральную и периферическую системы передачи нервного импульса у человека и обладающие целым рядом преимуществ. Однако число возможных молекул-кандидатов в ненаркотические анальгетики крайне ограничено. Одним из современных подходов для получения инновационных молекул является разработка методов направленного конструирования и синтеза оригинальных соединений.

В результате межотраслевого взаимодействия ИПХЭТ СО РАН и НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ была получена первая в мире молекула в новом классе веществ 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (тиовюрцин) для медицинского применения (патент РФ № 2565766 от 23.09.2015). Инновационное соединение создано технологией направленного синтеза по результатам прогнозирования с помощью программного пакета PASS и является первым в классе гексаазаизовюрцитанов. Начиная с 1980-х гг., многочисленные исследования, связанные с синтезом этого класса соединений, носили преимущественно оборонный характер. Лишь в последние годы гексаазаизовюрцитан нача-

ли применять в качестве фармакофора для разработки оригинальных фармацевтических субстанций [4].

В проведенных ранее исследованиях выявлена выраженная анальгетическая активность инновационного соединения в условиях термического ноцицептивного теста «Горячая пластина» и модели острой висцеральной и соматически глубокой боли «Укусные корчи», сравнимая и (или) превышающая действие диклофенака натрия, кеторолака и трамадола. Отсутствие влияния тиовюрцина на продукцию основных медиаторов воспаления (гистамина, серотонина, простагландина) и ulcerогенной активности в диапазоне доз 25–200 мг/кг позволило заключить об отсутствии его ЦОГ-зависимого действия [5]. При этом доказано его выраженное противовоспалительное действие на модели арахидонового воспаления, умеренное – на моделях брадикининового и каррагенинового воспаления [6]. Соединение можно отнести к 3-му классу опасности (летальная доза (ЛД₅₀) находится в пределах 150–5 000 мг/кг), ГОСТ 12.1.007-76. При максимально возможном объеме однократного введения тиовюрцина ЛД₅₀ (или гибели животных) достигнуто не было. Тиовюрцин не вызывал респираторную депрессию, изменений в рефлекторной деятельности желудочно-кишечного тракта. При исследовании механизма действия тиовюрцина выявлена налоксон-чувствительная анальгезия, доказано отсутствие тропности к периферическим опиоидным рецепторам с использованием налоксона метиодита [5].

Таким образом, совокупность представленных данных свидетельствует о полимодальности механизма действия соединения, что обуславливает проведение дальнейших исследований в этом аспекте.

Цель исследования – оценка анальгетического действия тиовюрцина в условиях активации TRPA1- и TRPV1-ионных каналов на моделях соматогенной ноцицепции (формалиновый и капсаициновый тесты).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 50 аутбредных половозрелых самцах мышей сток CD1, 48 самцах мышей линии СВА (возраст 7–8 нед), первой категории, конвенциональных. Животные получены из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (сертификат здоровья животных имеется). Содержание животных и дизайн экспериментов одобрены биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол JACUSC № 96092015 от 16.09.2015), соответствовали Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и Приказу Министерства здравоохранения РФ (№ 199н от 1.08.2016).

Дизайн экспериментов, объем выборки, схема ведения экспериментов, выбор статистического анализа определены оптимальным образом для данного вида исследования и позволяют получить достоверные данные для интерпретации результатов без увеличения количества животных. Перед началом эксперимента каждому животному внутри группы присваивали индивидуальный номер, помечаемый с помощью меток фукорцином. Распределение на группы осуществляли рандомизированно, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах одной группы более чем на $\pm 10\%$. По окончании экспериментов эвтаназия мышей производилась методом краниоцервикальной дислокации.

Исследуемая инновационная молекула представляет собой полиазотистое полициклическое соединение каркасного строения – 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан. Соединение получено впервые ацилированием промышленно доступного 2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекана (гексаазаивюрцитана) хлорангидридом 3,4-дибромтиофенкарбоновой кислоты. Характеристика тиовюрцина (бесцветный кристаллический продукт с содержанием основного вещества 99,0% и единичной примеси не более 0,2% (метод высокоэффективной жидкостной хроматографии), температурой плавления 328–330 °C) полностью подтверждена физико-химическими методами исследования: ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$, спектр ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.), спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.).

Проведенные ранее исследования анальгетической активности тиовюрцина позволили определить терапевтическую дозу анальгетика 100 мг/кг *per os*

[5, 6]. Тиовюрцин вводили превентивно однократно внутрь через зонд в диапазоне доз 50–200 мг/кг (водно-гвиновый растворитель) за 1 ч до экспериментальных манипуляций. В качестве препаратов сравнения использовали диклофенак натрия (Немофарм, Россия) превентивно однократно внутрь через зонд в дозе 10 мг/кг в виде суспензии на 1%-м растворе крахмальной слизи в объеме 0,2 мл/мышь, кеторолак (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия) – в дозе 6 мг/кг в аналогичном растворителе, объеме и пути введения. Предлагаемые дозы референс-препаратов соответствовали средней терапевтической дозе для человека. Животные группы негативного контроля получали эквивалентные количества растворителя – водно-гвиновой смеси в аналогичном режиме.

Формалиновый тест. Формалиновый тест, являющийся хемотропной моделью острой болевой реакции, имитирует болевые реакции различного генеза (соматические травмы, ожоги, порезы, химические повреждения, операционные кожные разрезы) [7]. Одним из механизмов ноцигенного действия формалина является активация TRPA1-каналов, реагирующих в норме на холод и стимулирующих развитие термической и механической гипералгезии [8].

Животных распределяли на пять групп: 1-я, контроль, – без лечения; 2-я, кеторолак, – 6 мг/кг; 3-я, диклофенак, – 10 мг/кг; 4-я, тиовюрцин, – 100 мг/кг; 5-я, тиовюрцин, – 200 мг/кг. Тестируемый объект и препараты сравнения вводили за 1 ч до начала опыта. Гипералгезию моделировали подкожным введением 20 мкл 2%-го водного раствора формалина интраплантарно в подушечку правой задней лапки по истечении 1 ч. Интенсивность болевой ответа в первую и во вторую фазы теста регистрировали ежесекундно по количеству и продолжительности поведенческих паттернов («флинчей») болевых реакций (облизываний, потряхиваний) инъекционной лапы в течение 60 мин. Время паттернов суммировалось для каждого животного. Анальгетическую активность соединений оценивали отдельно для I (первые 10 мин после введения формалина) и II (с 10-ю по 60-ю мин после введения формалина) фаз ноцицептивного ответа по уменьшению числа болевых реакций относительно таковых негативного контроля.

Капсаициновый тест. Исследование анальгетической активности новой молекулы в селективном тесте с агонистом TRPV1-каналов является необходимым этапом в изучении специфической фармакологической активности. Этот тест позволяет оценить влияние вещества на чувствительность TRPV1-каналов, находящихся, главным образом, в ноцицептивных нейронах периферической и центральной нервной системы [9].

Животных распределяли на пять групп: 1-я (контроль) – без лечения; 2-я (кеторолак) – 6 мг/кг; 3-я (тиовюрцин) – 50 мг/кг; 4-я (тиовюрцин) – 100 мг/кг; 5-я (тиовюрцин) – 200 мг/кг. За 1 ч до начала опыта вводили тестируемый объект и референс-препарат. Через 1 ч инъецировали 10 мкл раствора капсаицина (3 мкг/10 мкл 10%-го этанола, растворенного в 0,9%-м NaCl) интраплаттарно в подушечку левой задней лапы. После введения лапу протирали этанолом для предотвращения кожного раздражения капсаицином. Фиксировали время (латентный период), которое пройдет до начала реакции (мышь начинала сильно трясти лапой и облизывать ее). Далее регистрировали ежесекундно количество паттернов облизывания и суммарное время облизывания лапы в течение 15 мин для каждой мыши. Основными критериями эффективности является суммарное время облизывания и продолжительность болевой реакции.

Оценка противовоспалительного эффекта. По окончании двух серий экспериментов животные были подвергнуты эвтаназии, после чего обе задние лапки (воспаленная и здоровая) выделены по выступу кости ниже сочленения мало- и большеберцовой кости и выше пяточного сустава, определена их масса на лабораторных электронных весах. Противовоспалительный эффект, оцениваемый по изменению массы отека, был выражен в процентах к контролю и посчитан по соответствующим формулам [10].

Статистическая обработка полученных результатов проведена методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Для всех данных подсчитаны среднее значение ($\bar{X}$) и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$), которые вместе со значением n (количество вариант в группе) представлены в табл. 1, 2. Различия сравниваемых величин считали достоверным в случае вероятности их тождества меньше 5% ($p < 0,05$). Используя выборочные коэффициенты асимметрии и эксцесса, оценивали степень приближения закона распределения исследуемого признака к нормальному. При отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок использовали непараметрический критерий U -критерий Вилкоксона – Манна – Уитни. Для выявления достоверности различий качественных показателей использовали критерий углового преобразования Фишера [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Современная экспериментальная система, включающая в себя ноцицептивные тесты с использованием электрических, тепловых, механических и химических раздражителей, модуляцией боли на

различных уровнях организации чувствительности, позволяет получить спектр антиноцицептивных характеристик новых веществ и, в определенной мере, прогнозировать характер их обезболивающего действия у человека [9, 11, 12].

Подкожное введение формалина в дорзальную поверхность задней лапки вызывало характерную бифазную поведенческую ноцицептивную реакцию (рис.), о чем свидетельствует сумма болевых реакций у контрольных животных в I фазе ноцицептивного ответа ($30,8 \pm 1,6$) «флинчей»; во II фазе – ($13,2 \pm 2,6$).

В условиях формалинового теста, который моделирует клиническую ситуацию как острой (фаза I), так и тонической боли (фаза II), выявлена анальгетическая активность тиовюрцина в обеих фазах [8]. В I фазе теста тиовюрцин при превентивном однократном внутрижелудочном через зонд введении в дозах 100 и 200 мг/кг статистически достоверно уменьшал число начальных болевых реакций в виде поднятия конечности относительно соответствующих показателей контроля, при этом отмечалось отсутствие активности референс-препаратов диклофенака и кеторолака. Первая фаза формалинового теста характеризует острую боль, возникающую в ответ на инъекцию химического раздражителя, и связана, в основном, с прямой активацией тонких немиелиновых C-волокон, большинство из которых передает импульсацию от болевых рецепторов, в данном случае TRPA1-каналов [7–9]. На этом этапе наблюдения тиовюрцин умеренно ограничивал проявления острой боли, обусловленной активацией TRPA1-каналов ноцигенным действием формалина (рис.).

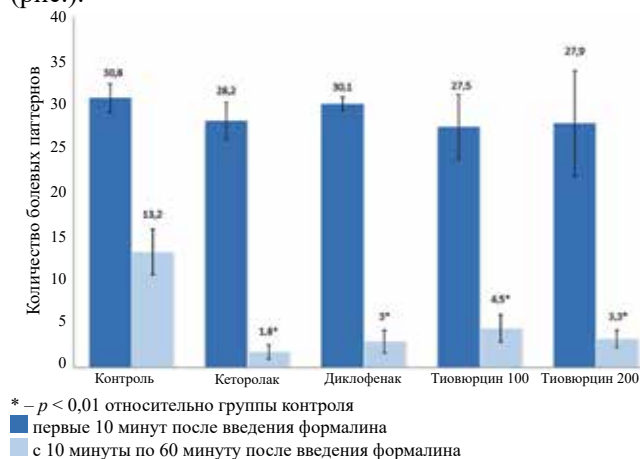


Рисунок. Болевая реакция у мышей в интервале 40–50 мин после введения формалина

Во II фазе формалинового воспаления тиовюрцин в дозах 100 и 200 мг/кг уменьшал количество типичной для данного теста поведенческой реакции облизывания лап в 3,4 ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$)

соответственно относительно данных контрольной группы (см. рис.). При анализе количества паттернов встряхивания лап выявлена сходная анальгетическая активность тестируемого вещества и референс-препаратов. Установлено отсутствие этой реакции у животных, получавших тиовюрцин в дозе 200 мг/кг, а применение соединения в дозе 100 мг/кг приводило к снижению числа встряхиваний в 5,3 раза относительно показателя негативного контроля, что свидетельствует о выраженном сдерживающем компоненте развития болевой реакции. Значения суммы болевой реакции тиовюрцина в дозах 100 мг/кг ($4,5 \pm 1,6$; $p < 0,01$) и 200 мг/кг ($3,3 \pm 1,0$; $p < 0,01$) оказались аналогичными показателям препаратов сравнения кеторолака ($1,8 \pm 0,8$; $p < 0,01$) и диклофенака ($3,0 \pm 1,3$; $p < 0,01$) по степени выраженности формалиновой гипералгезии.

При исследовании противовоспалительного действия тиовюрцина во II фазе ноцицептивного ответа выявлен его статистически значимый эффект в дозе 100 мг/кг. По снижению уровня воспалительного прироста конечности тиовюрцин в дозе 200 мг/кг (26%) соответствовал диклофенаку натрия (32%) и превосходил кеторолак (14%) (табл. 1).

Таблица 1

Показатели противовоспалительного действия тиовюрцина в условиях теста «Формалиновое воспаление» у аутобредных самцов мышей линии CD1		
Группа наблюдения, доза препарата	Прирост конечности, $M \pm m$, %	Угнетение воспаления конечности, %
Контроль, водно-твиновый раствор ($n = 10$)	$48,0 \pm 2,5$	–
Кеторолак, 6 мг/кг ($n = 10$)	$41,2 \pm 4,8^*$	14
Диклофенак, 10 мг/кг ($n = 10$)	$32,8 \pm 1,5^*$	32
Тиовюрцин, 100 мг/кг ($n = 10$)	$41,2 \pm 2,2^*$	14
Тиовюрцин, 200 мг/кг ($n = 10$)	$35,4 \pm 3,2^*$	26

Примечание. Количество животных – n (здесь и в табл. 2).

* $p_U < 0,05$.

На втором этапе эксперимента применение тиовюрцина приводило к снижению интенсивности то-

нической боли за счет уменьшения воспалительного процесса (см. табл. 1) в периферических тканях и возможному изменению функции нейронов задних рогов спинного мозга, где лежат нейроны болевых восходящих путей. Формалиновый тест имеет достаточно высокую прогностическую значимость при исследовании механизма действия новых потенциальных анальгетиков, поскольку известно, что опиоидные анальгетики блокируют обе фазы ноцицепции, нестероидные противовоспалительные средства подавляют только вторую фазу, а местные анестетики – только первую [7, 8, 10].

Бифазность поведенческих реакций мышей в группах применения тиовюрцина не позволяет однозначно сделать вывод о направленности механизма действия тиовюрцина. Если в I фазе выявлен умеренный антиноцицептивный эффект анальгетика на фоне отсутствия активности референс-препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств, то во II фазе преимущественно эффективно блокировал болевой ответ животных. При этом интенсивность болевой реакции во вторую фазу, судя по уменьшению продолжительности паттернов облизывания в группе тиовюрцина, оказалась сопоставимой с выраженностью антиноцицептивной активности кеторолака и диклофенака. Кроме того, выявленная ранее налоксон-чувствительная анальгезия тиовюрцина не исключает возможности вовлечения опиоидэргической системы в реализации его антиноцицептивной активности в двух фазах эксперимента [5]. Совокупность полученных результатов определяет необходимость дальнейшего исследования на других моделях ноцицепции.

Интраплатантное введение раствора капсаицина вызывало выраженную поведенческую ноцицептивную реакцию в виде облизывания и встряхивания лапки у животных контрольной группы. При этом все параметры развития болевой реакции и поведенческих паттернов соответствуют данным литературы и свидетельствуют о воспроизведении модельной ситуации (табл. 2).

Таблица 2

Показатели антиноцицептивной активности тиовюрцина при превентивном однократном внутрижелудочном введении в условиях капсаицинового теста у самцов мышей линии CBA, $M \pm m$					
Группа животных, доза препарата	Латентное время болевой реакции, с	Количество		Суммарное время облизываний, с	Продолжительность болевой реакции, с
		облизываний	встряхиваний		
Контроль, вода очищенная ($n = 8$)	$8,8 \pm 1,8$	$9,4 \pm 1,6$	$5,6 \pm 1,3$	$86,6 \pm 20,6$	$820,0 \pm 31,1$
Кеторолак, 6 мг/кг ($n = 10$)	$25,1 \pm 7,1^*$	$5,0 \pm 0,9^*$	$1,6 \pm 0,5^*$	$38,4 \pm 13,0$	$347,6 \pm 79,6^*$
Тиовюрцин, 50 мг/кг ($n = 10$)	$62,8 \pm 21,6^*$	$8,7 \pm 2,0$	$2,6 \pm 1,0$	$82,0 \pm 35,1$	$579,4 \pm 57,9^*$
Тиовюрцин, 100 мг/кг ($n = 9$)	$18,7 \pm 5,0^*$	$6,3 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,4^{**}$	$30,4 \pm 10,2^{**}$	$421,4 \pm 75,0^*$
Тиовюрцин, 200 мг/кг ($n = 10$)	$61,2 \pm 20,1^{**}$	$5,2 \pm 1,2^*$	$1,6 \pm 0,7^*$	$20,6 \pm 5,0^{**}$	$326,6 \pm 86,4^*$

* $p_U < 0,05$; ** $p_U < 0,01$ относительно группы негативного контроля.

Как и следовало ожидать, применение кеторолака вызывало значительное снижение выраженности болевой реакции у самцов мышей линии СВА: увеличение в 2,9 раза ($p < 0,05$) латентного периода развития болевого ответа, снижение количества облизываний в 1,9 раза ($p < 0,05$), числа встряхиваний лапы – в 3,5 раза ($p < 0,05$) относительно аналогичных данных контрольной группы (см. табл. 2). Следует отметить снижение продолжительности болевой реакции в 2,4 раза ($p < 0,01$). Вышеприведенные результаты соответствуют данным литературы о выраженности обезболивающего эффекта кеторолака.

Анализ результатов группы применения тиовюрцина позволяет сделать заключение о его выраженном дозозависимом анальгетическом эффекте. При этом не выявлено статистически значимых различий с данными группы применения кеторолака. Так, при введении соединения в дозе 50 мг/кг фиксировалось увеличение латентного времени болевой реакции в 7,1 раза ($p < 0,05$) относительно показателя группы контроля, в 1,7 раза – относительно показателя группы кеторолака. По совокупности полученных результатов продолжительность болевой ответа снизилась в 1,4 раза ($p < 0,05$) относительно аналогичного показателя негативного контроля.

Выраженная анальгетическая активность тиовюрцина в дозе 100 мг/кг проявлялась в статистически достоверном увеличении периода наступления болевой реакции, уменьшении количества встряхиваний лапы в 4,0 раза ($p < 0,01$), суммарного времени облизывания в 2,8 раза ($p < 0,01$) и продолжительности болевой реакции в 1,9 раза ($p < 0,01$) относительно соответствующих показателей контрольной группы.

В случае введения тиовюрцина в дозе 200 мг/кг все анализируемые показатели статистически достоверно отличались от аналогичных значений контрольной группы. Так, латентное время наступления болевой реакции повысилось в 7,0 раза ($p < 0,05$), количество облизываний и встряхиваний уменьшилось в 1,8 ($p < 0,05$) и 3,5 раза ($p < 0,05$) соответственно. При этом суммарное время облизываний снизилось в 4,2 раза ($p < 0,01$), а продолжительность болевой реакции – в 2,5 раза ($p < 0,05$) относительно соответствующих значений негативного контроля. Механизм развития болевой реакции связан с активацией ионных каналов на ноцицепторах в тканях при химическом и механическом повреждении. Такое повреждение успешно провоцируется введением капсаицина – прямого агониста TRPV1-каналов [9].

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что исследуемое соединение блокировало развитие боли при введении капсаицина мышам,

причем наблюдаемый эффект был дозозависимым, достигал максимума при назначении тиовюрцина в дозах 100 и 200 мг/кг и был сравним с анальгетическим эффектом кеторолака.

В настоящее время к фармакологически наиболее актуальным биомишеням нервной системы человека для анальгезии относят рецепторы из семейства белков TRP-ионных каналов, открытие которых явилось важным этапом в изучении природы болевых ощущений на молекулярном уровне [13–16]. Поиск модуляторов и антагонистов активности рецепторов TRP-ионных каналов и разработка на их основе высокоэффективных анальгетиков с минимальным количеством побочных эффектов являются одним из приоритетных направлений работы научно-исследовательских лабораторий во всем мире [13, 16]. Выявленные свойства тиовюрцина актуализируют дальнейшую разработку на его основе уникальных препаратов, предназначенных для терапии сильной и средней боли различного генеза. Выраженная антиноцицептивная активность соединения уже через 1 ч после введения свидетельствует о возможности использования препаратов на основе тиовюрцина для купирования болевого синдрома в экстремальных ситуациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что тиовюрцин при превентивном однократном *per os* введении в дозах 100 и 200 мг/кг эффективно блокирует ноцицептивные реакции, обусловленные активацией TRPA1- и TRPV1-ионных каналов. При этом анальгетическая активность тиовюрцина оказалась сравнимой и (или) превосходящей действие кеторолака и диклофенака в зависимости от модельной ситуации. Кроме того, выявлено, что тиовюрцин (200 мг/кг *per os*) соответствует диклофенаку натрия (10 мг/кг *per os*) и превосходит кеторолак (6 мг/кг *per os*) по выраженности противовоспалительного действия в формалиновом тесте. Полученные результаты экспериментов дают возможность утверждать, что выраженное антиноцицептивное действие инновационного соединения в условиях моделей (капсаициновый тест и формалиновый тест) обусловлено взаимодействием с биомишенями TRPV1 и TRPA.

Совокупность ранее полученных данных может свидетельствовать в пользу того, что модуляция активности рецепторов TRP-ионных каналов является одним из механизмов его анальгетического действия. По сочетанию выявленных ключевых для анальгетика характеристик тиовюрцин является уникальным веществом с высоким терапевтическим и инновационным потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соснов А.В., Садовников С.В., Семченко Ф.М., Руфанов К.А., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А., Тюрин И.А. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 14 (1): 196–206.
2. Михайлова А.С. Анальгетический арсенал клинициста. *Фарматека*. 2018; (S3): 50–56.
3. Cawich S.O., Deonarine U., Harding H.E., Dan D., Naraynsingh V. Cannabis and postoperative analgesia. handbook of cannabis and related pathologies. *Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*. 2017; 450–458. DOI: 10.1016/B978-0-12-800756-3.00052-1.
4. Sysolyatin S.V., Kalashnikov A.I., Malykhin V.V. Reductive debenzelation of 2,4,6,8,10,12 – hexaazaisowurtzitan. *International Journal of Energetic Materials and Chemical Propulsion*. 2010; 9 (4): 365–375. DOI: 10.1615/IntJEnergeticMaterialsChemProp.
5. Krylova S.G., Povet'eva T.N., Zueva E.P., Suslov N.I., Amosova E.N., Razina T.G., Lopatina K.A., Rybalkina O.Yu., Nesterova Yu.V., Afanas'eva O.G., Kiseleva E.A., Sysolyatin S.V., Kulagina D.A., Zhdanov V.V. Analgesic activity of hexaazaisowurtzitane derivatives. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 166 (4): 461–465. DOI: 10.1007/s10517-019-04372-9.
6. Лопатина К.А., Крылова С.Г., Зуева Е.П., Сафонова Е.А., Разина Т.Г., Рыбалкина О.Ю., Поветьева Т.Н., Суслов Н.И., Кулагина Д.А., Минакова М.Ю., Сысолятин С.В. Изучение механизма действия нового анальгетика производного гексаазаизовюрцитана: эффекты медиаторов воспаления. *Российский журнал боли*. 2018; 58 (4): 68–72. DOI: 10.25731/RASP.2018.04.031.
7. McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (33): 13525–13530. DOI: 10.1073/pnas.0705924104.
8. Tjølsen A., Berge O.G., Hunskaar S. Roslandet J.H., Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51 (1). DOI: 10.1016/0304-3959(92)90003-T.
9. Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н. *In vivo* модели для изучения анальгетической активности. *Биомедицина*. 2011; 2: 84–94.
10. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2013: 944.
11. Rice A.S., Cimino-Brown D., Eisenach J.C., Kontinen V.K., Lacroix-Fralish M.L., Machin I.; Preclinical Pain Consortium, Mogil J.S., Stöhr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain*. 2008; 139 (2): 243–247. DOI: 10.1016/j.pain.2008.08.017.
12. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012; 211: 39–50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.
13. Lee L.Y., Hsu C.C., Lin Y.J. Lin R.L., Khosravi M. Interaction between TRPA1 and TRPV1: synergy on pulmonary sensory nerves. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2015; 35: 87–93. DOI: 10.1016/j.pupt.2015.08.003.
14. Gaudet R. TRP channels entering the structural era. *J. Physiol*. 2008; 586 (15): 3565–3575. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.155812.
15. Full-Spectral multiplexing of bioluminescence resonance energy transfer in three TRPV channels. *Biophysical Journal*. 2017; 112 (1): 87–98. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.11.3197.
16. Weyer-Menkhooff I., Lötsch J. Human pharmacological approaches to TRP-ion-channel-based analgesic drug development. *Drug Discovery*. 2018; 23 (12): 2003–2012. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.06.020.

Вклад авторов

Крылова С.Г. – разработка концепции и дизайна экспериментов, участие в опытах, проверка критически важного интеллектуального содержания. Лопатина К.А. – организация и осуществление экспериментов, статистический анализ, написание статьи. Зуева Е.П. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Сафонова Е.А. – участие в экспериментах. Поветьева Т.Н. – разработка концепции и дизайна экспериментов, участие в экспериментах. Суслов Н.И. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Нестерова Ю.В. – участие в экспериментах, статистический анализ. Афанасьева О.Г. – участие в экспериментах. Кульпин П.В. – участие в экспериментах. Сысолятин С.В. – организация синтеза объекта исследования. Кулагина Д.А. – синтез и предоставление объекта исследования. Жданов В.В. – анализ результатов компьютерного прогнозирования фармакологической активности, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Крылова Светлана Геннадьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-0249-1395.

Лопатина Ксения Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-4445-4859.

Зуева Елена Петровна, д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6480-6770.

Сафонова Елена Андреевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0685-4192.

Поветьева Татьяна Николаевна, д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория фитофармакологии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-8644-489X.

Нестерова Юлия Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория фитофармакологии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1382-926X.

Афанасьева Ольга Геннадьевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория фитофармакологии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7374-5586.

Кульпин Павел Валерьевич, мл. науч. сотрудник, лаборатория фитофармакологии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск.

Суслов Николай Иннокентьевич, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией фитофармакологии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7993-5639.

Кулагина Дарья Александровна, канд. хим. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория медицинской химии, ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск. ORCID 0000-0002-4673-5817.

Сысолятин Сергей Викторович, д-р хим. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией медицинской химии, директор ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск. ORCID 0000-0002-1405-171X.

Жданов Вадим Вадимович, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-9516-0204.

(✉) **Крылова Светлана Геннадьевна**, krylova5935@gmail.com.

Поступила в редакцию 07.02.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Биоразлагаемые полимерные композиции с остеогенным потенциалом

Лебедев С.М.¹, Чистохин Д.М.¹, Щаденко С.В.¹, Дзюман А.Н.², Николаева О.О.³,
Митриченко Д.В.³, Просолов А.Б.³, Хлусов И.А.^{1, 2, 3, 4}

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Научно-производственная компания (НПК) «Синтел»
Россия, 634061, г. Томск, ул. Герцена, 45

⁴ Балтийский федеральный университет (БФУ) им. И. Канта
Россия, 236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование основных физико-механических свойств композитов гидроксиапатита (ГА) (до 25–50%) с полилактидом (ПЛА-ГА) и поли(ε-капролактоном) (ПКЛ-ГА), полученных методом смешения в расплаве, а также остеогенного потенциала ПЛА-ГА *in vivo*.

Материалы и методы. Все биоразлагаемые полимерные композиции изготовлены методом горячего компаундирования в расплаве, исследованы методами диэлектрической спектроскопии в частотном ходе, оптической микроскопии, рентгеноструктурного анализа и испытаний на растяжение. Способность композитов ПЛА-5% ГА, полученных методом 3D-печати, к *in vivo* индукции роста костной ткани изучена при помощи теста подкожного эктопического костеобразования на линейных мышах.

Результаты. Значения действительной составляющей комплексной диэлектрической проницаемости композиций ПЛА-ГА и ПКЛ-ГА увеличиваются на 15–30% по сравнению с исходными ПЛА и ПКЛ, при этом тангенс угла потерь не превышает 0,02 для композиций на основе ПЛА и 0,2 – для композиций на основе ПКЛ. Степень кристалличности для композиций ПЛА-ГА, по сравнению с показателем для ПЛА, увеличивается в 3 и 6 раз при повышении содержания ГА с 25 до 50% соответственно. Для композиции ПКЛ-ГА при 25% ГА степень кристалличности увеличивается в 2 раза по отношению к значению для ПКЛ. Это обусловлено тем, что частицы порошка ГА играют роль дополнительных центров кристаллизации. При этом статистически значимо снижается прочность композитов на разрыв. Композиты ПЛА, полученные методом 3D-печати, даже с низким (5%) содержанием ГА на 40% повышают результаты эктопического остеогенеза.

Заключение. Разработанные биоразлагаемые композиции имеют потенциал практического применения в приложении к биоинженерии костной ткани.

Ключевые слова: полилактид, поли(ε-капролактон), гидроксиапатит, компаундирование в расплаве, физико-механические свойства, эктопический остеогенез, *in vivo*.

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

Источник финансирования. Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (грант № НШ-2495.2020.7).

✉ Лебедев Сергей Михайлович, e-mail: lsm70@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград (протокол № 7 от 09.12.2015).

Для цитирования: Лебедев С.М., Чистохин Д.М., Щаденко С.В., Дзюман А.Н., Николаева О.О., Митриченко Д.В., Просолов А.Б., Хлусов И.А. Биоразлагаемые полимерные композиции с остеогенным потенциалом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 119–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-119-129>.

Biodegradable polymer composites with osteogenic potential

Lebedev S.M.¹, Chistokhin D.M.¹, Shchadenko S.V.¹, Dzuman A.N.², Nikolaeva O.O.³, Mitrichenko D.V.³, Prosolov A.B.³, Khlusov I.A.^{1, 2, 3, 4}

¹ National Research Tomsk Polytechnic University
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

² Siberian State Medical University
2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ SINTEL Research and Production Company
45, Gerzena Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

⁴ Immanuel Kant Baltic Federal University
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236041, Russian Federation

ABSTRACT

The aim is to study the basic physico-mechanical properties of hydroxyapatite (HA) composites (up to 25–50 wt%) with polylactide (PLA-HA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL-HA) prepared by melt compounding, as well as the osteogenic potential of PLA-HA *in vivo*.

Materials and methods. All biodegradable polymer composites were prepared by hot melt compounding and studied by dielectric spectroscopy in frequency domain, optical microscopy, X-ray diffraction analysis and tensile tests. An ability of PLA-5 wt% HA composites prepared by 3D-printing to induce bone tissue growth *in vivo* was detected with the help of ectopic subcutaneous test in inbred mice.

Results. Values of the real part of complex permittivity of PLA-HA and PCL-HA composites are increased by 15–30% compared to those for initial PLA and PCL, while tand loss factor does not exceed 0.02 for PLA-based composites and 0.2 for PCL-based composites. The crystallinity degree of PLA-HA composites is increased by 3 and 6 times with an increase of HA content from 25 to 50 wt% respectively compared to the indicator for PLA. The crystallinity degree of PCL-HA composites with 25 wt% HA is increased by 2 times compared to the value for PCL. It is due to the fact that HA powder particles play the role of additional nucleation centers. For all this, mechanical strength of composites diminished statistically. Even lowest HA content (5 wt%) in PLA-HA composites prepared by 3D-printing increased the incidence of ectopic osteogenesis by 40%.

Conclusion. Designed biodegradable composites have a potential of practical use for bone tissue engineering.

Key words: poly(lactic acid), poly(ϵ -caprolactone), hydroxyapatite, melt compounding, physicochemical properties, ectopic osteogenesis, *in vivo*.

Conflict of interest. Authors declare no obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was partially supported by the Council for Grants of the President of the Russian Federation for State Support of Leading Scientific Schools of the Russian Federation (Grant No. SSh-2495.2020.7).

Conformity to the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad (Protocol No. 7 of 09.12.2015).

For citation: Lebedev S.M., Chistokhin D.M., Shchadenko S.V., Dzuman A.N., Nikolaeva O.O., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Khlusov I.A. Biodegradable polymer composites with osteogenic potential. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 119–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-119-129>.

ВВЕДЕНИЕ

Биоразлагаемые полимеры, такие как полилактид (ПЛА) и поли(ε-капролактон) (ПКЛ), широко применяются в области биомедицины в качестве полимерных каркасов (скаффолдов) для содействия росту тканей и клеток во время регенерации костной ткани, а также для доставки лекарственных препаратов, когда лекарства смешиваются с полимерной матрицей и постепенно высвобождаются по мере разложения биополимера в организме человека [1–8]. ПЛА и ПКЛ могут разрушаться микроорганизмами в условиях окружающей среды, кроме того, ПКЛ подвержен как щелочному, так и ферментативному гидролизу [9, 10].

Обычные однофазные полимерные материалы не всегда удовлетворяют основным требованиям регенеративной медицины, поэтому существует большая потребность в разработке многофазных композиций со свойствами, подобными свойствам натуральной кости. Например, полилактид обладает хорошей способностью к биологическому разложению, однако очень низкое удлинение при разрыве или изгибе и хрупкость ограничивают его применение. Поли(ε-капролактон) обладает более высоким удлинением при разрыве, в то время как скорость его разложения ниже, чем для ПЛА. Различные органические и неорганические наполнители используются для улучшения свойств биоразлагаемых композиций, таких как механические свойства, водопоглощение, скорость разложения и биосовместимость, что делает эти композиционные материалы пригодными для использования в области биомедицины. Углеродные нанотрубки и углеродные волокна (УВ), производные графита, графен, слоистые силикаты, порошки сегнетоэлектрической и пьезоэлектрической керамики, гидроксиапатит (ГА) и другие материалы часто применяются в качестве наполнителей с заданными свойствами в таких многофазных биоразлагаемых композициях [7, 11–18].

Так, в работах [19–21] авторы показали эффективность применения биокомпозиционного материала «Остеоматрикс», включающего природные гидроксиапатиты, аминокликаны и коллагены, для регенерации костной ткани. Дефекты в поврежденных костях заполнялись биокомпозиционным материалом «Остеоматрикс» в виде порошка, гранул или блоков, что позволило существенно сократить срок формирования новой костной ткани у пациентов.

Многочисленные авторы показали, что добавление ГА в матрицы ПЛА или ПКЛ может улучшать как биосовместимость, так и механические свойства полимер-керамических композиций, поскольку ги-

дроксиапатит обладает наиболее сходным химическим составом с костной тканью человека [1, 22–32]. Так, Ж. Акиндо и соавт. [23] установили, что добавление ГА в ПЛА позволяет обеспечить лучшее приращение клеток и пролиферацию к матрице ПЛА. Добавление модификаторов в композиции ПЛА-ГА приводит к увеличению ударной прочности, прочности при растяжении и изгибе при их содержании в композициях около 5%.

Ж. Русиас и соавт. [28] наблюдали, что композиции на основе ПЛА, наполненные мелкозернистым порошком (средний размер частиц 5 мкм) или более крупными нитевидными кристаллами (длиной 25–30 мкм и диаметром 5 мкм) гидроксиапатита с содержанием керамики около 70–85%, можно использовать для изготовления скаффолдов с механическими свойствами, близкими к свойствам кости человека.

С. Чжан и соавт. [31] показали, что композиции ПЛА-ГА улучшают межфазную адгезию и прочность на изгиб. Кроме того, эти композиции пригодны для переработки методом 3D-печати [30, 31]. Л. Шен и соавт. [32] сообщили, что биокомпозиции на основе ПЛА, наполненные ГА и углеродным волокном (ПЛА-ГА-УВ), были изготовлены из препрега ПЛА-ГА-УВ методом горячего прессования. Препрег ПЛА-ГА-УВ изготавливался путем смешения компонентов в растворе. Авторы обнаружили, что биокомпозиции обладают превосходными механическими свойствами, например, прочность на изгиб, модуль изгиба и прочность при сдвиге достигают 430 МПа, 22 ГПа, 212 МПа соответственно. Поглощение воды биокомпозициями ПЛА-ГА-УВ увеличилось на 5%, тогда как скорость потери массы составила всего 1,6%. После разложения в лабораторных условиях в течение 3 мес значение pH фосфатного буферного раствора уменьшается менее чем на 1/10. Это указывает на то, что ГА нейтрализует кислоту, образующуюся при разложении ПЛА в результате гидролиза, что предотвращает ее вредное воздействие на организм. С. Парк и соавт. [33], Ж. Ким и соавт. [34], В. Джанг и соавт. [35] установили, что композиции ПКЛ-ГА могут также успешно применяться для изготовления биоразлагаемых скаффолдов и имплантатов для инженерии костей с помощью 3D-печати.

Однако абсолютное большинство композиций ПЛА-ГА и ПКЛ-ГА изготавливалось методом смешения в растворе, но даже для этих композиций исследования основных свойств носят эпизодический характер.

Целью данной работы было исследование основных физико-механических свойств композитов

ПЛА-ГА и ПКЛ-ГА, полученных методом смешения в расплаве, а также остеогенного потенциала ПЛА-ГА композитов *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоразлагаемые полилактид (ПЛА, Ingeo 4043D, NatureWorks LLC, США) и поли(ϵ -капролактон) (ПКЛ, Sigma-Aldrich, США) были использованы в данной работе в качестве полимерных матриц. Порошок гидроксиапатита, полученный механохимическим способом [36] и предоставленный ООО «НПК «Синтел» (г. Томск, Россия), применялся в качестве наполнителя. Все материалы перед применением не подвергались дополнительной обработке. Содержание наполнителя в полимерных

композициях изменялось от 0 до 50%. Композиции были получены путем смешения в расплаве в измерительном смесителе 50 ЕНТ (Brabender, Германия). Длительность смешения и температура переработки составляли 10 мин и 190–210 °С для композиций на основе ПЛА, и 80–100 °С – для композиций на основе ПКЛ соответственно. Скорость вращающихся в противоположных направлениях ножей смесителя изменялась от 30 до 90 об./мин, как показано на рис. 1. Наполнитель постепенно вводился в расплав полимера, при этом смешение производилось до тех пор, пока наполнитель не был равномерно распределен в полимерной матрице. После изготовления все композиции гранулировались с помощью гранулятора (Brabender, Германия).

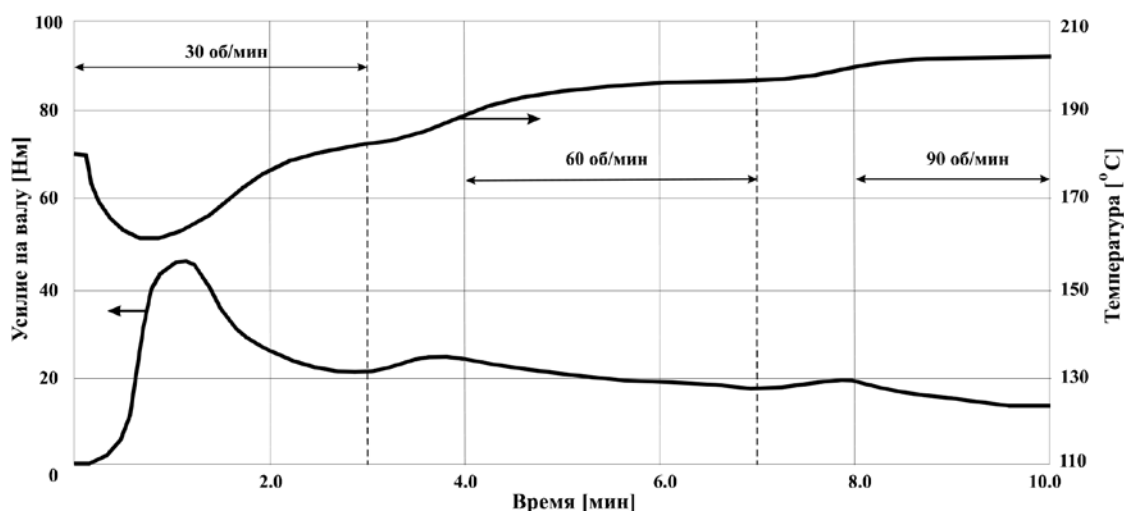


Рис. 1. Временные диаграммы температуры расплава и усилия на валу смесителя для композиции ПЛА-ГА

Для изготовления образцов с размерами $65 \times 85 \times (0,05-1,0)$ мм методом горячего прессования пресс-формы, заполненные гранулами композиций, помещали в вакуумную печь, нагретую до 200 °С (для композиций на основе ПЛА) и до 100 °С (для композиций на основе ПКЛ) на 3 ч. После этого пресс-формы помещались в гидравлический пресс, где выдерживались под давлением 20 МПа в течение 20 мин. Затем пресс-формы охлаждали со скоростью охлаждения 4 °С/мин до температуры окружающей среды под давлением на воздухе.

Измерения действительной части ϵ' комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^*(f) = \epsilon'(f) - \epsilon''(f)$ и тангенса угла диэлектрических потерь $\tan \delta = \epsilon''(f)/\epsilon'(f)$, где ϵ'' – мнимая составляющая комплексной диэлектрической проницаемости; $\delta = (90^\circ - \varphi)$ – угол потерь; и φ – фазовый угол между напряжением и током, проводились

с помощью метода диэлектрической спектроскопии в частотном ходе при напряжении переменного тока 3 В в диапазоне частот 1–10⁵ Гц с помощью измерительного комплекса Solartron Analytical (Великобритания). Для всех образцов производилось от семи до десяти измерений на декаду во всем исследованном диапазоне частот. Для каждого материала измерялось не менее трех образцов.

Морфология разработанных композиций, форма и размеры частиц порошка наполнителя исследовались с помощью оптической микроскопии. Толщина образцов для исследования полимерных композиций составляла 50 мкм.

Исследование кристаллической структуры полимерных матриц и композиций проводилось методом широкоугольной дифракции рентгеновских лучей (XRD) с помощью дифрактометра Shimadzu XRD-7000 (Германия), CuK_α -излучение $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ при

ускоряющем напряжении на рентгеновской трубке 40 кВ и токе 30 мА в диапазоне углов $2\theta = 5-90^\circ$.

Механические свойства разработанных полимерных композиций были изучены с помощью универсальной разрывной машины Instron 3345 (США). Для всех испытанных образцов из экспериментально полученных кривых «напряжение – деформация» были определены значения модуля упругости, удлинения при разрыве и прочности при разрыве.

Для тестирования биоинженерного потенциала трехмерные композиты ПЛА (95%) + ГА (5%) получены в виде дисков толщиной 1,2 мм и диаметром 11 мм методом компьютерного проектирования в программной среде Blender открытым исходным кодом и последующего послойного наплавления нитей (диаметр 1,75 мм) при помощи 3D-принтера CreatBot Duo (CreatBot 3D Printer, КНР), как описано ранее [37]. В качестве контроля служили матриксы из 100% ПЛА. Одна из поверхностей образцов была текстурирована бороздками шириной 0,3–0,5 мм для улучшения адгезии костного мозга к поверхности образцов.

Одним из современных способов определения остеогенных свойств материалов и изделий служит эктопический (гетеротопический) подкожный тест на животных, позволяющий оценить *in vivo* индукцию дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в остеобласты [38].

Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755). Животные содержались согласно РД-АПК 3.10.07.02-09. Снабжение лабораторных животных питьевой водой производилось из водопровода, качество воды соответствовало СанПиН 2.1.4.1074-01. Животные содержались при искусственном и естественном освещении в соответствии с требованиями СНиП 23.05-95.

Линейным мышам BALB/c через срединный разрез формировали доступ в подкожную область живота, куда подкожно вводили по 1 имплантату с нанесенным в асептических условиях *in vitro* столбиком сингенного костного мозга, предварительно взятого из бедренной кости, как описано ранее [39]. Костный мозг взрослого организма является центральным пулом и источником мезенхимных стволовых клеток (МСК) [40].

Через 40 сут животных умерщвляли посредством CO_2 -асфиксии, оценивали состояние тканей вокруг имплантатов, имплантаты извлекали вместе с комплексом мягких тканей (тканевыми пластинками) на «рабочей» (текстурированной) поверхности об-

разцов, использовали стандартную гистологическую технику тонких срезов фиксированных тканевых пластинок и их окраски гематоксилином-эозином [39]. В контрольной и подопытной группах тестировали по шесть имплантатов. Позитивным результатом считали формирование в составе тканевой пластинки кости и (или) костной ткани с костным мозгом.

Вычисляли способность имплантатов индуцировать рост костной ткани как процент тестируемых образцов, способствующих индукции роста костной ткани (ИКТ) с костным мозгом или без него в составе тканевой пластинки, от общего числа имплантированных образцов по формуле ИКТ (%) = $[N2/N1] \times 100\%$, где $N1$ – число имплантированных образцов; $N2$ – число образцов, на которых выявлен рост костной ткани.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica для Windows 13.3. Нормальность распределения показателей проверяли с помощью закона Колмогорова – Смирнова. Рассчитывали параметры распределений: выборочное среднее и ошибку среднего ($M \pm m$), медиану и интерквартильный размах $Me (Q_1-Q_3)$. Для оценки статистической значимости различий, в случае несоответствия распределения данных нормальному закону распределения, применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты диэлектрической спектроскопии в частотном ходе представлены на рис. 2. Видно, что частотные зависимости $\epsilon'(f)$ для полимерных композиций имеют типичный характер: $\epsilon'(f)$ монотонно уменьшается с частотой как для полимерных матриц, так и для композиций на их основе. При наполнении ПЛА порошком ГА диэлектрическая проницаемость композиции ПЛА + 25% ГА увеличивается на 12–15% по сравнению с исходным ПЛА во всем исследованном диапазоне частот за счет более высокой диэлектрической проницаемости наполнителя, которая составляет около 4–9 [41]. Для композиции ПЛА + 50% ГА увеличение диэлектрической проницаемости составляет 23–32% по сравнению с исходным ПЛА. Увеличение диэлектрической проницаемости композиции ПКЛ + 25% ГА составляет 1–4% по сравнению с исходным ПКЛ. Значения тангенса угла диэлектрических потерь $\text{tg}\delta(f)$ в исследованном диапазоне частот для композиций на основе ПЛА не превышают 0,02, а для композиции ПКЛ + 25% ГА – 0,2 относительные единицы.

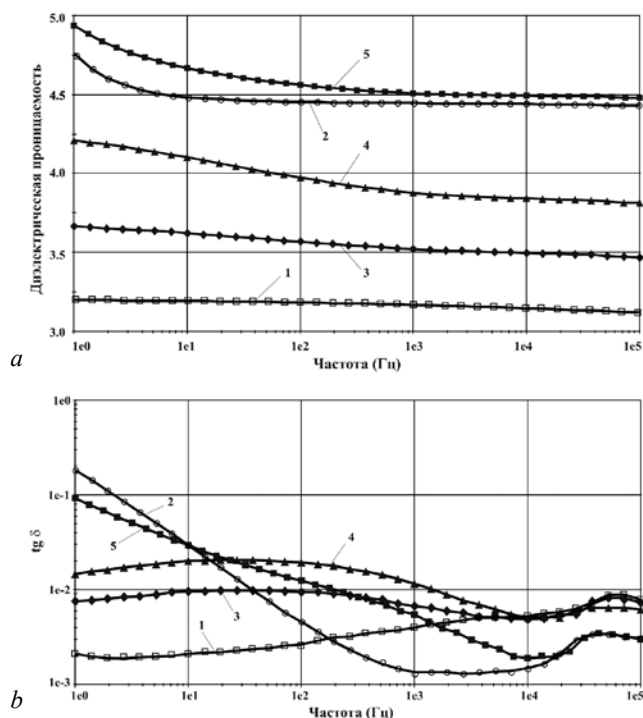


Рис. 2. Частотные зависимости действительной составляющей комплексной диэлектрической проницаемости (относительные единицы) (а) и $\text{tg } \delta$ (б) для: 1 – ПЛА; 2 – ПКЛ; 3 – ПЛА + 25% ГА; 4 – ПЛА + 50% ГА; 5 – ПКЛ + 25% ГА

Результаты оптической микроскопии приведены на рис. 3. Частицы наполнителя образуют агломераты размером около 100 мкм, которые видны как для исходного порошка ГА (рис. 3, а), так и для композиции с содержанием наполнителя 25% (рис. 3, б). Видно, что частицы наполнителя достаточно равномерно распределены в полимерной матрице. Снижение среднего размера агломератов наполнителя для композиции с 50% ГА (рис. 3, с) по сравнению с композицией ПЛА + 25% ГА объясняется разрушением агломератов порошка наполнителя во время компаундирования за счет увеличения жесткости композиции.

На рис. 4 показаны результаты исследования рентгеновской дифракции (XRD-анализ) полимерных матриц ПЛА и ПКЛ и композиций на их основе. На рентгенограмме исходного ПЛА наблюдается широкий дифракционный максимум около $2\theta \approx 16,2^\circ$, возникающий за счет отражения от кристаллографических плоскостей (200) или (110) (рис. 4, а). Пики, наблюдаемые при 26,12; 29,16; 32; 40; 46,9 и 49,7° для композиций ПЛА-ГА, являются характеристическими пиками ГА (рис. 4, б, с) за счет отражения от кристаллографических плоскостей (002), (210), (211), (310), (222) и (213).

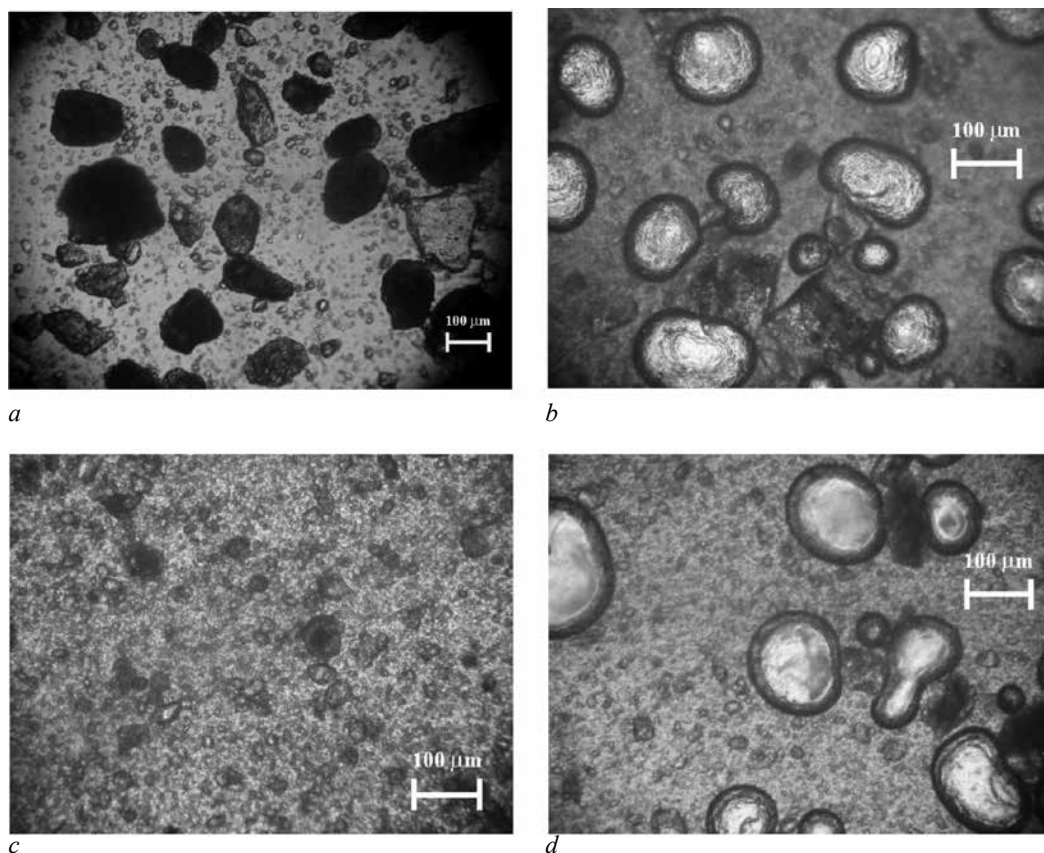


Рис. 3. Микрофотографии порошка ГА (а) и композиций ПЛА-ГА с 25% ГА (б); с 50% ГА (с); композиции ПКЛ-ГА с 25% ГА (д)

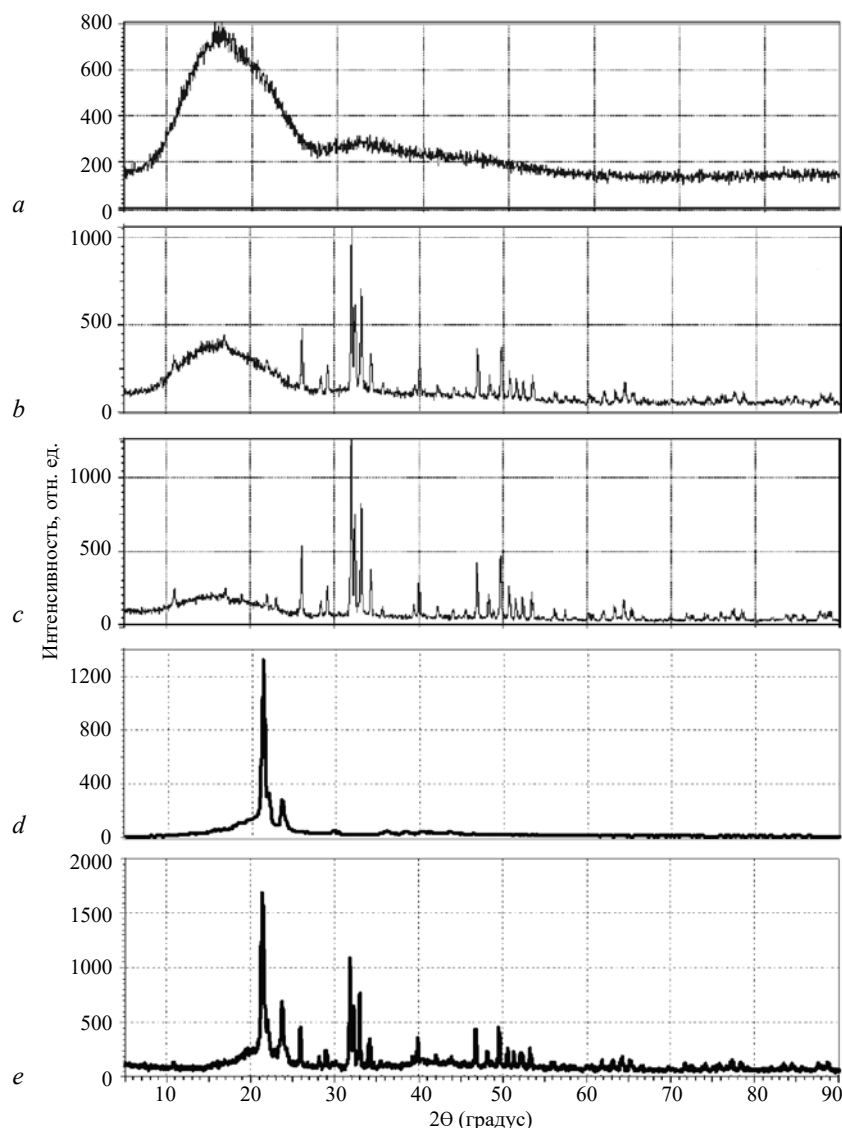


Рис. 4. Рентгенограммы для исходного ПЛА (a); композиций ПЛА-ГА: с 25% ГА (b); с 50% ГА (c); исходного ПКЛ (d); композиции ПКЛ-ГА с 25% ГА (e)

На рентгенограмме исходного ПКЛ (рис. 4, d) наблюдаются два резких пика при $2\theta \approx 21,4^\circ$ и $23,7^\circ$, которые соответствуют отражениям от кристаллографических плоскостей (110) и (200) ПКЛ. Пики при $26,12^\circ$; $29,16^\circ$; 32° ; 40° ; $46,9^\circ$ и $49,7^\circ$ для композиции ПКЛ-ГА обусловлены наличием ГА (рис. 4, d), как и для композиций ПЛА-ГА.

По результатам XRD-анализа была определена степень кристалличности применяемых полимерных матриц и полимерных композиций на их основе, результаты этих исследований приведены в табл. 1.

Установлено, что степень кристалличности композиций ПЛА-ГА, по сравнению с исходным ПЛА, увеличивается в 3 и 6 раз для композиций ПЛА + 25% ГА и ПЛА + 50% ГА соответственно. Степень кристалличности композиции ПКЛ + 25% ГА увеличилась в 2 раза по сравнению с исходным ПКЛ.

Увеличение степени кристалличности полимерных композиций обусловлено тем, что при наполнении полимерных матриц порошком ГА частицы наполнителя играют роль дополнительных центров кристаллизации в композициях.

На рис. 5 приведены результаты испытаний образцов на растяжение. Видно, что добавление ГА в ПЛА приводит к уменьшению удлинения и прочности при разрыве, и только для модуля Юнга наблюдается тенденция к росту при увеличении содержания ГА.

Для композиций на основе ПКЛ изменения механических свойств аналогичны, однако значения модуля упругости и прочности при разрыве существенно ниже по сравнению с полученными для композиций на основе ПЛА, в то время как удлинение для композиций на основе ПЛА пренебрежимо мало по сравнению с композициями на основе ПКЛ.

Таблица 1

Степень кристалличности полимерных матриц и композиций, $M \pm m$					
Материал	ПЛА	ПЛА + 25% ГА	ПЛА + 50% ГА	ПКЛ	ПКЛ + 25% ГА
Степень кристалличности, %	11,6 ± 0,35	37,9 ± 1,14	71,45 ± 2,14	34,7 ± 1,04	75,53 ± 2,27

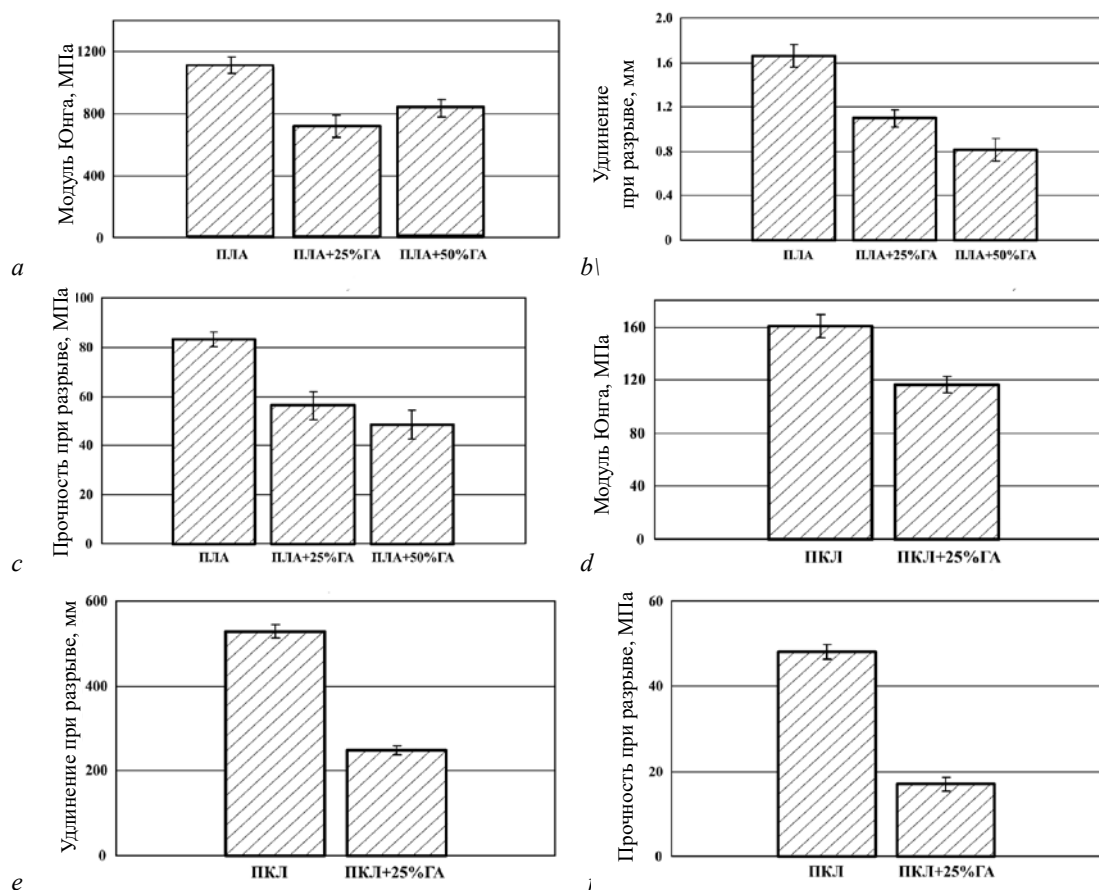


Рис. 5. Результаты механических испытаний для композиций на основе ПЛА (a–c) и ПКЛ (d–f): a и d – модуль Юнга; b и e – удлинение при разрыве; c и f – прочность при разрыве

В настоящее время все большее применение в приложении к тканевой биоинженерии находят биodeградируемые полимеры и их композиты. Имплантаты из ПЛА являются одними из наиболее востребованных изделий в клинической практике. ПЛА-изделия расщепляются и замещаются костной тканью, по данным разных авторов, не ранее чем 7 лет после имплантации [42], что может приводить к осложнениям в виде воспалительной реакции на инородное тело [43]. В связи с этим разработка и биомедицинское тестирование новых технологий изготовления и модификации композитов (со)полимеров и ГА с контролируемой биodeградацией являются весьма актуальными. Однако при высоких содержаниях ГА потенциальное усиление остеогенных свойств композитов [44] нивелируется реальным снижением их биомеханических свойств (см. рис. 5).

При подкожной имплантации тестируемые материалы испытывают биомеханическую нагрузку

(ударную, на сдвиг и боковое смещение), что приближает моделируемые *in vivo* условия к костной имплантации. При подкожном тестировании композитов ПЛА с низким содержанием ГА (5%) через 40 сут не отмечалось макроскопических признаков разрушения имплантатов и воспалительной реакции, в частности выраженной гиперемии реципиентного ложа, наличия экссудата. Диски были окружены тонкой (менее 50 мкм) соединительнотканной капсулой, фиксирующей их в боковом подкожном кармане.

ПЛА и его композит способствовали продвижению (кондукции) по поверхности тестируемых образцов тканей, формирующихся подкожно из костного мозга, что было зафиксировано по более чем 3-кратному увеличению площади тканевых пластинок (табл. 2). Гистологическая оценка тканевых пластинок показала ИКТ: 20% в случае ПЛА образцов и 60% в случае композитных скаффолдов ПЛА + 5% ГА (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние образцов на геометрические и гистологические характеристики тканей, выросших из костного мозга при подкожном эктопическом тесте на мышах BALB/c, Me (Q_1-Q_3)					
Тестируемая группа образцов, $n = 6$	Частота образования тканевой пластинки, %	ИКТ, %	Площадь, костного мозга, мм ² (исходный уровень до имплантации)	Свойства тканевой пластинки (после имплантации)	
				Площадь, % от площади костного мозга	Гистологический состав
ПЛА	100	20	3,54 (3,49–3,72)	306 (217–504)	Кость с костным мозгом (1 случай); соединительная и жировая ткани (4 случая)
ПЛА + 5% ГА	100	60	4,53 (3,89–4,87)	382 (327–443)	Грубоволокнистая кость (2 случая); кость с костным мозгом (1 случай); соединительная ткань (2 случая)

Примечание. Число использованных образцов в каждой группе – n .

На гистологических срезах выявлены грубоволокнистая костная ткань, а также система «кость/костный мозг», формирующиеся *de novo* посредством *in situ* ремоделирования костного мозга, нанесенного *in vitro* (рис. 6). Эктопическая метаплазия сингенно-

го костного мозга протекает через активацию пула МСК донора, дифференцирующихся в предшественники и потомки хондро-, остеобластогенеза, и стволовых кроветворных клеток реципиента, репопулирующих участки имплантации [45].

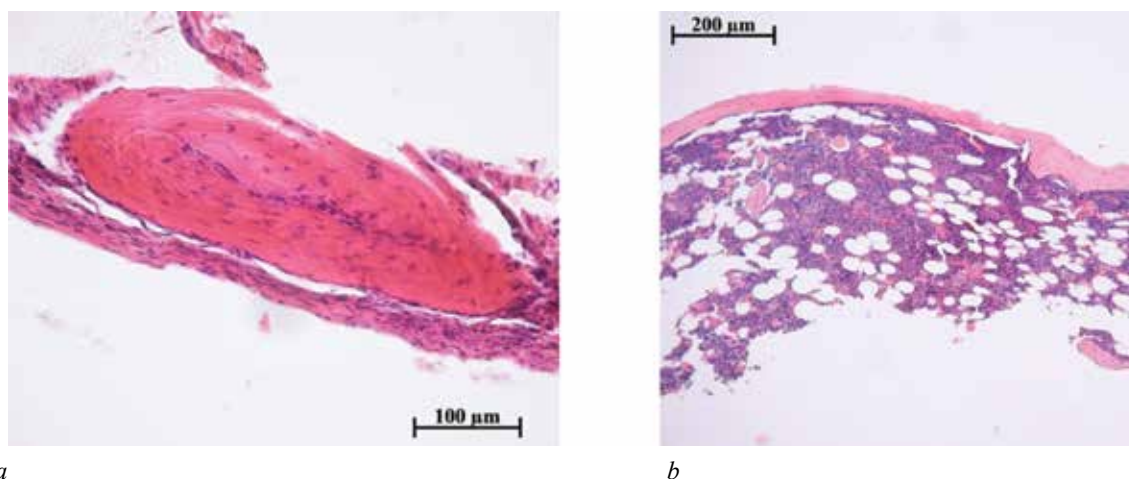


Рис. 6. Примеры позитивных результатов гистологических срезов тканевых пластинок, выросших на ПЛА и ПЛА + 5% ГА образцах после 40-суточной подкожной имплантации: *a* – костная ткань; *b* – костная ткань с костным мозгом. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$ (*a*) и $\times 100$ (*b*)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены биоразлагаемые полимерные композиции на основе ПЛА и ПКЛ, наполненные ГА методом смешения в расплаве, позволяющим ввести в полимерные матрицы до 25–50% ГА. Частицы ГА и их агломераты с диаметром до 100 мкм равномерно распределяются по объему матрицы, повышая степень поляризации поверхности и кристалличность композитов. Как следствие высокой кристалличности, с увеличением степени наполнения снижается механическая прочность композитов. Разработанные биоразлагаемые композиции имеют потенциал практического применения в различных направлениях регенеративной медицины. В приложении к биоинженерии костной ткани, композиты ПЛА, полученные методом 3D-печати, даже с низким (5%)

содержанием ГА на 40% повышают результаты эктопического остеогенеза, что позволяет считать МСК клеточной мишенью их биологической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000; 21 (24): 2529–2543. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
2. Murariu M., Dubois P. PLA composites: from production to properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 107: 17–46. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.003.
3. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920–926. DOI: 10.1126/science.8493529.
4. Gupta A.P., Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – polylactide: a critique. *Europ. Polym. J.* 2007; 43 (10): 4053–4074. DOI: 10.1016/J.EURPOLYM.2007.06.045.

5. Jorge P., Domingos M., Gloria A., Ciurana J. BioCell printing: Integrated automated assembly system for tissue engineering constructs. *CIRP Annals – Manufacturing Technology*. 2011; 60 (1): 271–274. DOI: 10.1016/J.CIRP.2011.03.116.
6. Elzubair A., Elias C.N., Suarez J.C.M., Lopes H.P., Vieira M.V.B. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. *J. Dent.* 2006; 34 (10): 784–789. DOI: 10.1016/j.jdent.2006.03.002.
7. Huttmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 55(2): 203–216. DOI: 10.1002/1097-4636(200105)55: 2<203::aid-jbm1007>3.0.co;2-7.
8. Rohner D., Huttmacher D.W., Cheng T.K., Oberholzer M., Hammer B. *In vivo* efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 2003; 66B (2): 574–580. DOI: 10.1002/jbm.b.10037.
9. Tay F.R., Pashley D.H., Williams M.C., Raina R., Loushine R.J., Weller R.N. et al. Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. I. Alkaline hydrolysis. *J. Endodontics*. 2005; 31 (8): 593–598. DOI: 10.1097/01.don.0000152301.72828.61.
10. Chan-Chan L.H., Solis-Correa R., Vargas-Coronado R.F., Cervantes-Uc J.M., Cauich-Rodríguez J.V., Quintana P., Bartolo-Pérez P. Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6 (6): 2035–2044. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.12.010.
11. Mitchell C.A., Krishnamoorti R. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules*. 2007; 40 (5): 1538–1545. DOI: 10.1021/ma0616054.
12. Raquez J.-M., Habibi Y., Murariu M., Dubois P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* 2013; 38 (10–11): 1504–1542. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.014.
13. Ray S.S., Bousmina M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in green the 21st century materials word. *Prog. Mater. Sci.* 2005; 50: 962–1079. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2005.05.002.
14. Murariu M., Paint Y., Murariu O., Raquez J.-M., Bonnaud L., Dubois P. Current progress in the production of PLA–ZnO nanocomposites: Beneficial effects of chain extender addition on key properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 2015; 132: 42480. DOI: 10.1002/app.42480.
15. Murariu M., Dechief A.L., Bonnaud L., Paint Y., Gallos A., Fontaine G., et al. The production and properties of polylactide composites filled with expanded graphite. *Polym. Degrad. Stab.* 2010; 95: 889–900. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.12.019.
16. Li S.H., Liu Q., Wijn J.R., Zhou B.L., Groot K. In vitro calcium phosphate formation on a natural composite material, bamboo. *Biomaterials*. 1997; 18 (5): 389–395. DOI: 10.1016/S0142-9612(96)00122-6.
17. Morvan J., Buyuktanir E., West J.L., Jákli A. Highly piezoelectric biocompatible and soft composite fibers. *Appl. Phys. Lett.* 2012; 100 (6). DOI: 10.1063/1.3683482.
18. Lebedev S.M., Amitov E.T., Mikutskiy E.A. Biodegradable electrically conductive polycaprolactone-based composites filled with carbon nanotubes. *Russian Phys. J.* 2020; 62 (10): 1753–1762. DOI: 10.1007/s11182-020-01903-0.
19. Лекишвили М.В., Балберкин А.В., Васильев М.Г., Колондаев А.Ф., Баранецкий А.Л., Буклемишев Ю.В. Первый опыт применения в клинике костной патологии биокомпозиционного материала «Остеоматрикс». *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2002; 4: 80–83.
20. Иванов С.Ю., Бизяев Н.Ф., Ломакин М.В., Панин А.М. Клинические результаты использования различных костнопластических материалов при синус-лифтинге. *Новое в стоматологии*. 1999; 5: 51–54.
21. Аглуллин И.Р., Сафин И.Р. Остеопластика в лечении пациентов с дефектами костной ткани. *Поволжский онкологический вестник*. 2012; 1: 42–44.
22. Gonçalves E.M., Oliveira F.J., Silva R.F., Neto M.A., Fernandes M.H., Amaral M. et al. Three-dimensional printed PCL-hydroxyapatite scaffolds filled with CNTs for bone cell growth stimulation. *J. Biomed. Mater. Res. Part: B*. 2016; 104 (6): 1210–1219. DOI: 10.1002/jbm.b.33432.
23. Akindoyo J.O., Beg M.D.H., Ghazali S., Alam A.K.M.M., Heim H.P., Feldmann M. Synergized poly(lactic acid)-hydroxyapatite composites: Biocompatibility study. *J. Appl. Polym. Sci.* 2019. DOI: 10.1002/app.47400.
24. Akindoyo J.O., Beg M.D.H., Ghazali S., Heim H.P., Feldmann M. Impact modified PLA-hydroxyapatite composites – thermo-mechanical properties. *Comp. Part A: App. Sci. Manufact.* 2018; 107: 326–333. DOI: 10.1016/j.compositesa.2018.01.017.
25. Šupová M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009; 20 (6): 1201–1213. DOI: 10.1007/s10856-009-3696-2.
26. Mao D., Li Q., Bai N., Dong H., Li D. Porous stable poly(lactic acid)/ethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffolds prepared by a combined method for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 180: 104–111. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.10.031.
27. Alizadeh-Osgouei M., Li Y., Wen C. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioactive Mater.* 2019; 4 (1): 22–36. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
28. Russias J., Saiz E., Nalla R.K., Gryn K., Ritchie R.O., and Tomsia A.P. Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: a study *in vitro* degradation. *Mater. Sci. Eng. C: Biomim. Supramol. Syst.* 2006; 26 (8): 1289–1295. DOI: 10.1016/j.msec.2005.08.004.
29. Ferri J.M., Jorda J., Montanes N., Fenollar O., and Balart R. Manufacturing and characterization of poly(lactic acid) composites with hydroxyapatite. *J. Thermoplast. Comp. Mater.* 2017; 31 (7): 865–881. DOI: 10.1177/0892705717729014.
30. Zhang H., Mao X., Du Z., Jiang W., Han X., Zhao D. et al. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2016; 17 (1). DOI: 10.1080/14686996.2016.1145532.

31. Zhang S.M., Liu J., Zhou W., Cheng L., Guo X.D. Interfacial fabrication and property of hydroxyapatite/poly(lactide) resorbable bone fixation composites. *Curr. Appl. Phys.* 2005; 5 (5): 516–518. DOI: 10.1016/j.cap.2005.01.023.
32. Shen L., Yang H., Ying J., Qiao F., Peng M. Preparation and mechanical properties of carbon fiber reinforced hydroxyapatite/poly(lactide) biocomposites. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009; 20 (11): 2259–2265. DOI: 10.1007/s10856-009-3785-2.
33. Park S.A., Lee S.H., Kim W.D. Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2011; 34 (4): 505–513. DOI: 10.1007/s00449-010-0499-2.
34. Kim J.Y., Lee T.-J., Cho D.-W., Kim B.-S. Solid free-form fabrication-based PCL/HA scaffolds fabricated with a multi-head deposition system for bone tissue engineering. *J. Biomater. Sci.* 2010; 21 (6–7): 951–962. DOI: 10.1163/156856209X458380.
35. Jiang W., Shi J., Li W., Sun K. Morphology, wettability, and mechanical properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds with interconnected pore structures fabricated by a mini-deposition system. *Polym. Eng. Sci.* 2012; 52: 2396–2402. DOI: 10.1002/pen.23193.
36. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure. *Problems of Materials Science.* 2008; 54 (2): 219–232.
37. Дружинина Т.В., Талалаев С.Я., Закиров Н.П., Щаденко С.В., Хабибуллин Ш.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Клеточные реакции на трехмерные матрицы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016; 15 (5): 16–29.
38. Scott M.A., Levi B., Askarinam A., Nguyen A., Rackohn T., Ting K., Soo C., James A.W. Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev.* 2012; 21 (5): 655–668. DOI: 10.1089/scd.2011.0517.
39. Bolbasov E.N., Popkov A.V., Popkov D.A., Gorbach E.N., Khlusov I.A., Golovkin A.S., Sinev A., Bouznik V.M., Tverdokhlebov S.I., Anissimov Y.G. Osteoinductive composite coatings for flexible intramedullary nails. *Mater. Sci. Eng. C.* 2017; 75: 207–220. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.073.
40. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9 (5): 641–50. DOI: 10.1002/jor.1100090504.
41. Silva C.C., Almeida A.F.L., De Oliveira R.S., Pinheiro A.G., Góes J.C., Sombra A.S.B. Dielectric permittivity and loss of hydroxyapatite screen-printed thick films. *J. Mater. Sci.* 2003; 38: 3713–3720. DOI: 10.1023/A:1025963728858.
42. Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartia P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L lactide screws. An experimental long-term study in sheep. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2002; 122 (6): 360–364. DOI: 10.1007/s00402-001-0379-y.
43. Bostman O.M., Pihlajamäki H.K. Late foreign-body reaction to an intraosseous bioabsorbable polylactic acid screw. A case report. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 1998; 80 (12): 1791–1794. DOI: 10.2106/00004623-199812000-00010.
44. Zhang R., Ma P. X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 45 (4): 285–293. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(19990615)45:4<285::aid-jbm2>3.0.co;2-2.
45. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Медицина, 1980: 216.

Вклад авторов

Лебедев С.М., Хлусов И.А., Щаденко С.В. – концепция и дизайн исследования. Лебедев С.М., Чистохин Д.М., Дзюман А.Н., Хлусов И.А., Щаденко С.В. – проведение исследования. Николаева О.О., Митриченко Д.В., Просолов А.Б. – сбор, перевод и обработка материала. Лебедев С.М., Хлусов И.А. – написание текста.

Сведения об авторах

Лебедев Сергей Михайлович, д-р техн. наук, вед. науч. сотрудник, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-3367-1244.

Чистохин Дмитрий Михайлович, инженер, НИ ТПУ, г. Томск.

Щаденко Сергей Владимирович, инженер, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск.

Дзюман Анна Николаевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0795-0987.

Николаева Ольга Олеговна, начальник производственного участка, НПК «Синтел», г. Томск.

Митриченко Дмитрий Владимирович, директор, НПК «Синтел», г. Томск.

Просолов Александр Борисович, зам. директора по научной работе, НПК «Синтел», г. Томск.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ; науч. сотрудник, НПК «Синтел», г. Томск; гл. науч. сотрудник, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0003-3465-8452.

(✉) **Лебедев Сергей Михайлович**, e-mail: lsm70@mail.ru.

Поступила в редакцию 28.02.2020

Подписана в печать 30.04.2020

Особенности полиморфизма генов *FGB*, *TNF α* , *IL-1 β* , *LPL*, *ITGB3* и *TGFB1* у пациентов с повторным инфарктом миокарда

Маянская С.Д.¹, Гараева Л.А.², Тепляков А.Т.³, Филипенко М.Л.⁴, Соколова Е.А.⁴, Кравцова О.А.⁵, Березикова Е.Н.⁶

¹ Казанский государственный медицинский университет (КГМУ)
Россия, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49

² Казанская государственная медицинская академия (КГМА) – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (РМАНПО)
Россия, 420012, г. Казань, ул. Мушкетери, 11

³ Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

⁵ Казанский (Приволжский) федеральный университет
Россия, 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

⁶ Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

РЕЗЮМЕ

Цель. Ассоциация полиморфизма генов фибриногена (*FGB*), фактора некроза опухоли α (*TNF α*), интерлейкина 1 β (*IL-1 β*), липопротеинлипазы (*LPL*), тромбоцитарного гликопротеина (*ITGB3*) и трансформирующего фактора роста β (*TGFB1*) с риском развития повторного инфаркта миокарда (ИМ) у пациентов, проживающих на территории Среднего Поволжья.

Материалы и методы. В исследование вошли 280 человек с однократным и 104 человека с повторным ИМ. Генотипирование полиморфных локусов генов *TNF α* (rs1800629), *IL1B* (rs16944), *TGFB1b* (rs1800469), *FGB* (rs1800788), *ITGB3* (rs5918) и *LPL* (rs328) осуществляли с использованием TaqMan-зондов. Статистическую обработку данных проводили методом многофакторного логистического регрессионного анализа.

Результаты. Среди пациентов с повторным ИМ более часто встречались аллели и генотипы полиморфных маркеров генов *TNF α* , *IL1B*, *TGFB1b*, *FGB*, *ITGB3* и *LPL*. При оценке суммарного вклада полиморфизмов исследуемых генов риск повторного ИМ значительно возрастал при наличии комбинации полиморфизмов генов *FGB* (аллели и генотипы) и *TNF α* (аллели и генотипы), OR = 4,04; 95% CI 1,895–8,615; $p = 0,0001$.

Заключение. Таким образом, генотипы полиморфных локусов генов *FGB*, *LPL*, *TNF α* , *TGFB1b* и *ITGB3* могут быть ассоциированы с риском более тяжелого течения ишемической болезни сердца и приводить к развитию повторных инфарктов миокарда. Выявлен доминирующий суммарный вклад полиморфных локусов генов *FGB* (rs1800788) и *TNF α* (rs1800629) в развитие повторного ИМ у населения Среднего Поволжья.

Ключевые слова: повторный инфаркт миокарда, полиморфизм генов, *TNF α* , *IL1B*, *TGFB1b*, *FGB*, *ITGB3*, *LPL*.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом КГМУ (протокол № 4 от 24.05.2016).

Для цитирования: Маянская С.Д., Гараева Л.А., Тепляков А.Т., Филипенко М.Л., Соколова Е.А., Кравцова О.А., Березикова Е.Н. Особенности полиморфизма генов *FGB*, *TNFα*, *IL-1β*, *LPL*, *ITGB3* и *TGFB1* у пациентов с повторным инфарктом миокарда. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 130–137. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-130-137>.

***FGB*, *TNFα*, *IL-1β*, *LPL*, *ITGB3*, and *TGFB1* genes polymorphism in patients with recurrent myocardial infarction**

Mayanskaya S. D.¹, Garaeva L. A.², Teplyakov A.T.³, Filipenko M.L. ⁴, Sokolova E.A.⁴, Kravtsova O.A.⁵, Berezikova E.N.⁶

¹ Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012, Russian Federation

² Kazan State Medical Academy, Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
11, Mushtary Str., Kazan, 420012, Russian Federation

³ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny Lane, Tomsk, 634009, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
630090, 8, Lavrentiev Av., Novosibirsk, Russian Federation

⁵ Kazan Federal University,
18, Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Russian Federation

⁶ Novosibirsk State Medical University,
52, Krasnyi Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

The aim. To evaluate the association of fibrinogen (*FGB*), tumor necrosis factor α (*TNFα*), interleukin 1β (*IL-1β*), lipoprotein lipase (*LPL*), platelet glycoprotein (*ITGB3*), and transforming growth factor β (*TGFB1*) genes with the incidence of recurrent myocardial infarction (MI) in patients living in the middle Volga region.

Materials and methods. The study included 104 people with recurrent MI compared to 280 people who had just one episode of MI. *TNFα* (rs1800629), *IL1B* (rs16944), *TGFB1b* (rs1800469), *FGB* (rs1800788), *ITGB3* (rs5918) and *LPL* (rs328) gene polymorphism was determined in all patients using competing TaqMan probes. Association estimation was performed with multivariate logistic regression analysis.

Results. Patients with recurrent MI much more often had *TNFα*, *IL1B*, *TGFB1b*, *FGB*, *ITGB3* and *LPL* allele and genotype polymorphism. Moreover the risk of MI increased significantly in a case of combination of *FGB* (alleles and genotypes) and *TNFα* (alleles and genotypes) gene polymorphisms (OR = 4.04, 95% CI = (1.895–8.615), $p = 0.0001$).

Conclusion. Thus, *FGB*, *LPL*, *TNFα*, *TGFB1b* and *ITGB3* gene polymorphism are associated with more severe coronary heart disease and may be a risk factor of recurrent MI development. The dominant total contribution of the *FGB* (rs1800788) and *TNFα* (rs1800629) polymorphic genes to the development of recurrent MI in the population of the middle Volga region was revealed.

Key words: recurrent myocardial infarction, gene polymorphism, *TNFα*, *IL1B*, *TGFB1b*, *FGB*, *ITGB3*, *LPL*.

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

Source of financing. The authors declare the absence of financing.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the Ethics Committee at Kazan State Medical University (Protocol No. 4 of 24.05.2016).

For citation: Mayanskaya S.D., Garaeva L.A., Teplyakov A.T., Filipenko M.L., Sokolova E.A., Kravtsova O.A., Berezikova E.N. *FGB*, *TNFα*, *IL-1β*, *LPL*, *ITGB3*, and *TGFB1* genes polymorphism in patients with recurrent myocardial infarction. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 130–137. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-130-137>.

ВВЕДЕНИЕ

Инфаркт миокарда (ИМ) – тяжелое сердечно-сосудистое заболевание (ССЗ), являющееся многоэтапным процессом, состоящим из отдельных событий, генетические особенности которых являются ведущими в определении индивидуальных показателей риска прогрессирования атеросклероза.

Ключевыми патологическими процессами, определяющими тяжесть течения коронарной болезни сердца, являются нарушение липидного обмена и гемостаза, а также активность воспалительного процесса в атеросклеротической бляшке. Несколько крупных полногеномных исследований, выполненных в последние годы, указывают на роль полиморфизма некоторых генов, ответственных за выработку различных компонентов липидного обмена и коагуляции и целого ряда цитокинов, таких как интерлейкины, трансформирующие факторы роста, молекулы адгезии и т.д. [1]. При этом большая часть исследований, направленных на оценку течения заболевания, преимущественно основана на изучении частоты развития фатальных осложнений среди пациентов со стабильным течением. Так, например, предполагается, что трансформирующий фактор роста связан в первую очередь с увеличением размера самой атеросклеротической бляшки, а не истончением ее покрышки [2], а увеличение активности интерлейкина 1β ассоциировано как с усугублением стенозов, так и с частотой фатальных осложнений [3]. Изучение полиморфизма данных генов в аспекте прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний является существенным шагом в понимании патогенетических механизмов окклюзии коронарных сосудов, в том числе и при повторном ИМ. На основании целого ряда исследований делается предположение о довольно частом носительстве мутантных аллелей генов цитокинового каскада и тромбообразования, кодирующих основные патогенетические маркеры

рестенозов, и повторных окклюзий коронарных сосудов у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [2, 4].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение особенностей полиморфизма ряда генов, ассоциированных с активностью воспаления, липидного обмена и гемостаза для персонализированного подхода к прогнозу развития повторного ИМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 384 человека в возрасте 44–85 лет (средний возраст ($66 \pm 10,7$) лет), находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении ГАУЗ «Городская клиническая больница № 7» г. Казани с верифицированным острым инфарктом миокарда (ОИМ) с подъемом сегмента ST и (или) Q-позитивным ИМ. Диагноз ОИМ верифицировался по результатам анализа биомаркеров – тропонинов, электрокардио- и коронароангиографии. У части пациентов (104 человека) по данным анамнеза и предшествующим исследованиям определялся ранее перенесенный ИМ. Сравнительное исследование проводилось между группой пациентов с однократным (группа 1, $n = 280$) и повторным ИМ (группа 2, $n = 104$).

У всех пациентов проводили генотипирование образцов ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови, по локусам генов: фактора некроза опухоли альфа *TNFα* (rs1800629), трансформирующего фактора роста *TGFB1b* (rs1800469), интерлейкина 1 бета *IL1B* (rs16944), тромбоцитарного гликопротеина *ITGB3* (rs5918), бета-цепи фибриногена *FGB* (rs1800788) и липопротеинлипазы *LPL* (rs328) с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Достоверность генотипирования подтверждалась секвенированием *TNFα* (rs1800629), *IL1B* (rs16944), *TGFB1b* (rs1800469), *FGB* (rs1800788), *ITGB3* (rs5918) и *LPL* (rs328). Дизайн олигонуклеотидных

праймеров (ОНП) и исследование генов проводились в лаборатории фармакогеномики института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (ИХБФМ СО РАН).

Для статистической обработки использованы пакеты статистики Genetics и Hardy Weinberg программного обеспечения R-project (www.r-project.org). Соответствие равновесию Харди – Вайнберга оценивали с помощью точного теста Фишера. Наличие ассоциации генотипа с вариантами тяжести течения заболевания проводили с помощью многофакторного логистического регрессионного анализа, на основании результатов которого вычисляли OR (отношение шансов, odds ratio), его доверительный интервал (95% CI) и уровень значимости полученных результатов (*p*-value). Отношение шансов вычисляли с поправкой на расовую принадлежность и факторы

риска (пол, возраст, курение, наличие наследственной отягощенности, артериальной гипертензии (АГ), дислипидемии и ожирения). Анализ проводили для четырех моделей наследования: доминантная, аддитивная, рецессивная и ко-доминантная. Выбор наилучшей из нескольких конкурирующих моделей проводили на основании информационного критерия Акаике (AIC). Данные представлены в виде средней и ее ошибки $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительно у всех участников исследования проводилась оценка клинического статуса и сопутствующей патологии для исключения их возможного влияния при анализе ассоциации генетического полиморфизма с развитием повторного ИМ (табл. 1).

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов с инфарктом миокарда			
Показатель	Группа 1, <i>n</i> = 280	Группа 2, <i>n</i> = 104	<i>p</i> -value
Пол, <i>n</i> (%): – мужчины; – женщины	1 791 (64) 101 (36)	64 (61,5) 36 (38,5)	0,61
Возраст, лет, $M \pm m$	64,1 $\pm$ 10,3	70,3 $\pm$ 7,2	0,31
Артериальная гипертензия, <i>n</i> (%)	204 (72,8)	104 (100)	0,02
Курение, <i>n</i> (%)	186 (66,4)	63 (61)	0,29
ОХС, $M \pm m$	5,3 $\pm$ 0,98	5,19 $\pm$ 0,99	0,38
ИМТ, $M \pm m$	29,9 $\pm$ 6,2	28 $\pm$ 6,2	0,07
Наличие наследственной отягощенности, <i>n</i> (%)	190 (67,8)	63 (60,5)	0,16
Сахарный диабет 2-го типа, <i>n</i> (%)	157 (56,0)	60 (57,6)	0,8
ХСН, <i>n</i> (%): – с ФВ более 40%; – с ФВ менее 40%	194 (69,3) 86 (30,7)	60 (57,7) 44 (42,3)	0,033

Примечание. ОХС – общий холестерин; ИМТ – индекс массы тела; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ФВ – фракция выброса.

Выявлено, что в группе пациентов с повторным ИМ достоверно чаще отмечалась АГ. В дальнейшем при проведении логистического регрессионного анализа были сделаны поправки на этот параметр, а также на возраст. Согласно выявленным стенозам, в группе с повторным ИМ чаще наблюдалось поражение ствола левой коронарной артерии и передней межжелудочковой ветви. Были определены частоты аллелей для всех исследуемых локусов у пациентов в обеих группах. Распределение аллелей в группах сравнения всех генов соответствовало уравнению Харди – Вайнберга.

Анализ ассоциации полиморфизма генов с частотой развития однократного и повторного ИМ проводился в двух вариантах: по наличию полиморфного аллеля, а также по генотипам среди всех генов, кроме генов *LPL* и *TNFA*, частота встречаемости патологического генотипа которых чересчур редка для проведения достоверной оценки. Ассоциация аллелей и генотипов генов по группам представлена в табл. 2.

Согласно полученным данным, пять изучаемых генов-кандидатов оказались ассоциированы с развитием повторного ИМ с учетом поправок на сопутствующие заболевания и возраст.

Таблица 2

Ассоциация полиморфного аллеля и генотипа исследуемых генов с развитием повторного инфаркта миокарда					
Ген	Группа 1, <i>n</i> = 280	Группа 2, <i>n</i> = 104	Аддитивная модель, OR [95% CI] <i>p</i> -value	Ко-доминантная модель	
				Гетерозиготный генотип OR [95% CI] <i>p</i> -value	Гомозиготный генотип OR [95% CI] <i>p</i> -value
<i>LPL</i>	CC 246 CG + GG 34 + 0	CC 78 CG + GG 21 + 5	2,92 [1,39–6,11] <i>p</i> = 0,005	–	–
<i>ITGB3</i>	TT 213 CT + CC 64 + 3	TT 82 CT + CC 11 + 11	1,21 [0,64–2,31] <i>p</i> = 0,13	ТС: 0,44 [0,15–1,29] <i>p</i> = 0,14	СС: 7,08 [1,46–34,22] <i>p</i> = 0,005
			AIC: 238,6	AIC: 231,86	
<i>FGB</i>	CC 145 CT + TT 110 + 25	CC 27 CT + TT 66 + 11	1,91 [1,15–3,17] <i>p</i> = 0,01	СТ: 3,30 [1,51–7,23] <i>p</i> = 0,003	ТТ: 2,45 [0,70–8,60] <i>p</i> = 0,16
			AIC: 232,79	AIC: 230,94	
<i>TGFB1</i>	CC 139 CT + TT 118 + 23	CC 27 CT + TT 63 + 14	1,88 [1,12–3,16] <i>p</i> = 0,02	СТ: 2,82 [1,28–6,20] <i>p</i> = 0,01	ТТ: 2,81 [0,86–9,23] <i>p</i> = 0,09
			AIC: 233,19	AIC: 233,23	
<i>IL1B</i>	CC 128 CT + TT 118 + 34	CC 41 CT + TT 47 + 16	1,36 [0,83–2,23] <i>p</i> = 0,23	СТ: 1,31 [0,63–2,75] <i>p</i> = 0,47	ТТ: 1,89 [0,66–5,39] <i>p</i> = 0,23
			AIC: 239,48	ТС: 0,44 [0,15–1,29] <i>p</i> = 0,14	
<i>TNFα</i>	GG 219 GA + AA 58 + 3	GG 96 GA + AA 3 + 5	0,21 [0,05–0,88] <i>p</i> = 0,03	–	–

Примечание. CC, GG, CG, CT, TT, GA, AA – варианты генотипов.

Как видно из табл. 3, полиморфизм генов *FGB* (rs1800788), *LPL* (rs328), *TNFα* (rs1800629), *ITGB3* (rs5918) и *TGFB1* (rs1800469) оказывал статистически значимое влияние на частоту развития повторных ИМ. Так, для гена *FGB* с более высокой частотой развития повторного ИМ ассоциировалось присутствие редкого аллеля (–249T) (OR = 1,91; 95% CI = 1,15–3,17; *p* = 0,01). Для гена *TNF* (–308G/A) удалось оценить только вклад редкого аллеля, который встречается чаще среди пациентов, не имевших повторного ИМ (OR = 0,21; 95% CI = 0,05–0,88; *p* = 0,03).

Кроме того, у пациентов с повторным ИМ значимо чаще определялся редкий аллель –509T гена *TGFB1* (OR = 1,88; 95% CI = 1,12–3,16; *p* = 0,002). И, наконец, выраженную связь продемонстрировал гомозиготный по редкому аллелю генотип гена *ITGB3* (PIA2) (OR = 7,08; 95% CI = 1,46–34,22; *p* = 0,005), в то время как наличие одного редкого аллеля не имело значимого патологического влияния.

При оценке суммарного вклада полиморфизмов исследуемых генов риск ИМ значительно возрастал при наличии комбинации полиморфизмов rs1800788 *FGB* и rs1800629 *TNFα* (OR = 4,04; 95% CI = 1,895–8,615; *p* = 0,0001), в то время как для rs328 *LPL* и

rs5918 *ITGB3* этот показатель оказался ниже, чем изолированно для каждого из генов (OR = 3,212; 95% CI = 1,165–8,853, *p* = 0,030) (табл. 3).

Таблица 3

Суммарный вклад полиморфизма генов <i>FGB</i> и <i>TNFα</i> в развитие повторного инфаркта миокарда	
Показатель	OR [95% CI] <i>p</i> -value
<i>FGB</i> (rs1800788) – аллель Т	OR = 4,04
<i>TNF</i> (rs1800629) – аллель А	[1,895–8,615] <i>p</i> = 0,0001
<i>LPL</i> (rs328) – аллель G	OR = 3,212
<i>ITGB3</i> (rs5918) – аллель С	[1,165–8,853] <i>p</i> = 0,030

ОБСУЖДЕНИЕ

Вклад наследственности в развитие коронарного атеросклероза не оставляет сомнений, так как многочисленные работы посвящены влиянию генетического полиморфизма на частоту развития сердечно-сосудистых осложнений (ССО) ИБС.

В частности, имеются данные о влиянии исследуемых нами ОНП *TNFα* (–308G/A), *TGFB1b* (–509 C/T), 1 бета *IL1B* (–511C/T), *FGB* (–249C/T) и *ITGB3* (PIA1/PIA2), а также *LPL* (rs328) на различные проявления атеросклероза.

Так, наличие полиморфного Т-аллеля ОНП rs1800788 гена *FGB* ассоциировано с частотой развития ИМ в популяции, хотя некоторые ранние исследования не находили связи полиморфизма с уровнем фибриногена в крови и проявлениями ИБС [5]. Полиморфизм гена *TNFα* во многих исследованиях также ассоциирован с частотой развития острых сердечно-сосудистых событий [6]. Полиморфизм –509Т/С гена *TGFB1b* долгое время считался благоприятным фактором в отношении частоты развития атеросклеротических поражений из-за противовоспалительного эффекта цитокина в процессе атерогенеза [7]. Однако в последнее время множество исследований показывают отрицательное влияние полиморфизма на различные проявления атеросклероза, возможно, из-за развития пролиферативных изменений интимы, и отмечают связь мутантного аллеля –509Т с частотой развития фатальных ССО [2].

Полиморфизм гена *LPL* в большинстве исследований не показал значимого влияния на частоту развития и особенности течения коронарного атеросклероза [8], однако предполагается его связь с неблагоприятным течением при целом ряде сопутствующих факторов. Полиморфизм P1A2 гена *ITGB3* в большом количестве исследований ассоциируется с частотой развития острых состояний, в том числе у более молодых пациентов, однако практически не имеет значения для развития хронических состояний [9]. Наличие полиморфизма на участке гена *IL1β* –511С/Т ассоциируется с частотой и степенью развития атеросклеротических стенозов различных локализаций, при этом данные о его влиянии на частоту развития ИМ довольно противоречивы [10].

В то же время необходимо отметить, что большая часть исследований проводится в группах сравнения среди относительно здоровой популяции и отражает в первую очередь риски возникновения заболевания, а не его динамику. Отличительной особенностью этой работы является сравнительная оценка генетического полиморфизма среди пациентов с осложненным атеросклерозом, а именно в зависимости от наличия однократного или повторного ИМ с возможностью его прогнозирования. Нами установлено, что у пациентов с повторным инфарктом миокарда прослеживалась значительная ассоциация с полиморфизмом четырех генов: *FGB* (rs1800788), *TNF* (rs1800629), *LPL* (rs328), *ITGB3* (rs5918) и *TGF* (rs180046).

Наличие Т-аллеля ОНП rs1800788 гена *FGB* с высокой статистической значимостью чаще встречалась у пациентов с повторным ИМ, что в полной мере соотносится с данными других исследований

и может объясняться увеличением количества фибриногена и его влиянием на атеротромбоз [5]. В то же время наблюдалась противоположная картина с геном *TNFα* rs1800629. Полиморфный А-аллель значительно чаще встречался у пациентов без признаков острого или перенесенного ИМ, в то время как нормальный G/G-генотип был ассоциирован с увеличением частоты заболевания. Тогда как в других исследованиях отмечали защитную роль G-аллеля, в первую очередь, в отношении острых событий, таких как ИМ или нестабильная стенокардия [11].

Вклад полиморфизма гена *LPL* rs328 также проявился у пациентов с повторным ИМ и крайне значимо ассоциировался с учащением развития патологии. С учетом некоторых исследований о влиянии мутантного G-аллеля на развитие атеросклероза у пациентов после перенесенного ИМ [12] можно предположить значимость полиморфизма данного гена именно для пациентов с рецидивирующей окклюзией коронарных артерий.

Полиморфизм гена *ITGB3* rs5918 существенно увеличивал частоту развития ИМ только в случае мутантного гомозиготного генотипа и имел значение только в группе пациентов, перенесших повторный ИМ. В целом это не противоречит данным о патологическом влиянии мутантного аллеля *ITGB3* rs5918 на количество фибриногена и реактивность тромбоцитов при тяжелых ССО [13]. Наличие полиморфного G-аллеля гена *TGF* rs1800469 также оказался значимым только в случае повторного ИМ, что может свидетельствовать о значимости избыточного синтеза экстрацеллюлярного матрикса при тяжелом поражении коронарных сосудов [2].

Оценка вклада совокупного полиморфизма исследуемых генов позволила предположить доминирующее значение групп полиморфных аллелей в прогнозировании риска прогрессирования атеросклероза. Так, при комбинации полиморфных аллелей генов *FGB* rs1800788 и *TNFα* rs1800629 риск повторного ИМ у пациентов с однократным инфарктом существенно возрастал, в том числе и по сравнению с наличием единичного полиморфизма отдельных генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена связь полиморфизмов генов *FGB* rs1800788, *LPL* rs328, *ITGB3* rs5918, *TNFα* rs1800629 и *TGF* rs1800469 с частотой развития повторного ИМ. Причем повторный ИМ ассоциирован с присутствием любого полиморфного генотипа генов *FGB* rs1800788, *LPL* rs328, *TGFB1* rs1800469 и полимор-

фного гомозиготного генотипа гена *ITGB3* rs5918, а также нормального гомозиготного генотипа гена *TNFA* rs1800629. В то же время наличие полиморфного генотипа гена *TNFA* rs1800629, наоборот, свидетельствовало о его протективном влиянии на развитие повторного ИМ.

Увеличение встречаемости некоторых полиморфизмов в группе пациентов с повторным ИМ по сравнению с группой пациентов с однократным ИМ может свидетельствовать в первую очередь о влиянии этих полиморфизмов на прогрессирование стенозирующего атеросклеротического процесса в коронарных артериях. Однако этот тезис требует дальнейшего изучения.

Оценка суммарного вклад полиморфизма генов *FGB* rs1800788 и *TNFA* rs1800629 целесообразна для уточнения риска развития как первичного, так и повторного ИМ с целью оптимизации диагностических и лечебных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sukhija R., Fahdi I., Garza L., Fink L., Scott M., Aude W., Pacheco R., Bursac Z., Grant A., Mehta J.L. Inflammatory markers, angiographic severity of coronary artery disease, and patient outcome. *Am. J. Cardiol.* 2007; 99 (7): 879–884. DOI: 10.1016/j.amjcard.2006.11.032.
2. Koch W., Hoppmann P., Mueller J.C., Schömig A., Kastrati A. Association of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (5): 1114–1119. DOI: 10.1161/01.ATV.0000217747.66517.11.
3. Miranda-Malpica E., Martínez-Rios M.A., Fragoso J.M., Delgadillo-Rodríguez H., Rodríguez-Pérez J.M., González-Quesada C., Martínez-Rodríguez N., Saldaña-Mendoza A., Peña-Duque M.A., Vargas-Alarcón G. The interleukin 1B–511 polymorphism is associated with the risk of developing restenosis after coronary stenting in Mexican patients. *Hum. Immunol.* 2008; 69 (2): 116–121. DOI: 10.1016/j.humimm.2007.12.003.
4. McPherson T.H., Tybjaerg-Hansen A. Genetics of coronary artery disease. *Circ. Res.* 2016; 118 (4): 564–578. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306566.
5. Titov B.V., Osmak J., Matveeva N.A., Kukava G.N., Shakhnovich R.M., Favorov A.V., Ruda M.Y., Favorova O.O. Genetic risk factors for myocardial infarction more clearly manifest for early age of first onset. *Mol. Biol. Rep.* 2017; 44 (4): 315–321. DOI: 10.1007/s11033-017-4112-5.
6. Szalai C., Füst G., Duba J., Kramer J., Romics L., Prohászka Z., Császár A. Association of polymorphisms and allelic combinations in the tumour necrosis factor- α -complement MHC region with coronary artery disease. *J. Med. Genet.* 2002; 39 (1): 46–51. DOI: 10.1136/jmg.39.1.46.
7. Yang Y.N., Zhao B., Li X.M., Xie X., Liu F., Chen B.D. Association of a transforming growth factor- β 1 polymorphism with acute coronary syndrome in a Chinese Han population. *Mol. Res.* 2014; 13 (3): 6160–6167. DOI: 10.4238/2014.April.3.2.
8. Jensen M.K., Rimm E.B., Rader D., Schmidt E.B., Sørensen T.I., Vogel U., Overvad K., Mukamal K.J. S447X variant of the lipoprotein lipase gene, lipids, and risk of coronary heart disease in 3 prospective cohort studies. *Am. Heart J.* 2009; 157 (2): 384–390. DOI: 10.1016/j.ahj.2008.10.008.
9. Verdoia M., Cassetti E., Schaffer A., Barbieri L., Giovine G.D., Nardin M., Marino P., Sinigaglia F., Luca G.D. Novara Atherosclerosis Study Group (NAS). Relationship between glycoprotein IIIa platelet receptor gene polymorphism and coronary artery disease. *Angiology.* 2015; 66 (1): 79–85. DOI: 10.1177/0003319714524296.
10. Tabrez S., Jabir N.R., Firoz C.K., Hindawi S., Shakil S., Damanhour G.A., Zaidi S.K. Estimation of interleukin-1 β Promoter (–31 C/T and –511 T/C) polymorphisms and its level in coronary artery disease patients. *J. Cell. Biochem.* 2017; 118 (9): 2977–2982. DOI: 10.1002/jcb.25958.
11. Koch W., Kastrati A., Böttiger C., Mehilli J., von Beckerath N., Schömig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001; 159 (1): 137–144. DOI: 10.1016/s0021-9150(01)00467-1.
12. Ahmadi Z., Senemar S., Toosi S., Radmanesh S. The Association of lipoprotein lipase genes, HindIII and S447X polymorphisms with coronary artery disease in Shiraz city. *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* 2015; 7 (2): 63–67. DOI: 10.15171/jcvtr.2015.14.
13. Grove E.L., Ørntoft T.F., Lassen J.F., Jensen H.K., Kristensen S.D. The platelet polymorphism PLA2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J. Intern. Med.* 2004; 255 (6): 637–644. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2004.01327.x.

Вклад авторов

Маянская С.Д. – разработка концепции и плана исследований, анализ и интерпретация данных. Гараева Л.А. – подбор пациентов в исследование, анализ и интерпретация данных, оформление статьи. Тепляков А.Т. – консультирование по вопросам концепции исследования, полученных результатов и утверждение статьи для публикации. Филипенко М.Л. – составление плана исследования и проведение исследования. Соколова Е.А. – проведение исследования и статистическая обработка полученных данных. Кравцова О.А. – проведение исследования, редактирование статьи. Березикова Е.Н. – клиническая интерпретация полученных данных.

Сведения об авторах

Маянская Светлана Дмитриевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра госпитальной терапии, КГМУ, г. Казань. ORCID 0000-0001-6701-5395.

Гараева Лилия Айратовна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии, КГМА – филиал РМАНПО, г. Казань. ORCID 000-0002-9427-6037.

Тепляков Александр Трофимович, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения сердечной недостаточности, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-0721-0038.

Филипенко Максим Леонидович, канд. биол. наук, зав. лабораторией фармакогеномики, ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-8950-5368.

Соколова Екатерина Алексеевна, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория фармакогеномики, ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-5715-8007.

Кравцова Ольга Александровна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань. ORCID 0000-0002-4227-008X.

Березикова Екатерина Николаевна, д-р мед. наук, доцент, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, НГМУ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-9630-0213.

(✉) **Маянская Светлана Дмитриевна**, e-mail: Smayanskaya@mail.ru.

Поступила в редакцию 10.03.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Рецепторный механизм инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии

Нарыжная Н.В., Мухомедзянов А.В., Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н.

Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучение участия брадикининовых, каннабиноидных и ваниллоидных рецепторов (TRPV1-каналов) в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической нормобарической гипоксии.

Материалы и методы. Исследование было выполнено на самцах крыс Вистар ($n = 117$) массой 250–300 г. Адаптацию к гипоксии (ННГ) моделировали в течение 21 сут при 12% pO_2 , 0,3% pCO_2 и нормальном атмосферном давлении. Через 1 сут после адаптации у крыс воспроизводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч). В исследовании использовали следующие препараты: селективный антагонист каннабиноидных CB1-рецепторов римонабант (1 мг/кг), селективный антагонист каннабиноидных CB2-рецепторов AM630 (2,5 мг/кг), селективный антагонист брадикининовых B2-рецепторов HOE140 (50 мкг/кг), антагонист ваниллоидных рецепторов (TRPV1-каналов) капсазепин (3 мг/кг). Все антагонисты вводили за 15 мин до коронароокклюзии.

Результаты. Адаптация к нормобарической гипоксии приводила к формированию выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта. Блокада B2-рецепторов устраняла инфаркт-лимитирующий эффект ННГ. Блокада каннабиноидных или ваниллоидных рецепторов не влияла на инфаркт-лимитирующее действие ННГ.

Заключение. Инфаркт-лимитирующий эффект ННГ зависит от активации B2-рецепторов, а адаптационное повышение толерантности сердца к ишемии и реперфузии не зависит от каннабиноидных или ваниллоидных рецепторов.

Ключевые слова: миокард, ишемия, реперфузия, рецепторы, хроническая гипоксия.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10001). Исследование с HOE140 выполнено в рамках госзадания АААА-А15-115120910024-0.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 137 от 16.09.2015).

Для цитирования: Нарыжная Н.В., Мухомедзянов А.В., Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н. Рецепторный механизм инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к нормобарической гипоксии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 138–142. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-138-142>.

Receptor mechanism of infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia

Naryzhnaya N.V., Mukhomedyanov A.V., Tsubulnikov S.Yu., Maslov L.N.

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Science
111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the involvement of bradykinin, cannabinoid and vanilloid (TRPV1 channel) receptors in the implementation of the infarct-limiting effect of chronic normobaric hypoxia (CNH).

Materials and methods. The study was performed on male Wistar rats ($n = 117$) weighing 250–300 g. Adaptation to CNH was modeled for 21 days at 12% pO₂, 0.3% pCO₂ and normal atmospheric pressure. A day after adaptation of rats to CNH coronary artery occlusion (45 min) and reperfusion (2 h) was performed. In the study the following compounds were used: selective cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (1 mg/kg), selective cannabinoid CB2 receptor antagonist AM630 (2.5 mg/kg), selective bradykinin B2 receptor antagonist HOE140 (50 µg/kg), and vanilloid receptor (TRPV1 channel) antagonist capsazepine (3 mg/kg). All antagonists were administered 15 min before coronary artery occlusion.

Results. Adaptation to normobaric hypoxia promoted the formation of the pronounced infarct-limiting effect. The blockade of B2 receptor eliminated the infarct-limiting effect of CNH. Blockade of cannabinoid or vanilloid receptors did not affect the infarct-limiting effect of CNH.

Conclusion. The infarct-limiting effect of CNH depends on the activation of B2 receptor, and the adaptive increase in cardiac tolerance to ischemia/reperfusion does not depend on cannabinoid or vanilloid receptors.

Key words: myocardium, ischemia, reperfusion, receptors, chronic hypoxia.

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

Source of financing. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-10001). The study with HOE140 was carried out within the framework of the state assignment AAAA-A15-115120910024-0.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science (Protocol No.137 of 16.09.2015).

For citation: Naryzhnaya N.V., Mukhomedzyanov A.V., Tsibulnikov S.Yu., Maslov L.N. Receptor mechanism of infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 138–142. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-138-142>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что при хронической умеренной гипоксии формируется неспецифическая устойчивость миокарда к повреждению при ишемии и следующей за ней реперфузии. Однако пути формирования резистентности миокарда при адаптации к гипоксии остаются малоизученными. В частности, недостаточно исследованы рецепторные механизмы этого феномена. Ранее нами было обнаружено участие опиоидных рецепторов в инфаркт-лимитирующем [1] и цитопротекторном [2] действии адаптации к непрерывной гипоксии. Однако иные рецепторные механизмы остаются неисследованными. Вместе с тем известно о важной роли брадикининовых, каннабиноидных и ваниллоидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к ишемии и реперфузии при ишемическом и дистантном preconditionировании [3–7].

Целью настоящего исследования явилось изучение участия брадикининовых, каннабиноидных и ваниллоидных рецепторов (TRPV1-каналов) в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта непрерывной нормобарической гипоксии (ННГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на самцах крыс Вистар ($n = 117$) массой 250–300 г. Животные опыт-

ных групп (адаптированные к гипоксии) подвергали воздействию ННГ (12% pO₂, 0,3% pCO₂) при нормальном атмосферном давлении в камере в течение 21 сут [1]. Контроль над состоянием газовой среды осуществляли с помощью датчиков TCOD-IR и OLC 20 (компания Oldham, Россия) и аппарата «Био-Нова-204G4R1» (НТО «Био-Нова», Россия) через блок управления MX 32 (компания Oldham, Россия). За 24 ч до начала эксперимента животных опытной группы извлекали из гипоксической камеры. Группы крыс нормоксического контроля содержались в стандартных условиях вивария.

Перед выполнением процедуры коронароокклюзии животные были наркотизированы α-хлоралозой (100 мг/кг внутривенно). Во время выполнения последующих манипуляций животные находились на искусственной вентиляции атмосферным воздухом, которую осуществляли с помощью аппарата ИВЛ SAR-830 Series (Central Wisconsin Engineers Inc., Schofield, США) через интубированную трахею. Для выполнения коронароокклюзии грудную клетку вскрывали на уровне V межреберья слева от грудины, сердце освобождали от перикарда и накладывали лигатуру на левую нисходящую коронарную артерию в ее верхней трети на 45 мин. Реперфузию осуществляли путем освобождения лигатуры с визуальным

контролем возобновления коронарного кровообращения по гиперемии ишемизированной области [8]. Продолжительность реперфузии составляла 2 ч. Для определения размера инфаркта сердце крыс промывали через аорту физиологическим раствором, лигатуру, наложенную ранее на левую коронарную артерию, вновь затягивали и участок миокарда, не подвергшийся ишемии, прокрашивали 5%-м раствором перманганата калия. После ополаскивания миокарда физиологическим раствором отделяли правый желудочек, оба желудочка взвешивали, левый желудочек рассекали на срезы толщиной 1 мм параллельно оси сердца.

Срезы левого желудочка окрашивали 1%-м раствором 2,3,5-трифенилтетразолия (37 °С, 30 мин) и фиксировали 1 сут в 10%-м растворе нейтрального формалина [8]. Срезы сканировали (HP Scanjet G2710 Photo Scanner, США), размер зоны некроза и зоны риска (гипоперфузии) определяли планиметрически с помощью пакета прикладных программ. Величину инфаркта выражали в процентах от размера зоны риска.

В исследовании использовали следующие препараты: селективный антагонист каннабиноидных СВ1-рецепторов римонабант (1 мг/кг), селективный антагонист каннабиноидных СВ2-рецепторов AM630

(2,5 мг/кг), селективный антагонист брадикининовых В2-рецепторов HOE140 (50 мкг/кг), антагонист ванилоидных рецепторов (TRPV1-каналов) капсазепин (3 мг/кг). Все антагонисты вводили за 15 мин до коронароокклюзии. Выбор доз фармакологических агентов проводили на основе данных литературы [9–12].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего $M \pm SEM$. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического U -критерия Манна – Уитни. За критический уровень значимости принимали $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Адаптация к нормобарической гипоксии приводила к формированию выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта, размер формирующегося при коронароокклюзии-реперфузии инфаркта, определяемого как соотношение размера некроза к зоне риска, оказался на 38% меньше, чем у неадаптированных крыс. При этом следует отметить гипертрофию правого желудочка миокарда, характерную для состояния хронической гипоксии (табл. 1).

Таблица 1

Влияние антагониста СВ1-каннабиноидных рецепторов римонабанта и СВ2-каннабиноидных рецепторов Am630 на размер инфаркта при 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии у крыс, адаптированных к нормобарической гипоксии, $M \pm SEM$						
Серия	<i>n</i>	Зона некроза, мг	Зона риска, мг	Размер инфаркта ЗН/ЗР, %	Масса правого желудочка, мг	Масса левого желудочка, мг
Контроль	12	186,9 ± 14,4	351,3 ± 9,8	53,2 ± 4,8	175,1 ± 11,3	981,7 ± 13,7
Римонабант (1 мг/кг)	12	185,6 ± 14,4	355,3 ± 9,8	48,0 ± 4,8	170,1 ± 10,3	981,7 ± 13,7
AM630 (2,5 мг/кг)	12	181,7 ± 19,4	367,1 ± 22,4	49,5 ± 7,2	173,4 ± 10,7	947,8 ± 64,6
ННГ	12	124,1 ± 12,8*	369,3 ± 15,1	33,6 ± 6,8*	226 ± 12,2*	958,3 ± 12,6
ННГ + римонабант (1 мг/кг)	12	131,8 ± 13,5*	374,3 ± 17,1	35,2 ± 8,3*	225,3 ± 17,6*	989,3 ± 15,5
ННГ + AM630 (2,5 мг/кг)	12	118,6 ± 13,5	364,8 ± 17,1	32,5 ± 8,2*	233,7 ± 13,9*	969,8 ± 12,9

Примечание. ЗН – зона некроза, ЗР – зона риска (здесь и в табл. 2).

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, U -критерий Манна – Уитни.

Обнаружено, что ингибирование каннабиноидных СВ1-рецепторов селективным антагонистом римонабантом не приводило к изменению размера инфаркта у крыс, адаптированных к ННГ. Эти данные свидетельствуют о том, что СВ1-каннабиноидные рецепторы не участвуют в формировании инфаркт-лимитирующего действия ННГ. Введение селективного антагониста СВ2-каннабиноидных AM630 также не повлияло на размер инфаркта при коронароокклюзии и реперфузии у крыс, адаптированных к ННГ. Введение селективных антагонистов каннабиноидных рецепторов неадаптированным крысам не приводило к изменению

размера инфаркта при последующей коронароокклюзии (см. табл. 1). Полученные данные позволяют говорить о том, что СВ1- и СВ2-каннабиноидные рецепторы не участвуют в инфаркт-лимитирующем действии ННГ.

Блокада брадикининовых рецепторов селективным антагонистом HOE140 приводила к увеличению размера инфаркта у крыс, адаптированных к ННГ (рис.). При этом у неадаптированных крыс блокада брадикининовых рецепторов не оказала влияние на размер инфаркта. Эти данные свидетельствуют о том, что брадикининовые рецепторы участвуют в формировании инфаркт-лимитирующего действия ННГ.

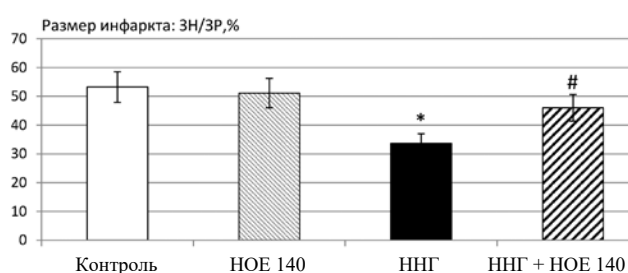


Рисунок. Влияние антагониста брадикининовых рецепторов НОЕ 140 на размер инфаркта у крыс после курса ННГ: ЗН – зона некроза, ЗР – зона риска

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # с группой ННГ, U -критерий Манна – Уитни

Ингибирование ваниллоидных рецепторов (TRPV1-каналов) селективным блокатором капсазепином не повлияло на размер формирующегося инфаркта ни у крыс после курса ННГ, ни у неадаптированных животных (табл. 2). Полученные данные позволяют сделать заключение об отсутствии связи (TRPV1-каналов) с формированием кардиопротекции при адаптации к нормобарической гипоксии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема защиты миокарда при ишемическом повреждении остается актуальной, несмотря на значительный прогресс в данной области.

Таблица 2

Влияние блокатора ваниллоидных рецепторов (TRPV1-каналов) капсазепина на размер инфаркта у крыс после курса ННГ, $M \pm SEM$						
Серия	n	Зона некроза, мг	Зона риска, мг	Размер инфаркта ЗН/ЗР, %	Масса правого желудочка, мг	Масса левого желудочка, мг
Контроль	12	186,9 ± 14,4	351,3 ± 9,8	53,2 ± 4,8	175,1 ± 11,3	981,7 ± 13,7
Капсазепин (3 мг/кг)	9	171,9 ± 18,5	353,6 ± 17,1	48,6 ± 6,2	199,4 ± 13,6	917,5 ± 19,3
ННГ	12	124,1 ± 12,8*	369,3 ± 15,1	33,6 ± 6,8*	226 ± 12,2*	958,3 ± 12,6
ННГ + капсазепин (3 мг/кг)	12	128,9 ± 12,2*	374,3 ± 17,1	34,7 ± 6,1*	218,1 ± 16,1*	976,6 ± 12,5

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, U -критерий Манна – Уитни.

Причиной этого является, в частности, отсутствие эффективных кардиопротекторных препаратов, не обладающих сильными побочными эффектами. В настоящее время для защиты миокарда от ишемического-реперфузионного повреждения предлагают бета-адреноблокаторы, агонисты альфа-2-адренорецепторов, блокаторы кальциевых каналов, нитраты, статины, макроэргические соединения [13]. Эффективность ряда перечисленных препаратов недостаточна для антиишемической защиты, что при наличии множества побочных эффектов ставит под сомнение целесообразность их применения. Таким образом, поиск новых средств для защиты миокарда при ишемическом-реперфузионном воздействии остается актуальной задачей современной фармакологии.

Одним из путей направленного поиска таких средств является исследование механизмов неспецифической адаптационной устойчивости миокарда к ишемическому повреждению. Известно, что миокард животных, подвергнутых умеренной хронической гипоксии, более устойчив к ишемическому воздействию, чем миокард интактных животных [1, 8, 14]. Исследование этого феномена ведется на протяжении 60 лет, однако многие стороны формирования адаптационной устойчивости миокарда остаются неисследованными. В частности, ее рецепторные механизмы остаются малоизученными. Предыдущие исследования нашей лаборатории показали участие

в адаптационной кардиопротекции опиоидных рецепторов [1, 2].

Настоящая работа выявила, что брадикининовые рецепторы также вовлечены в механизм запуска защитного механизма при адаптации к хронической гипоксии. Известно, что оба типа этих рецепторов являются связанными с Gi/o-белками, которые находятся на мембране кардиомиоцита. Последовательная активация рецепторов (опиоидных или брадикининовых) и Gi/o-белков приводит к запуску внутриклеточного киназного механизма, выключающего протеинкиназу C, NO-синтазу, тирозинкиназы, и впоследствии к активации АТФ-чувствительных калиевых каналов митохондрий [14]. Результатом последнего является ингибирование открытия поры, регулирующей проницаемость митохондрий, повышение устойчивости митохондрий к ионам кальция, улучшение энергетического метаболизма митохондрий и, таким образом, снижение чувствительности клетки к повреждающему действию ишемии и реперфузии [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют представить брадикининовые рецепторы в качестве одного из ключевых механизмов формирования инфаркт-лимитирующего действия непрерывной нормобарической гипоксии. Учитывая данные о важной роли опиоидных рецепторов в кардиопротекции при ННГ [1, 2], можно говорить о реализации инфаркт-лимитирующего

эффекта хронической гипоксии через Gi/o-протектин-сопряженные опиоидные и брадикининные рецепторы. Каннабиноидные рецепторы и TRPV1-каналы не участвуют в инфаркт-лимитирующем действии адаптации к нормобарической гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maslov L.N., Naryzhnaia N.V., Tsubulnikov S.Y., Kolar F., Zhang Y., Wang H., Gusakova A.M., Lishmanov Y.B. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. *Life Sci.* 2013; 93 (9–11): 373–379. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.07.018.
2. Naryzhnaya N.V., Khaliulin I., Lishmanov Y.B., Suleiman M.S., Tsubulnikov S.Y., Kolar F., Maslov L.N. Participation of opioid receptors in the cytoprotective effect of chronic normobaric hypoxia. *Physiol. Res.* 2019; 68 (2): 245–253. DOI: 10.33549/physiolres.933938.
3. Maslov L.N., Khaliulin I., Zhang Y., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Mechoulam R., De Petrocellis L., Downey J.M. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2016; 21 (3): 262–272. DOI: 10.1177/1074248415612593.
4. Gorbunov A.S., Maslov L.N., Jaggi A.S., Singh N., De Petrocellis L., Boshchenko A.A., Roohbakhsh A., Bezuglov V.V., Oeltgen P.R. Physiological and pathological role of TRPV1, TRPV2 and TRPV4 channels in heart. *Curr. Cardiol. Rev.* 2019; 15 (4): 244–251. DOI: 10.2174/1573403X15666190307112326.
5. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* 2015; 116 (4): 674–699. DOI: 10.1161/CIRCRESA-NA.116.305348.
6. Randhawa P.K., Jaggi A.S. Investigating the involvement of glycogen synthase kinase-3 β and gap junction signaling in TRPV1 and remote hind preconditioning-induced cardioprotection. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 814 :9–17. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.07.045.
7. Sharma R., Randhawa P.K., Singh N., Jaggi A.S. Bradykinin in ischemic conditioning-induced tissue protection: Evidence and possible mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 2015; 768: 58–70. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.029.
8. Neckář J., Szárszoi O., Herget J., Ošťádal B., Kolář F. Cardio-protective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol. Res.* 2003; 52 (2): 171–175.
9. Lichtman A.H., Wiley J.L., LaVecchia K.L., Neviasser S.T., Arthur D.B., Wilson D.M., Martin B.R. Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 357 (2–3): 139–148. DOI: 10.1016/S0014-2999(98)00558-5.
10. Heymann H.M., Wu Y., Lu Y., Qvit N., Gross G.J., Gross E.R. Transient receptor potential vanilloid 1 inhibitors block laparotomy- and opioid-induced infarct size reduction in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2017; 174 (24): 4826–4835. DOI: 10.1111/bph.14064.
11. Gross G.J., Hsu A., Gross E.R., Falck J.R., Nithipatikom K. Factors mediating remote preconditioning of trauma in the rat heart: central role of the cytochrome P450 epoxide pathway in mediating infarct size reduction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2013; 18 (1): 38–45. DOI: 10.1177/1074248412437586.
12. Toguri J.T., Moxsom R., Szczesniak A.M., Zhou J., Kelly M.E., Lehmann C. Cannabinoid 2 receptor activation reduces leukocyte adhesion and improves capillary perfusion in the iridial microvasculature during systemic inflammation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 61 (2): 237–249. DOI: 10.3233/CH-151996.
13. Козлов И.А. Профилактика осложнений, обусловленных ишемией-реперфузией миокарда, при экстракардиальных оперативных вмешательствах. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016; 15 (3): 102–119. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-102-119.
14. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Халиулин И.Г., Пей Ж.М., Жанг И., Цепкина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Лешманов Ю.Б. Адаптация с помощью хронической непрерывной нормобарической гипоксии увеличивает толерантность кардиомиоцитов крыс к аноксии-реоксигенации: роль протеинкиназ. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2016; 102 (12): 1462–1471.
15. Prokudina E.S., Naryzhnaya N.V., Mukhomedzyanov A.V., Gorbunov A.S., Zhang Y., Jaggi A.S., Tsubulnikov S.Y., Nesterov E.A., Lishmanov Y.B., Suleiman M.S., Oeltgen P.R., Maslov L.N. Effect of chronic continuous normobaric hypoxia on functional state of cardiac mitochondria and tolerance of isolated rat heart to ischemia and reperfusion: role of μ and delta2 opioid receptors. *Physiol. Res.* 2019; 68 (6): 909–920. DOI: 10.33549/physiolres.933945.

Сведения об авторах

Нарыжная Наталья Владимировна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-2264-1928.

Мухомедзянов Александр Валерьевич, мл. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-1808-556X.

Цибульников Сергей Юрьевич, ст. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-1534-2516.

Маслов Леонид Николаевич, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6020-1598.

(✉) Цибульников Сергей Юрьевич, e-mail: tsubulnikov1986@mail.ru.

Поступила в редакцию 02.03.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Модификация макрофагов и моноцитов человека магнитными наночастицами *in vitro* для доставки, опосредованной клетками

Перекуча Н.А.¹, Смолина П.А.¹, Дёмин А.М.², Краснов В.П.², Першина А.Г.^{1,3}

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Институт органического синтеза (ИОС) им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (УрО РАН)
Россия, 620990, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22

³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – разработать протокол модификации макрофагов и моноцитов человека магнитными наночастицами оксида железа (Fe_3O_4) *in vitro*.

Материалы и методы. Магнитные наночастицы оксида железа получены методом со-осаждения, покрыты силоксановой оболочкой и полиэтиленгликолем 3000. Макрофаги мыши линии RAW 264.7, моноциты периферической крови и макрофаги человека инкубировали с магнитными наночастицами в течение 1–24 ч. Эффективность захвата наночастиц клетками оценивали феррозиновым методом и методом микроскопии с окрашиванием на железо по Перлсу. Исследование жизнеспособности клеток выполняли методом проточной цитофлуориметрии с использованием красителя SYTOX Green.

Результаты. Инкубация макрофагов с магнитными наночастицами в концентрации >5 мкг/мл в течение 1 ч на ротаторе при 37 °С обеспечивает загрузку наночастиц в $>99\%$ клеток. Исследуемые магнитные наночастицы не оказывают негативных эффектов на жизнеспособность клеток. Клетки линии RAW 264.7, поглотившие наночастицы, сохраняют миграционную активность. Эффективность загрузки макрофагов магнитными наночастицами составляет >50 пкг (Fe)/клетку.

Заключение. Макрофаги, загруженные магнитными наночастицами согласно предложенному протоколу, являются жизнеспособными, сохраняют способность к миграции и перспективны в качестве систем доставки, опосредованной клетками, для диагностики и терапии опухоли.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, моноциты, макрофаги, системы доставки на основе клеток.

Конфликт интересов. Авторы гарантируют отсутствие потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Сибирского государственного медицинского университета (No. AAAA-A18-118031490008-7).

Соответствие принципам этики. Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7698 от 25.02.2019).

Для цитирования: Перекуча Н.А., Смолина П.А., Дёмин А.М., Краснов В.П., Першина А.Г. Модификация макрофагов и моноцитов человека магнитными наночастицами *in vitro* для доставки, опосредованной клетками. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 143–150. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-143-150>.

Modification of human monocytes and macrophages by magnetic nanoparticles *in vitro* for cell-based delivery

Perekucha N.A.¹, Smolina P.A.¹, Demin A.M.², Krasnov V.P.², Pershina A.G.^{1,3}

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences

22, S. Kovalevskoy Str., Yekaterinburg, 620990, Russian Federation

³ National Research Tomsk Polytechnic University

30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to develop a method for the modification of human monocytes/macrophages by iron oxide magnetic nanoparticles *in vitro*.

Materials and methods. Iron oxide magnetic nanoparticles were obtained by a co-precipitation method and coated with a thin SiO₂ layer and polyethylene glycol 3000. Murine macrophage-like cell line RAW 264.7, primary human monocytes and macrophages were incubated with magnetic nanoparticles for 1–24 hours. The efficiency of cellular uptake of nanoparticles was measured using a ferrozine-based method and microscopy with Perls' Prussian blue staining. The cell viability was tested by fluorescent flow cytometry using SYTOX Green.

Results. Incubation of RAW264.7 cell, human monocytes and macrophages with magnetic nanoparticles at a concentration > 5 µg/mL on a rotator for 1 hour at 37 °C provides the loading of nanoparticles into > 99% of cells. The magnetic nanoparticles have no adverse effect on the cell viability. The RAW264.7 cells modified with nanoparticles showed no change in migration activity. The efficiency of the nanoparticle uptake by macrophages was >50 pkg (Fe)/cell.

Conclusion. According to the proposed method, macrophages loaded with magnetic nanoparticles have proved viable, they retain the ability to migrate, and therefore can be used as cell-based delivery systems for tumor diagnostic and therapy.

Key words: magnetic nanoparticles, monocytes, macrophages, cell-based delivery system.

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

Source of financing. State Assignment of Siberian State Medical University No. AAAA-A18-118031490008-7.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under Siberian State Medical University (Protocol No. 7698 of 25.02.2019).

For citation: Perekucha N.A., Smolina P.A., Demin A.M., Krasnov V.P., Pershina A.G. Modification of human monocytes and macrophages by magnetic nanoparticles *in vitro* for cell-based delivery. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 143–150. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-143-150>.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитные наночастицы (МНЧ) активно исследуются для разработки альтернативных подходов к терапии [1] и диагностике злокачественных новообразований [2, 3], в том числе контролируемой доставке лекарств [4, 5] и мониторингу эффективности химиотерапии опухолей [6].

Однако проблема эффективной доставки МНЧ в опухоль до сих пор остается нерешенной [7]. Одним

из многообещающих подходов к решению данной проблемы является использование аутологичных лейкоцитов в качестве биоконтейнеров для доставки наночастиц [8, 9]. Лейкоциты способны к активной миграции, могут проходить через эндотелий капилляров и проникать в межклеточное пространство, что делает их идеальными «курьерами» [10], позволяя повысить эффективность доставки более чем в 100 раз [11].

Среди лейкоцитов наиболее привлекательной популяцией для разработки системы доставки наночастиц внутри клеток являются моноциты и макрофаги. Важной особенностью моноцитов и макрофагов в отличие от нейтрофилов является способность сохранять свою жизнеспособность продолжительное время после фагоцитирования частиц. Выраженная способность к фагоцитозу выгодно отличает моноциты и макрофаги от лимфоцитов; для эффективной загрузки последних наночастицами необходимо использование специальных методов [12].

Способность моноцитов и макрофагов за счет хемотаксиса [13] проникать в гипоксические зоны опухоли обещает решить проблему воздействия на раковые клетки в данных зонах, практически недоступных для проникновения классических фармакологических препаратов [14].

Первым шагом к применению систем доставки, опосредованной клетками, является создание комплексов иммунных клеток с наночастицами. Существует несколько подходов [15, 16]; основной метод заключается в сборке *in vitro*, когда наночастицы либо присоединяются к поверхности клеточной мембраны, либо интернализованы в клетках [17, 18]. Альтернативным подходом является использование «теней» клеток – в данном случае наночастицы покрывают изолированными клеточными мембранами [19].

Важным при разработке систем доставки является оптимизация параметров модификации клеток наночастицами. Модификация не должна приводить к существенным изменениям клеточного иммунного ответа, скорости дифференцировки, миграционной способности клеток, снижению жизнеспособности [20].

Целью данной работы было разработать протокол загрузки МНЧ оксида железа (Fe_3O_4) в макрофаги/моноциты человека *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МНЧ оксида железа (Fe_3O_4) со средним диаметром 10 нм были получены методом соосаждения из водных растворов солей Fe^{2+} и Fe^{3+} , покрыты SiO_2 -оболочкой и ковалентно модифицированы $\text{O}-[\text{N}-(6\text{-maleimidohexanoil})\text{aminoethyl}]-\text{O}'-[3-(\text{N}-\text{succinimidyl})-3\text{-oxopropyl}]$ полиэтиленгликолем 3000 (ПЭГ). Для получения флуоресцентно-меченных частиц использовали NHS-эфир Cyanine5 (Cy5, Lumiprobe, Россия). Полученные наночастицы (MNP-PEG) формировали стабильные коллоидные суспензии в водных буферах со средним гидродинамическим диаметром 190 нм ($\text{PdI} < 0,06$).

Клетки линии RAW264.7 культивировали в полной питательной среде (ППС) DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10%-й феталь-

ной телячьей сыворотки (FBS, Gibco, США), L-глутамина (Glutamax, Gibco) и гентамицина при уровне 5% CO_2 и температуры 37 °C. Для снятия адгезированных клеток использовали скрепер.

Для выделения моноцитов периферическую венозную кровь здоровых доноров собирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с гепарином (Green Vac-Tube с Li-гепарином, Green Cross) в объеме 30 мл. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови здоровых доноров проводили методом центрифугирования на градиенте плотности Фиколла 1,077 (ПанЭко, Россия). Выделение моноцитов из мононуклеарной фракции проводили на магнитных колонках (Miltenyi Biotec Inc., Германия) с использованием магнитных частиц с антителами к CD14 (Miltenyi Biotec Inc.). Моноциты культивировали в ППС RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 1% L-глутамина (Glutamax, Gibco), 10% FBS и 1% пенициллин-стрептомицина (ПанЭко). Оценку чистоты популяции моноцитов человека проводили с использованием антител PE Mouse Anti-Human CD14 Clone M5E2 (BD Biosciences, США). Чистота популяции моноцитов составляла не менее 97%.

Для получения макрофагов моноциты инкубировали в ППС RPMI с добавлением гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, Sigma, США) до концентрации 100 нг/мл в течение 7 сут, с заменой среды каждые 3 сут. Для оценки созревания использовали антитела Pacific Blue anti-human CD11b Antibody Clone ICRF44 (Biolegend, США) и PE anti-human CD68 Antibody (Biolegend). Чистота популяции макрофагов составляла не менее 91%.

Для исследования поглощения наночастиц по 10^5 клеток линии RAW264.7 в 450 мкл ППС DMEM/F12 вносили в эппендорфы объемом 2 мл или рассаживали в лунки 24-луночного планшета. Затем в пробы вносили 1/10 часть суспензии MNP-PEG (50 мкл) в натрий-фосфатном буфере (PBS). В контрольные образцы клеток добавляли эквивалентный объем $1 \times \text{PBS}$. Клетки в эппендорфах инкубировали при температуре 37 °C в течение 1 или 2 ч на ротаторе, клетки в 24-луночных планшетах – в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе.

Клетки после инкубации с MNP-PEG на ротаторе центрифугировали в течение 7 мин при 180 g, ресуспендировали в $1 \times \text{PBS}$ для отмывки от наночастиц, центрифугировали и осадок ресуспендировали в 200 мкл $1 \times \text{PBS}$. Адгезированные клетки после инкубации с MNP-PEG дважды отмывали $1 \times \text{PBS}$, снимали с помощью скрепера и переносили в эппендорфы объемом 2 мл. Клетки центрифугировали в течение 7 мин при 180 g, осадок ресуспендировали в 200 мкл $1 \times \text{PBS}$.

Анализ жизнеспособности проводили на точном цитометре BD Accuri C6 (BD Biosciences) с использованием SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific). Для проведения конфокальной микроскопии ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 в 5 мкг/мл PBS. Исследование проводили на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 710 (Германия). Для выявления железа в клетках использовали набор Prussian Blue Iron Stain Kit (Polysciences Inc., США). Клетки анализировали методом световой микроскопии (Leica DMi8, Leica Camera, Германия). Определения содержания железа в клетках проводили феррозинным методом, как описано в [21]. Оценку скорости миграции клеток проводили согласно методике, предложенной в работе [22].

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ GraphPad Prism 7. Для проверки нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро – Уилка. Данные с нормальным распределением представлены как среднее и стандартное отклонение $M \pm SD$. Статистическую значимость различий определяли, используя t-тест Стьюдента. Для выявления достоверности различий в случае множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) для группового сравнения, затем критерий Даннета для попарных сравнений с контрольной группой. Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выбора оптимальных условий загрузки клеток наночастицами на клетках линии RAW 264.7 было протестировано два режима инкубации: с адгезированными на культуральной плашке клетками и в суспензии при постоянном перемешивании на ротаторе. При инкубации RAW 264.7 с MNP-PEG в диапазоне концентраций 0,625–5 мкг/мл установлено, что MNP-PEG более эффективно поглощались клетками в суспензии (при инкубации на ротаторе), чем адгезированными клетками. Так, при концентрации MNP-PEG 5 мкг/мл через 1 ч инкубации на планшете доля Су5-позитивных клеток – $(38,0 \pm 2,5)\%$, тогда как при инкубации на ротаторе доля поглотивших наночастицы клеток составила $(99,7 \pm 0,1)\%$. При увеличении времени инкубации на ротаторе до 2 ч количество поглотивших наночастицы клеток возрастало до $(99,9 \pm 0,04)\%$ (рис. 1, а).

После инкубации клеток с MNP-PEG на ротаторе более 90% клеток RAW264.7 сохраняли свою жизнеспособность. Так, через 1 ч инкубации с MNP-PEG в концентрации 5 мкг/мл на ротаторе доля живых клеток составила $(90,7 \pm 0,3)\%$, что не отличалось от значений, полученных для контрольных образцов $(91,4 \pm 0,8)\%$ (рис. 1, б). После инкубации адгезированных клеток на плашке с добавлением MNP-PEG доля погибших клеток составила $(24,5 \pm 4,0)\%$ и не отличалась от значения в контрольных образцах $(24,0 \pm 3,7)\%$.

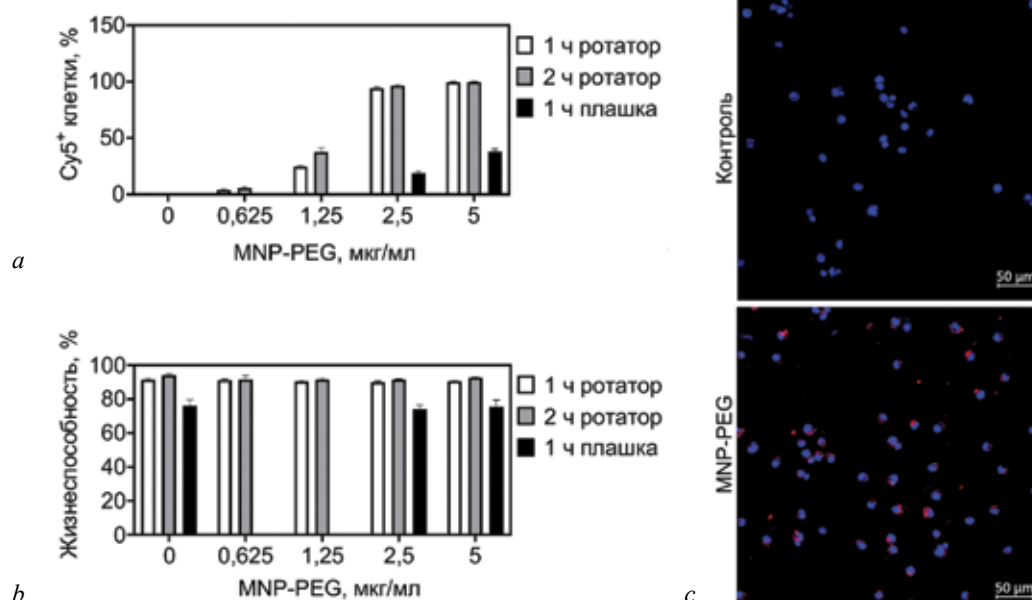


Рис. 1. Поглощение MNP-PEG клетками линии RAW264.7: а – эффективность поглощения MNP-PEG клетками линии RAW264.7 при различных условиях инкубации; б – жизнеспособность клеток линии RAW264.7 при различных условиях инкубации по данным флуоресцентной проточной цитометрии с SYTOX Green; в – изображение клеток линии RAW264.7, проинкубированных без наночастиц (контроль) и после инкубации с MNP-PEG в течение 1 ч на ротаторе, полученное методом конфокальной микроскопии (Carl Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Германия). Ядро окрашено синим (Hoechst 33342), наночастицы – красным (Cy5). Масштабный отрезок: 50 мкм

Данный эффект, вероятно, обусловлен негативным влиянием использования скрепера для снятия адгезированных клеток с поверхности пластика.

Эффективное поглощение MNP-PEG клетками RAW 264.7 было подтверждено данными конфокальной микроскопии. Так, в цитоплазме клеток RAW 264.7 после их инкубации с MNP-PEG наблюдали Су5-позитивные включения (рис. 1, *b*).

Выбранный режим инкубации – 1 ч на ротаторе при 37 °C – был далее использован для количественной оценки эффективности «загрузки» клеток линии RAW 264.7. Клетки в количестве 10^6 инкубировали с MNP-PEG в высокой концентрации (50 мкг/мл), после чего отмывали и ресуспендировали в $1 \times$ MACS буфере. После проведения сортировки на магнитных колонках подсчитывали содержание клеток в промывочных растворах и клеточной суспензии, элюированной с колонки после ее извлечения из магнитного сепаратора. Эффективность

магнитного сортировки для клеток RAW 264.7 составила 77%. Магнитно-позитивные клетки переносили в лунки 6-луночного планшета и инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе для адгезии клеток, после чего дополнительно отмывали от наночастиц дважды $1 \times$ PBS. Далее клетки снимали с поверхности пластика для определения содержания в них железа. Согласно данным феррозинового теста, эффективность поглощения наночастиц макрофагами RAW264.7 составила (58 ± 14) пкг/кл. Согласно данным проточной цитометрии с SYTOX Green, после модификации клеток наночастицами MNP-PEG доля мертвых клеток составила $(9,9 + 3,6)\%$, что не отличалось от значений, полученных для контрольных образцов, – $(11,8 + 4,6)\%$.

При исследовании магнитно-позитивных клеток RAW264.7 методом световой микроскопии в цитоплазме наблюдали большое количество Перлс-позитивных включений (рис. 2).

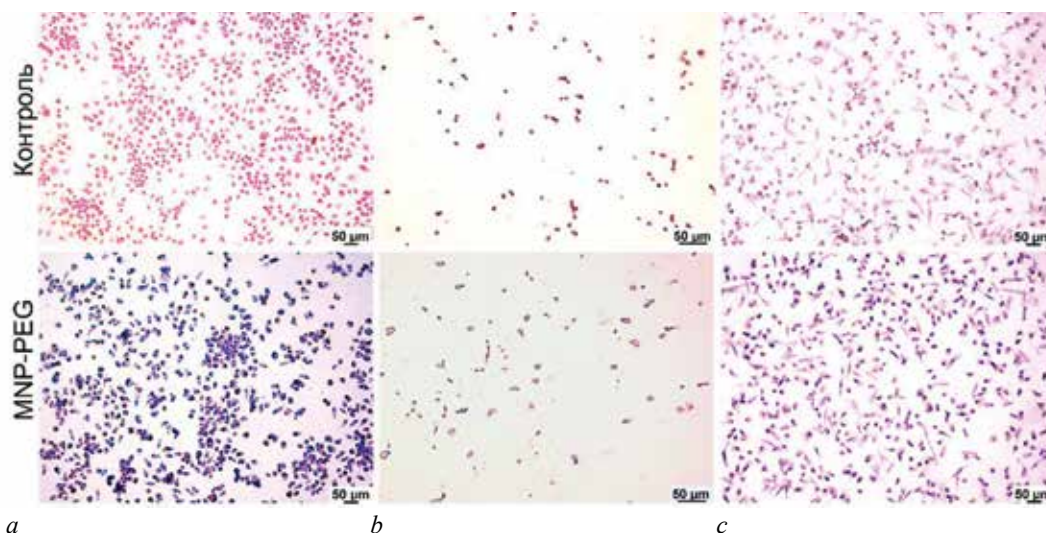


Рис. 2. Изображение клеток линии RAW264.7 (*a*), моноцитов периферической крови человека (*b*) и макрофагов человека (*c*), проинкубированных без наночастиц (контроль) и после загрузки MNP-PEG и магнитного сортировки. Окрашивание по Перлсу. Масштабный отрезок: 50 мкм

Скорость миграции клеток RAW264.7, загруженных MNP-PEG, составила 12,6 мкм/ч (рис. 3) и практически не отличалась от скорости миграции клеток в контрольных образцах (14,8 мкм/ч).

В следующей серии экспериментов нами было выполнено исследование поглощения MNP-PEG моноцитами периферической крови человека и макрофагами, дифференцированными из моноцитов периферической крови. Инкубацию проводили при выбранных для клеток линии RAW264.7 условиях: неадгезированные клетки в суспензии инкубировали с MNP-PEG в концентрации 50 мкг/мл в течение 1 ч на ротаторе при 37 °C. MNP-PEG поглощались как моноцитами, так и макрофагами человека. Изобра-

жение магнитно-позитивных макрофагов человека, адгезированных на плашке, полученные методом световой микроскопии, представлены на рис. 2, *b*.

Согласно данным определения содержания железа в клетках после их инкубации с MNP-PEG, установлено, что эффективность поглощения наночастиц моноцитами составила (46 ± 6) пкг/кл, а макрофагами – (369 ± 96) пкг/кл. Эффективность магнитного сортировки макрофагов после их загрузки MNP-PEG составила 93%. Несмотря на 100%-ю модификацию популяции клеток наночастицами (согласно данным проточной цитометрии), вероятно, плотность загрузки каждой индивидуальной клетки несколько варьирует.

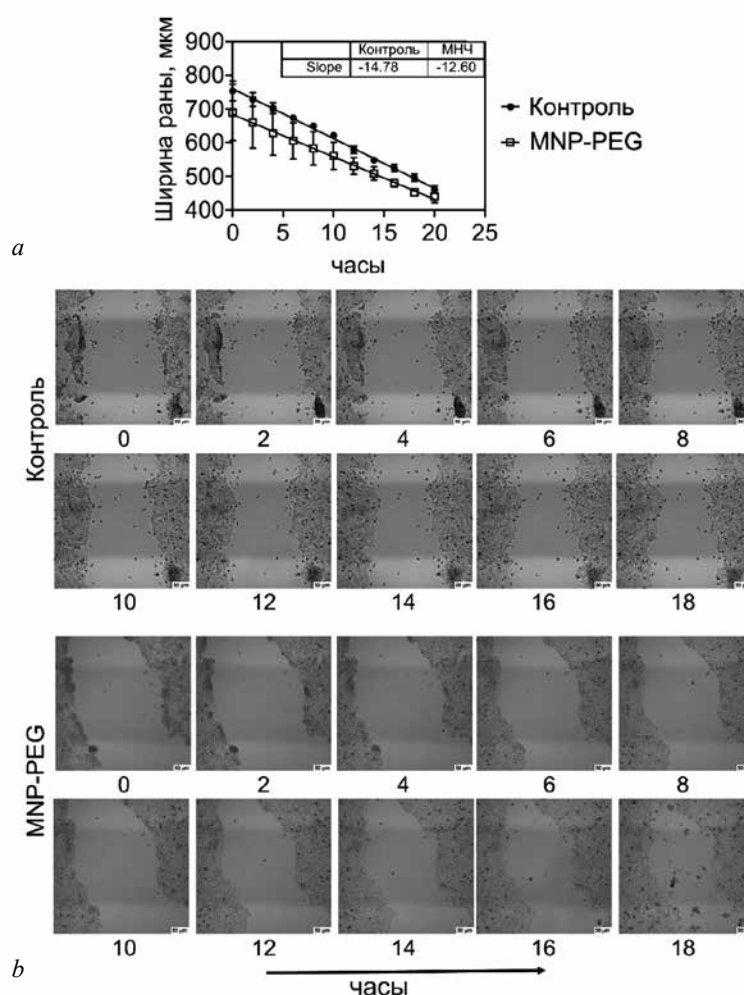


Рис. 3. Исследование миграционной активности клеток линии RAW264.7: *a* – расчет скорости миграции клеток RAW264.7 в контроле и клеток, загруженных MNP-PEG; *b* – изображение клеток RAW264.7, проинкубированных без наночастиц, (контроль) и после загрузки MNP-PEG и магнитного сортинга, полученные в течение 18 ч после формирования «раны» на адгезионном слое

В связи с этим некоторые клетки содержат недостаточное количество частиц для их эффективного удержания на магнитной колонке. Важно отметить, что жизнеспособность клеток, загруженных MNP-PEG, не отличалась от значений, полученных в контрольных образцах.

Исследование влияния MNP-PEG на жизнеспособность мононуклеаров и моноцитов периферической крови человека при совместной инкубации в течение 24 ч показало, что MNP-PEG не оказывали негативных эффектов на жизнеспособность клеток (рис. 4).

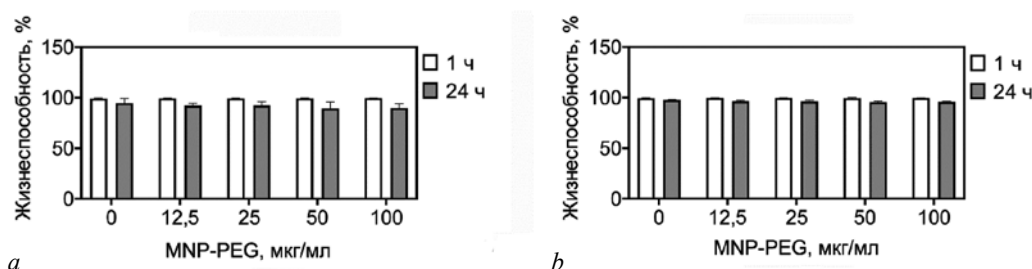


Рис. 4. Влияние MNP-PEG на жизнеспособность мононуклеаров (*a*) и моноцитов (*b*) периферической крови человека после их инкубации с MNP-PEG (12,5–100 мг/мл) в течение 1 и 24 ч согласно данным флуоресцентной проточной цитометрии с SYTOX Green

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в экспериментах показано успешное создание систем доставки на основе модифицированных наночастицами моноцитарно-макрофагальных клеточных линий [23], а также альвеолярных [24], перитонеальных [25] и костномозговых макрофагов [20]. Однако исследования поглощения наночастиц первичными культурами моноцитарных и макрофагальных клеток человека остаются единичными.

Время инкубации с МНЧ для достижения максимального накопления, используемое в опубликованных работах, значительно варьирует (от 1 до 24 ч.). Показано, что время зависит от типа поверхностной модификации наночастиц [26]. Согласно нашим данным, увеличение времени инкубации до 2 ч не приводило к заметному увеличению числа загруженных клеток, в связи с чем из соображений оптимизации протокола было выбрано время инкубации 1 ч.

В результате исследования установлено, что макрофаги проявили более выраженную фагоцитарную активность в отношении наночастиц, что хорошо согласуется с опубликованными данными сравнительного исследования поглощения наночастиц клетками моноцитарной линии человека THP-1 и после их дифференцировки до макрофагов dTHP-1 [27]: эффективность составила 6 и 50 пкг/клетку для THP-1 и dTHP-1 соответственно. Отметим, что эффективность поглощения MNP-PEG значительно выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Магнитные наночастицы оксида железа, покрытые SiO_2 -оболочкой и ПЭГ, эффективно поглощаются клетками макрофагальной линии мыши RAW 264.7, моноцитами периферической крови человека и макрофагами человека, дифференцированными из моноцитов периферической крови. Оптимальными условиями загрузки является инкубация неадгезированных клеток (в суспензии) с наночастицами в течение 1 ч на ротаторе при 37 °C. МНЧ поглощаются >99% клеток в суспензии и не оказывают цитотоксических эффектов на клетки RAW 264.7, моноциты периферической крови человека и макрофаги человека. Таким образом, макрофаги, загруженные МНЧ, согласно предложенному протоколу, являются жизнеспособными, сохраняют способность к миграции и перспективны в качестве систем доставки магнитных наночастиц в опухоль.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu X., Zhang Y., Wang Y., Zhu W., Li G., Ma X. et al. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics*. 2020; 10 (8): 3793–3815. DOI: 10.7150/thno.40805.
2. Yu E.Y., Bishop M., Zheng B., Ferguson R.M., Khandhar A.P., Kemp S.J. et al. Magnetic Particle Imaging: A Novel *in vivo* imaging platform for cancer detection. *Nano Lett.* 2017; 17 (3): 1648–1654. DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b04865.
3. Lee J., Huh Y., Jun Y., Seo J., Jang J., Song H. et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med.* 2007; 13 (1): 95–99. DOI: 10.1038/nm1467.
4. Huang Y., Gao X., Chen J. Leukocyte-derived biomimetic nanoparticulate drug delivery systems for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018; 8 (1): 4–13. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.12.001.
5. Shaghasemi S.B., Virk M.M., Reimhult E. Optimization of magneto-thermally controlled release kinetics by tuning of magnetoliposome composition and structure. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-017-06980-9.
6. Zhao H., Richardson R., Talebloo N., Mukherjee P., Wang P., Moore A. uMUC1-targeting magnetic resonance imaging of therapeutic response in an orthotopic mouse model of colon cancer. *Mol. Imaging Biol.* 2019; 21 (5): 852–860. DOI: 10.1007/s11307-019-01326-5.
7. Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvornak H.F. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*. 2016; 1 (5): 16014. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.14.
8. Huang Y., Gao X., Chen J. Leukocyte-derived biomimetic nanoparticulate drug delivery systems for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018; 8 (1): 4–13. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.12.001.
9. Choi M.R., Stanton-Maxey K.J., Stanley J.K., Levin C.S., Bardhan R., Akin D. et al. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Letters*. 2007; 7 (12): 3759–3765. DOI: 10.1021/nl072209h.
10. Moore T.L., Hauser D., Gruber T., Rothen-Rutishauser B., Lattuada M., Petri-Fink A. et al. Cellular shuttles: monocytes/macrophages exhibit transendothelial transport of nanoparticles under physiological flow. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017; 9 (22): 18501–18511. DOI: 10.1021/acsami.7b03479.
11. Han H., Eyal S., Portnoy E., Mann A., Shmuel M., Benifla M. et al. Monocytes as carriers of magnetic nanoparticles for tracking inflammation in the epileptic rat brain. *Curr. Drug Deliv.* 2019; 16 (7): 637–644. DOI: 10.2174/1567201816666190619122456.
12. Steinfeld U., Pauli C., Kaltz N., Bergemann C., Lee H.-H. T lymphocytes as potential therapeutic drug carrier for cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 311 (1–2): 229–236. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.12.040.
13. Si J., Shao S., Shen Y., Wang K. Macrophages as active nanocarriers for targeted early and adjuvant cancer chemotherapy. *Small*. 2016; 12 (37): 5108–5119. DOI: 10.1002/smll.201601282.
14. Quatromoni J.G., Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *American Journal of Translational Research*. 2012; 4 (4): 376–389.
15. Anselmo A.C., Gilbert G.B., Kumar S., Gupte V., Cohen R.E., Rubner M.F. et al. Monocyte-mediated delivery of polymeric

- backpacks to inflamed tissues: a generalized strategy to deliver drugs to treat inflammation. *Journal of Controlled Release*. 2015; 199: 29–36. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.11.027.
16. Hao J., Chen J., Wang M., Zhao J., Wang J., Wang X. et al. Neutrophils, as “Trojan horses”, participate in the delivery of therapeutical PLGA nanoparticles into a tumor based on the chemotactic effect. *Drug Deliv.* 2020; 27 (1): 1–14. DOI: 10.1080/10717544.2019.1701141.
 17. Irvine D.J., Hanson M.C., Rakhra K., Tokatlian T. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy. *Chemical Reviews*. 2015; 115 (19): 11109–11146. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00109.
 18. Dong X., Chu D., Wang Z. Leukocyte-mediated delivery of nanotherapeutics in inflammatory and tumor sites. *Theranostics*. 2017; 7 (3): 751–763. DOI: 10.7150/thno.18069.
 19. Cao H., Dan Z., He X., Zhang Z., Yu H., Yin Q. et al. Liposomes coated with isolated macrophage membrane can target lung metastasis of breast cancer. *ACS Nano*. 2016; 10 (8): 7738–7748. DOI: 10.1021/acs.nano.6b03148.
 20. Tong Y.-I., Kang W., Shi Y., Zhou G., Lu Y. Physiological function and inflamed-brain migration of mouse monocyte-derived macrophages following cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles – Implication of macrophage-based drug delivery into the central nervous system. *Int. J. Pharm.* 2016; 505 (1–2): 271–282. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.028.
 21. Pershina A.G., Brikunova O.Y., Perekuha N.A., Demin A.M., Shevelev O.B., Malkeyeva D., Kiseleva E., Minin A., Kostikova L.A., Stepanov I.V., Kuznetsov D.K., Shur V.Ya., Krasnov V.P. Supporting data and methods for the characterization of iron oxide nanoparticles conjugated with pH-(low)-insertion peptide, testing their cytotoxicity and analyses of biodistribution in SCID mice bearing MDA-MB231 tumor. *Data in Brief*. 2020; 29: 105062. DOI: 10.1016/j.dib.2019.105062.
 22. Justus C.R., Leffler N., Ruiz-Echevarria M., Yang L.V. *In vitro* cell migration and invasion assays. *J. Vis. Exp.* 2014; (88): 51046. DOI: 10.3791/51046.
 23. Basel M.T., Balivada S., Wang H., Shrestha T. Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7: 297–306. DOI: 10.2147/IJN.S28344.
 24. Madsen S.J., Christie C., Hong S.J., Trinidad A., Peng Q., Uzal F.A. et al. Nanoparticle-loaded macrophage-mediated photothermal therapy: potential for glioma treatment. *Lasers in Medical Science*. 2015; 30 (4): 1357–1365. DOI: 10.1007/s10103-015-1742-5.
 25. Choi J., Kim H.Y., Ju E.J., Jung J., Park J., Chung H.K. et al. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors. *Biomaterials*. 2012; 33 (16): 4195–4203. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.022.
 26. Beduneau A., Ma Z., Grotepas C.B., Kabanov A., Rabinow B.E., Gong N. et al. Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. *PLoS ONE*. 2009; 4 (2): e4343. DOI: 10.1371/journal.pone.0004343.
 27. Luciani N., Gazeau F., Wilhelm C. Reactivity of the monocyte/macrophage system to superparamagnetic anionic nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2009; 19 (35): 6373–6380. DOI: 10.1039/b903306h.

Вклад авторов

Перекуча Н.А. – выполнение экспериментальной части исследования, интерпретация и анализ данных, написание рукописи. Смолина П.А. – выполнение экспериментальной части исследования. Дёмин А.С., Краснов В.И. – синтез магнитных наночастиц. Першина А.Г. – разработка концепции и дизайна, интерпретация и анализ данных, редактирование рукописи, проверка интеллектуального содержания.

Сведения об авторах

Перекуча Наталья Андреевна, мл. науч. сотрудник, Центр биологических исследований и биоинженерии Центральной научно-исследовательской лаборатории, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9310-3196.

Смолина Полина Алексеевна, студент, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9216-9572.

Дёмин Александр Михайлович, канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория асимметрического синтеза, ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0002-4132-232.7

Краснов Виктор Павлович, д-р хим. наук, профессор, зав. лабораторией асимметрического синтеза, ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0003-1411-6218.

Першина Александра Геннадьевна, канд. биол. наук, зав. центра биологических исследований и биоинженерии Центральной научно-исследовательской лаборатории, СибГМУ; доцент, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7604-9722.

(✉) Першина Александра Геннадьевна, e-mail: allysyz@mail.ru.

Поступила в редакцию 08.09.2020

Подписана в печать 03.11.2020

Гастропротективное влияние *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov при экспериментальной этаноловой гастропатии

Салчак С.М.¹, Разуваева Я.Г.¹, Торопова А.А.¹, Аракчаа К.Д.², Оленников Д.Н.¹, Николаева И.Г.¹

Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИОЭБ СО РАН)

Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

Научно-исследовательский институт медико-социальных проблем и управления Республики Тыва (НИИ МСПУ РТ)

Россия, 667003, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Кечил-оола, 2а

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка гастропротективного действия сухих экстрактов, полученных с использованием различных экстрагентов из корневищ с корнями *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov при этаноловом повреждении желудка у белых крыс.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 68 самцах и самках крыс линии Вистар. Этаноловую гастропатию моделировали однократным внутрижелудочным введением этанола в дозе 10 мл/кг. Животные опытных групп (I–VI) в течение 7 сут до моделирования гастропатии получали лекарственные формы из корневищ с корнями *F. hystrix*: I – отвар в объеме 10 мл/кг; II–V – сухие экстракты в дозе 200 мг/кг, полученные путем экстракции водой очищенной, 30-, 40- и 70%-м этанолом соответственно; VI – сухой экстракт, приготовленный двукратной экстракцией 40%-м и однократной экстракцией 30%-м этанолом. В слизистой оболочке желудка определяли структурные изменения, которые дифференцировали на мелкие, крупные и полосовидные эрозии. Проводили патоморфологические исследования желудка.

Результаты. Установлено, что в I, II, IV и V опытных группах общее количество повреждений в желудке было в среднем на 44% меньше, чем в контроле, в III опытной группе – на 67% и в VI опытной группе – в 3,6 раза. Индекс Паулса для крупных эрозий в I–V опытных группах был ниже контрольного показателя на 38–75%, в VI – на 83%. Полосовидные эрозии не выявлялись у животных III–VI опытных групп; индекс Паулса для данных деструкций в I и II опытных группах был в 7,0 и 6,5 раза ниже показателя контрольных животных. В стенке желудка животных отмечались неглубокие эрозии, не достигающие мышечной пластинки слизистой оболочки; нарушения микроциркуляции и лейкоцитарная инфильтрация были менее выражены относительно контроля.

Заключение. *F. hystrix* оказывает гастропротективное влияние, повышая резистентность слизистой оболочки желудка к действию этанола. Наиболее выраженный фармакотерапевтический эффект проявляет экстракт, приготовленный двукратной экстракцией 40%-м и однократной экстракцией 30%-м этиловым спиртом.

Ключевые слова: этаноловая язва, *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov, гастропротективное действие.

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

Источник финансирования. Исследования проведены в рамках выполнения госзадания (№ ААА-А-17-117011810037-0).

✉ Салчак Сайзана Михайловна, e-mail: saizana_salchak@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол № 4 от 26.01.2017).

Для цитирования: Салчак С.М., Разуваева Я.Г., Торопова А.А., Аракчаа К.Д., Оленников Д.Н., Николаев И.Г. Гастропротективное влияние *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov при экспериментальной этаноловой гастропатии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 151–157. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-151-157>.

Gastroprotective effect of *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov in ethanol-induced gastropathy

Salchak S.M.¹, Razuvaeva Ya.G.¹, Toropova A.A.¹, Arakchaa K.D.², Olennikov D.N.¹, Nikolaev I.G.¹

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences 6, Sakhyanovoy Str., Ulan-Ude, 670047, Russian Federation

² Scientific Research Institute of Medical-Social Problems and Management of the Republic of Tuva 2a, Kechil-oolo Str., Kyzyl, Republic of Tuva, 667003, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the gastroprotective effect of dry extracts from the roots and rhizomes of *Ferulopsis hystrix* in ethanol-induced gastropathy.

Materials and methods. The studies were carried out on 68 white *Wistar* rats. Ethanol-induced gastropathy was simulated by a single intragastric administration of ethanol in the dose of 10 ml/kg. Animals of the experimental groups received medicinal forms from the roots and rhizomes of *F. hystrix*: I – decoction in a volume of 10 ml/kg; II–V – dry extracts in the dose of 200 mg/kg, obtained by extraction with purified water, 30, 40 and 70% ethanol, respectively; VI – dry extract, prepared by double extraction with 40% and single extraction with 30% ethanol for 7 days before the modeling of gastropathy. Number of structural changes was determined in the gastric mucosa. They were differentiated into small, large, and strip-like erosions. The Pauls' index was calculated for structural changes. Pathomorphological studies of the stomach were carried out.

Results. The total number of structural changes in the stomach of animals in experimental groups I, II, IV and V is 44% lower on average, in experimental group III it is 67% lower and in experimental group VI it is 3.6 times lower than in the control. The Pauls' index for large erosions in experimental groups I–V is 38–75% lower, in experimental group VI it is 83% lower than the index in the control animals. No strip-like erosions are detected in animals of experimental groups III–VI. Pauls' index for these destructions in experimental groups I and II is 7.0 and 6.5 times lower than the index in the control animals. Microscopic morphological examination registered the increase of shallow-like erosions in the stomach of animals of experimental groups. Shallow-like erosions do not reach the *muscularis mucosae*. Microcirculation disorders and leukocyte infiltration are less pronounced than in the control group.

Conclusion. *F. hystrix* has the gastroprotective effect, increasing the resistance of the gastric mucosa to the effect of ethanol. The *F. hystrix* extract prepared with 30% and 40% ethanol shows the most pronounced pharmacotherapeutic effect in ethanol-induced gastropathy.

Key words: ethanol-induced gastropathy, *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov, gastroprotective effect.

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

Source of financing. The studies were carried out as part of the state assignment (No. AAAA-A17-117011810037-0).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee of the Institute of General and Experimental Biology (Protocol No. 4 of 26.01.2017).

For citation: Salchak S.M., Razuvaeva Ya.G., Toropova A.A., Arakchaa K.D., Olennikov D.N., Nikolaev I.G. Gastroprotective effect of *Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov in ethanol-induced gastropathy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 151–157. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-151-157>.

ВВЕДЕНИЕ

Феруловидка щетинистая (*Ferulopsis hystrix* (Bunge) Pimenov) – многолетнее растение семейства Umbelliferae, произрастающее на юге Сибири и Дальнего Востока [1]. Ранее данное растение относилось к роду *Phlojodicarpus* Turcz. ex Ledeb. – вздутоплодник Турчанинова (*Phlojodicarpus turczaninowii* Sipl.). В народной и традиционной медицине используются корневища с корнями *F. hystrix*. В тувинской народной медицине корни *F. hystrix*, известные под названием «чуксугбай», издавна получили широкое применение и в настоящее время продолжают занимать лидирующие позиции в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего средства, а также при туберкулезе и онкологических заболеваниях [2]. В монгольской и бурятской традиционных медицинских системах *F. hystrix* является заменителем костуса прекрасного (*ru rta*), используемого в тибетской медицине при лечении «рлунг» крови, болезней легких и горла, при устранении «давления» в желудке и «прекращении некроза» [3].

Корневища с корнями *F. hystrix* содержат различные группы биологически активных веществ, среди которых ведущую роль в фармакологической активности растения занимают кумарины: их суммарное содержание достигает 3,9–4,6% [4, 5]. Кумарины являются эффективными противовирусными, антибактериальными и антифунгальными средствами [6, 7], обладают противовоспалительной [8] и антиоксидантной [9, 10] активностью. В экспериментах на животных установлен выраженный гастропротективный эффект природных и синтетических кумаринов [11]. В связи с этим актуальным является изучение гастропротективного действия корневищ с корнями *F. hystrix*.

Целью данного исследования явилась оценка гастропротективного действия экстрактов сухих, полученных с использованием различных экстрагентов из корневищ с корнями *F. hystrix*, при этаноловом повреждении желудка у белых крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 68 самцах и самках крыс линии Вистар массой 180–200 г. Содержание животных соответствовало Правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 199Н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Перед началом экспериментов животных распределяли на группы с учетом принципа рандомизации. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986).

Животные разделены на семь групп: контрольная и шесть опытных (I–VI). Животные I опытной группы получали отвар *F. hystrix* в объеме 10 мл/кг, приготовленный по ОФС 1.4.1.0018.15 «Настои и отвары». Крысы II–V опытных групп получали сухие экстракты в дозе 200 мг/кг, полученные путем экстракции водой очищенной, 30-, 40- и 70%-м этиловым спиртом соответственно. Соотношение сырья : экстрагент составило 1 : 10 при комнатной температуре и интенсивном встряхивании с последующей вакуумной сушкой. Животные VI опытной группы получали экстракт, приготовленный двукратной экстракцией 40%-м этиловым спиртом, третью экстракцию выполняли 30%-м этиловым спиртом. Данный выбор экстрагентов позволил получить экстракт с максимальным содержанием экстрактивных веществ и хорошими физическими качествами [12].

Согласно данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), основными компонентами сухого экстракта *F. hystrix* являются кумарины, в том числе пеуценидин (3'-О-ацетокси-4'-О-сенециоилокси-2',3'-дигидроорозелол) и скиммин (умбеллиферон-7-О-глюкозид; 1,26%), содержание которых составило $(16,65 \pm 0,33)$ и $(1,2 \pm 0,03)\%$ соответственно. Количественный анализ кумаринов в сухом экстракте *F. hystrix* осуществляли методом ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова, г. Новосибирск, Россия) на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм; диаметр 5 мкм (Metrohm AG, Herisau, Швейцария); подвижная фаза: 0,2 М LiClO₄ в 0,006 М HClO₄ (А), ацетонитрил (В); градиентный режим (% В): 0–26 мин 5–100, 26–29 мин 100; скорость потока 150 мкл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор, 330 нм. Расчет содержания кумаринов проводили по градуировочным графикам, построенным с применением коммерческих образцов сравнения скиммина и пеуценидина (>95%; Wuhan ChemFaces Biochemical Co., Ltd., Wuhan, Hubei, КНР). Результаты представлены в виде среднего значения из трех параллельных определений $M \pm SD$.

Исследуемые лекарственные формы *F. hystrix* вводили животным внутрижелудочно в течение 7 сут, последнее введение осуществляли за 1 ч до применения ульцерогенного агента. Крысы контрольной группы получали эквивалентное количество очищенной воды по аналогичной схеме. Повреждение слизистой оболочки желудка (СОЖ) у белых крыс воспроизводили путем однократного внутрижелудочного введения абсолютного спирта в дозе 10 мл/кг на фоне 24-часовой пищевой депривации [13]. Через 1 ч после введения этанола крыс декапировали под легким эфирным наркозом. Для оценки

состояния слизистой оболочки желудка разрезали по большой кривизне и определяли число повреждений, которые дифференцировали на точечные эрозии (≤ 2 мм), крупные эрозии (≤ 5 мм) и полосовидные эрозии (> 5 мм). Для каждого вида повреждений подсчитывали индекс Паулса по формуле [13]. Для проведения патоморфологических исследований материал фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном формалине, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Срезы, приготовленные на микротоме, окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Для описания статистических различий использовался непараметрический критерий Манна – Уитни (U -тест). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$. Для сравнения частоты встречаемости повреждений в группах сравнения применен критерий Фишера. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у всех животных контрольной группы ($n = 10$) в СОЖ на фоне введения этанола выявлялись мелкие эрозии, у восьми – крупные и у шести – полосовидные эрозии. Индекс Паулса для них составил 4,0; 2,4 и 1,1 соответственно (таблица). При патоморфологическом исследовании в СОЖ контрольных животных отмечали кровоизлияния, эрозии в виде узких щелевидных дефектов, образующихся в результате десквамации некротизированных клеток покровного и железистого эпителия. У пяти животных наблюдали глубокие повреждения, распространявшиеся до мышечной пластинки СОЖ и характеризующиеся как язвы. На дне и краях язв выявляли некротические массы с явлениями десквамации. В пограничной зоне отмечалась массивная лейкоцитарная инфильтрация, а также клеточные элементы желез в состоянии выраженной дистрофии, вплоть до очагового некроза. В сосудах микроциркуляторного русла ядра эндотелиоцитов были набухшие, стенки пропитаны плазмой, с явлениями плазморрагий и диапедезных кровоизлияний, встречающихся ограниченно вдоль сосудов или на значительном протяжении в виде гомогенно-розовых масс, с примесью эритроцитов и лейкоцитов. В просветах сосудов отмечались сладж-феномен, эритро- и лейкостазы.

Использование отвара и экстрактов *F. hystrix*, приготовленных с помощью различных растворителей, оказывало гастропротективное влияние, повышая ре-

зистентность СОЖ к действию этанола. Так, у крыс, получавших отвар и экстракты, приготовленные на воде и 70%-м спирте, общее количество повреждений в СОЖ было в среднем на 44% меньше, чем у животных контрольной группы. Мелкие эрозии выявлялись у 100% крыс данных опытных групп; их количество и индекс Паулса значительно не отличались от показателей животных контрольной группы. Крупные эрозии отмечались у семи и восьми животных II и V опытных групп соответственно. Индекс Паулса для крупных эрозий в I, II и V опытных группах был ниже такового показателя в контроле на 38, 46 и 42% соответственно. Полосовидные эрозии наблюдали у двух из восьми животных, получавших водный экстракт, и у двух из 10 животных, получавших отвар. При этом индекс Паулса для полосовидных язв у крыс данных опытных групп был в 7,0 и 6,5 раза ниже такового показателя контрольных животных. При микроскопическом исследовании в стенке желудка у большинства животных I, II и V опытных групп отмечались кровоизлияния, эрозии, проникающие не более чем на $2/3$ собственной пластинки СОЖ. Язвы, представленные глубоким некрозом СОЖ и отграниченные выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, встречались только у двух животных в I и II опытных группах. Участки плазморрагий и диапедезных кровоизлияний были менее выражены.

У животных III и IV опытных групп, получавших экстракты, приготовленные на 30%-м и 40%-м этаноле, общее количество повреждений в СОЖ было на 67 и 45% ниже такового показателя в контроле (см. таблицу). Мелкие эрозии отмечались у восьми животных III и IV опытных групп, крупные эрозии – у шести и восьми животных из 10, получавших соответственно экстракты, приготовленные на 30%-м и 40%-м этаноле. Полосовидные эрозии у животных данных опытных групп не выявлялись. Индекс Паулса для мелких и крупных эрозий был значительно ниже в III опытной группе и составил 1,4 и 0,6 соответственно (против 2,1 и 1,6 в IV опытной группе, что в 2,9 и 4,0 раза ниже показателей контрольных животных). При гистологическом исследовании СОЖ животных III и IV опытных групп в большинстве случаев отмечались неглубокие эрозии, затрагивающие только поверхностно-ямочный эпителий. Единичные эрозии проникали на $1/2$ собственной пластинки слизистой оболочки. Вокруг эрозий лейкоцитарная инфильтрация была умеренно выражена, наблюдалась дилатация сосудов микроциркуляторного русла с эритро- и лейкостазами, мелкими участками плазморрагий и диапедезных кровоизлияний.

Наиболее выраженное гастропротективное влияние проявлял экстракт *F. hystrix*, приготовленный

на комбинации 30%-го и 40%-го этанола. Количество всех деструкций на одно животное в данной опытной группе составило 2,5 (см. таблицу), что в 3,6 раза ниже показателя в контрольной группе. Отсутствовали полосовидные эрозии. Мелкие и крупные эрозии отмечались, соответственно, у семи и пяти крыс; индекс Паулса для них был в 3,6 и 6,0 раза ниже таковых у животных контрольной группы. При патогистологическом исследовании стенки

желудка животных VI опытной группы установлено, что деструктивным изменениям был подвержен только поверхностно-ямочный эпителий, в результате десквамации которого отмечались мелкие эрозии со слабо выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Сосуды микроциркуляторного русла умеренно расширены и полнокровны, в основном с явлениями эритростаза и эритродиапедеза; сладж-феномен и плазморрагии не обнаружены.

Таблица

Влияние *Ferulopsis hystrix* на выраженность повреждений в слизистой оболочке желудка белых крыс при этаноловом повреждении

Показатель	Группа животных						
	Контрольная, <i>n</i> = 10	Опытная I, <i>n</i> = 10	Опытная II, <i>n</i> = 8	Опытная III, <i>n</i> = 10	Опытная IV, <i>n</i> = 10	Опытная V, <i>n</i> = 10	Опытная VI, <i>n</i> = 10
Общее кол-во повреждений, <i>Me</i> (Q_1 ; Q_3)	9 (7; 11)	5 (2; 8) <i>p</i> ≤ 0,05	6 (2; 8) <i>p</i> ≤ 0,05	3 (2; 3) <i>p</i> ≤ 0,05	4,5 (2; 8) <i>p</i> ≤ 0,05	5 (2; 7) <i>p</i> ≤ 0,05	2,5 (0; 4) <i>p</i> ≤ 0,05
<i>Точечные эрозии</i>							
Частота встречаемости, %	100	60	100	80	80	100	70
Кол-во деструкций, <i>Me</i> (Q_1 ; Q_3)	4 (3; 5)	3,5 (2; 4)	3,5 (2; 4)	2 (1; 3) <i>p</i> ≤ 0,05	2 (2; 4) <i>p</i> ≤ 0,05	3 (3; 4)	2 (0; 3)
Индекс Паулса	4,0	1,9	3,3	1,4	2,1	3,4	1,6
<i>Средние эрозии</i>							
Частота встречаемости, %	80	70	75	60	80	80	50
Кол-во деструкций, <i>Me</i> (Q_1 ; Q_3)	3 (2; 4)	2,5 (0; 4)	2 (0; 3)	1 (0; 1) <i>p</i> ≤ 0,05	2 (1; 3)	2 (1; 2)	0,5 (0; 1) <i>p</i> ≤ 0,05
Индекс Паулса	2,4	1,5	1,3	0,6	1,6	1,4	0,4
<i>Крупные эрозии</i>							
Частота встречаемости, %	60	30	25	0 <i>p</i> ≤ 0,01	0 <i>p</i> ≤ 0,01	0 <i>p</i> ≤ 0,01	0 <i>p</i> ≤ 0,01
Кол-во деструкций, <i>Me</i> (Q_1 ; Q_3)	1 (0; 3)	0 (0; 1)	0 (0; 2) <i>p</i> ≤ 0,05	0	0	0	0
Индекс Паулса	0,84	0,12	0,125	0	0	0	0

Примечание. Количество животных, включенных в анализ, – *n*.

Выявленное гастропротективное действие лекарственных форм корневищ с корнями *F. hystrix* обусловлено содержанием в нем фенольных соединений, в частности кумаринов и флавоноидов, обладающих антиоксидантным, противовоспалительным, антикоагулирующим и другими свойствами. Кумарины, ингибируя в очаге тканевого повреждения фермент циклооксигеназы-2, подавляют синтез медиаторов воспаления (гистамин, серотонин) и провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1β, фактора некроза опухоли альфа и других биологических субстанций; за счет этого оказывают противовоспалительный эффект, способствуя снижению сосудистой проницаемости и миграции лейкоцитов [14, 15]. Сосудорасширяющее действие кумаринов обусловлено снижением внутриклеточной концен-

трации кальция в гладких миоцитах сосудов микроциркуляторного русла. Важная роль в механизме антикоагулирующего действия кумаринов отводится снижению синтеза тромбосана В2 в тромбоцитах за счет ингибирования циклооксигеназ [16].

Следовательно, торможение агрегации тромбоцитов опосредованно способствует улучшению микроциркуляции в СОЖ, что вкупе с сосудорасширяющим и противовоспалительным эффектами кумаринов объясняет появление у экстракта *F. hystrix* гастропротективной активности при этаноловом повреждении желудка у белых крыс. Гастропротективный эффект может быть частично обусловлен антиоксидантными свойствами кумаринов и флавоноидов, входящих в состав *F. hystrix*, которые связаны с их способностью хелатировать

ионы металлов переменной валентности, участвующих в реакциях образования свободных радикалов [17], а также свойством связывать образовавшиеся радикалы [9] и повышать резистентность клеточных мембран [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, отвар и сухие экстракты из корневищ с корнями *F. hystrix*, приготовленные с помощью различных растворителей, проявляют гастропротективное действие, повышая резистентность СОЖ к действию этанола, ограничивая развитие дистрофических и некротических процессов в покровно-язвенном и железистом эпителиях, препятствуя развитию воспалительных процессов в стенке желудка белых крыс. По степени возрастания фармакотерапевтической эффективности данные лекарственные формы можно расположить в следующем порядке: экстракт *F. hystrix*, приготовленный на воде; экстракт *F. hystrix*, приготовленный на 70%-м этаноле; отвар *F. hystrix* < экстракт *F. hystrix*, приготовленный на 40%-м этаноле < экстракт *F. hystrix*, приготовленный на 30%-м этаноле < экстракт *F. hystrix*, приготовленный на 40%-м и 30%-м этаноле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Растительные ресурсы: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейство Fabaceae – Apiaceae; отв. ред. А.Л. Буданцев. СПб.; М., 2010: 601.
2. Серенот С.К. Тувинская народная медицина: лекарственные растения, травы, лишайники, грибы с параллельным описанием их использования в китайской, монгольской и тибетской медицинах. Кызыл: Тувин. кн. изд-во им. Ю.Ш. Кюнзегеша, 2009: 118.
3. Асеева Т.А., Кузнецова Н.А., Михневич Л.В., Корнопольцева Т.В., Чехирова Г.В. Болезни органов пищеварения: симптоматика и лечение (по материалам тибетских медицинских сочинений XII–XVII вв.). Новосибирск: Наука, 2016: 188.
4. Ganbaatar J., Shults E.E., Otgonsuren D., Radnaeva L.D., Taraskin V.V., Badamkhand D. Coumarins from *Peucedanum hystrix* growing in Mongolia. *Mongolian Journal of Chemistry*. 2014; 12: 42–49. DOI: 10.5564/mjc.v12i0.170.
5. Shul'ts E.E., Petrova T.N., Shakirov M.M., Bagryanskaya I.Yu., Taraskin V.V., Tolstikov G.A., Ganbaatar Zh., Radnaeva L.D., Otgonsuren D., Pokrovskii A.G. Plant coumarins IX. Phenolic compounds of *Ferulopsis hystrix* growing in Mongolia. Cytotoxic activity of 8,9-dihydrofurocoumarins. *Chemistry of Natural Compounds*. 2012; 48 (2): 211–217. DOI: 10.1007/s10600-012-0207-3.
6. Heide L. The aminocoumarins: biosynthesis and biology. *Natural Product Reports*. 2009. 26 (10): 1241–1250. DOI: 10.1039/b808333a.
7. Song P.-P., Zhao J., Liu Z.-L., Duan Ya.-B., Hou Yi.-P., Zhao Ch.-Q., Wu M., Wei M., Wang N.-H., Lv Ye., Han Z.-J. Evaluation of antifungal activities and structure-activity relationships of coumarin derivatives. *Pest Management Science*. 2017; 73 (1): 94–101. DOI: 10.1002/ps.4422.
8. Курбанова Ф.К., Серкерев С.В. Этерифицированные дигидрофурокумарины корней *Seseli transcasicica* (Apiaceae). *Растительные ресурсы*. 2012; 48 (2): 228–233.
9. Brumbarova T., Bauer P., Ivanov R. Molecular mechanisms governing *Arabidopsis iron* uptake. *Trends in Plant Science*. 2015; 20 (2): 124–133. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.11.004.
10. Tomasz K., Rafał P., Monika S. Natural and synthetic coumarins and their pharmacological activity. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2017; 15 (2): 169–175. DOI: 10.15584/ejcem.2017.2.12.
11. Парфёнов Э.А., Трапков В.А., Шабанов П.Д. Редокс-регуляция как надежная платформа поиска и разработки лекарств нового типа. Поиск гастропротекторов среди замещенных кумаринов. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014; 12 (4): 22–42.
12. Аракчаа К.Д., Николаев С.М., Салчак С.М., Разуваева Я.Г., Николаева И.Г., Торопова А.А., Николаева Г.Г. Способ получения средства, обладающего гастропротективной, противовоспалительной, антиоксидантной активностью. Патент на изобретение № 2679310. Заявка № 2018110207 от 22.03.2018. МПК А61К36/23 (2006.01). Опубликовано: 07.02.2019 Бюл. № 4.
13. Багинская А.И., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Воскобейникова Е.Н., Сидельников Н.И. Экспериментальные модели эрозивно-язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки. М.: Издательский дом «Русский врач», 2017: 96.
14. Ibrar A., Shehzadi S.A., Khan I. Developing hybrid molecule therapeutics for diverse enzyme inhibitory action: active role of coumarin-based structural leads in drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018; 26 (13): 3731–3762. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.05.042.
15. Chauhan S., Devi U., Kumar V.R., Anwar F., Kaithwas G. Dual inhibition of arachidonic acid pathway by mulberry leaf extract. *Journal Inflammopharmacology*. 2015; 23 (1): 65–70. DOI: 10.1007/s10787-014-0223-y.
16. Cheriyan B.V., Kadhivelu P., Nadipelly J., Shanmugasundaram J., Sayeli V., Subramanian V. Anti-nociceptive effect of 7-methoxy coumarin from *Eupatorium triplinervevahl* (Asteraceae). *Pharmacogn Magazine*. 2017; 13 (49): 81–84. DOI: 10.4103/0973-1296.197650.
17. Barot Kuldipsinh P., Jain Shailesh V., Kremer L., Singh S. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. *Medicinal Chemistry Research*. 2015; 24 (7): 2771–2798. DOI: 10.1007/s00044-015-1350-8.

Вклад авторов

Салчак С.М., Торопова А.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Разуваева Я.Г., Аракчаа К.Д. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Оленников Д.Н., Николаева И.Г. – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания.

Сведения об авторах

Салчак Сайзана Михайловна, аспирант, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ. ORCID 0000-0001-6244-9506.

Разуваева Янина Геннадьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ. ORCID 0000-0001-7829-1424.

Торопова Анюта Алексеевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ. ORCID 0000-0003-2618-7777.

Аракчаа Кара-кыс Донгаковна, канд. хим. наук, доцент, директор, НИИ МСПУ РТ, г. Кызыл. ORCID 0000-0002-5128-8898.

Оленников Даниил Николаевич, д-р фарм. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория медико-биологических исследований, ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ. ORCID 0000-0001-8194-1061.

Николаева Ирина Геннадьевна, д-р фарм. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ. ORCID 0000-0002-3476-1014.

(✉) **Салчак Сайзана Михайловна**, e-mail: saizana_salchak@mail.ru.

Поступила в редакцию 06.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток

Сметаненко Е.А.¹, Леплина О.Ю.¹, Тихонова М.А.¹, Пасман Н.М.², Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (ННИГУ)
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Недавние исследования выявили иммуносупрессивные свойства фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и его ключевую роль в опухоль-индуцированной иммуносупрессии. Плацентарный фактор роста (PlGF) является еще одним представителем семейства VEGF, резкое возрастание которого ассоциировано с эффективной иммунной адаптацией при успешной беременности, тогда как низкие концентрации PlGF являются предиктором гестационных осложнений на фоне активации иммунной системы. Ранее нами показано, что активированные Т-клетки экспрессируют рецепторы VEGF 1-го типа (VEGFR-1) и PlGF через связывание с VEGFR-1 ингибирует пролиферацию Т-клеток.

Цель. Дальнейшее изучение влияния PlGF на Т-клеточный ответ *in vitro*.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови здоровых доноров стимулировали моноклональными анти-CD3-антителами (α-CD3) в отсутствие и присутствии рекомбинантного PlGF и оценивали продукцию интерлейкина-10 (IL-10), уровень апоптоза и экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Результаты. Активация МНК α-CD3 в присутствии PlGF приводила к возрастанию относительного содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-10. Кроме того, PlGF усиливал апоптоз активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов, не влияя значимо на уровень программированной клеточной гибели CD4⁺ Т-клеток. Характерно, что активация Т-клеток α-CD3 в присутствии PlGF сопровождалась возрастанием PD-1 экспрессирующих клеток в субпопуляции CD8⁺ Т-клеток и Tim-3-экспрессирующих клеток среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, а также повышением уровня экспрессии PD-1 и Tim-3 на Т-клетках.

Заключение. PlGF способен ингибировать Т-клеточный ответ посредством усиления продукции IL-10 и активационно-индуцированного апоптоза CD8⁺ Т-клеток, а также экспрессии ингибиторных рецепторов. Учитывая повышенный уровень PlGF при физиологической беременности и его снижение при гестационных осложнениях, полученные данные позволяют предполагать, что ингибиторный эффект PlGF на Т-клеточный ответ может являться еще одним механизмом, обеспечивающим защиту плода от иммунной системы матери.

Ключевые слова: PlGF, Т-клетки, апоптоз, IL-10, ингибиторные рецепторы, PD-1, CTLA-4, Tim-3.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области (проект № 18-44-540005р-а).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 107 от 15.06.2018).

Для цитирования: Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Фактор роста плаценты модулирует ответ активированных *in vitro* Т-клеток. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 158–166. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-158-166>.

Placental growth factor exerts modulatory effects on *in vitro* activated T cells

Smetanenko E.A.¹, Leplina O.Yu.¹, Tikhonova M.A.¹, Pasman N.M.², Ostanin A.A.¹, Chernykh E.R.¹

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

² Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University
2, Pirogova Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Recent studies demonstrated immunosuppressive properties of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and identified VEGF-A as a key mediator of tumor-induced immunosuppression. Placental growth factor (PlGF) is another member of VEGF family in which dramatic elevation is associated with effective immune adaptation in successful pregnancy, whereas low concentrations are related to pregnancy complications resulting from the activation of immune system. Previously, we have shown that activated T cells express VEGF receptor type 1 (VEGFR-1), and PlGF inhibits T cell proliferation in VEGFR-1–dependent manner.

The aim of the present study was to further characterize PlGF effects on T cell responses *in vitro*.

Materials and methods. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were stimulated with anti-CD3 monoclonal antibodies (a-CD3) in the absence or presence of PlGF and assessed for IL-10 production, programmed cell death and the expression of inhibitory receptors (PD-1, CTLA-4, Tim-3) in CD4+ and CD8+ T cell subsets.

Results. The addition of PlGF to PBMC cultures activated with a-CD3 resulted in increased percentages of IL-10-producing CD4+ and CD8+ T cells. Besides, PlGF promoted CD8+ T cells apoptosis while did not affect programmed cell death within CD4+ T cells. Notable, T cell activation with a-CD3 in the presence of PlGF was accompanied by the enhancement of PD-1-expressing cells in CD8+ T cell subset and Tim-3-expressing cells in both CD4+ and CD8+ T cells, and by the increased expression of PD-1 and Tim-3 on T cells.

Conclusion. Our *in vitro* findings indicate that PlGF can inhibit T cell responses due to the increasing interleukin-10 (IL-10) production, promoting CD8+ T cell apoptosis and enhancing the expression of PD-1 and Tim-3 inhibitory receptors. Given the elevated levels of PlGF in successful pregnancy and its decrease in gestation complications, the obtained data also suggest that PlGF-mediated suppression may be implicated into the governing immune evasion in pregnancy.

Key words: PlGF, T cells, apoptosis, IL-10, inhibitory receptors, PD-1, CTLA-4, Tim-3.

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

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of Novosibirsk region (Project No. 18-44-54005r-a).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee of RIFCI (Protocol No. 107 of 15.06.2018).

For citation: Smetanenko E.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Pasman N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Placental growth factor exerts modulatory effects on *in vitro* activated T cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 158–166. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-158-166>.

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) играют ключевую роль в формировании новых сосудов в норме и при патологии. Наиболее активным и изученным членом этого семейства является VEGF-A, который опосредует проангиогенную активность через активацию двух рецепторов с тирозин-киназной активностью – VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1) [1]. Другим фактором с выраженной проангиогенной активностью является фактор роста плаценты (PlGF), который связывается исключительно с VEGFR-1 [2, 3].

Недавние исследования показали, что наряду с проангиогенными свойствами VEGF-A обладает иммуномодулирующим действием, индуцирует накопление регуляторных Т-клеток и миелоидных супрессорных клеток, ингибирует созревание дендритных клеток (ДК) и функции Т-клеток [4] и является ключевым фактором опухоль-индуцированной иммуносупрессии [5]. Иммуномодулирующие эффекты PlGF исследованы в значительно меньшей степени. Известно, что PlGF стимулирует поляризацию макрофагов в M2 направлении, подавляет созревание ДК, а также индуцирует регуляторные В-клетки [3, 6]. Однако влияние PlGF на функции Т-клеток остается неисследованным. Согласно данным литературы, эффект VEGF на Т-лимфоциты опосредуется через VEGFR-2 [7]. В то же время PlGF является селективным лигандом для VEGFR-1, роль которого в регуляции функциональной активности Т-клеток остается неясной.

Изучение иммуномодулирующих свойств PlGF мотивировано возможным участием фактора в ускользании опухоли от иммунного надзора, поскольку повышенный уровень PlGF при большинстве форм рака ассоциирован с дисфункциями иммунных клеток и коррелирует с опухолевой прогрессией [8, 9]. Еще больший интерес вызывает изучение иммуномодулирующей активности PlGF при беременности, которая сопровождается резким возрастанием уровня сывороточного PlGF при физиологическом течении и снижением концентрации PlGF при развитии гестационных осложнений [10].

При беременности иммунная система претерпевает существенную перестройку (так называемую иммунную адаптацию) [11], которая направлена на индукцию толерантности к аллоантигенам плода и предупреждение избыточных воспалительных реакций. Механизмы, лежащие в основе иммунной адаптации, включают деплецию аллоантиген-реактивных Т-клеток, Th1→Th2 переключение и индукцию регуляторных Т-лимфоцитов [11]. Недавние исследования продемонстрировали также роль Т-клеточного истощения в подавлении цитотоксической активно-

сти материнских Т-лимфоцитов [12, 13]. С этой точки зрения иммуномодулирующая активность PlGF может представлять один из механизмов, посредством которого развивающийся плод избегает реакций отторжения со стороны иммунной системы матери.

Недавно нами показано, что активированные Т-лимфоциты экспрессируют VEGFR-1 и связывание PlGF с VEGFR-1 в культурах моноклеарных клеток ингибирует пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [14]. Целью настоящей работы стало дальнейшее изучение влияния PlGF на Т-клеточный ответ *in vitro*, а именно на продукцию Т-клетками иммуносупрессорных цитокинов (интерлейкина-10, IL-10), апоптоз Т-лимфоцитов и экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3), опосредующих Т-клеточное истощение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 35 здоровых доноров крови обоего пола в возрасте 20–54 лет. Моноклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,078$). МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640, дополненной 10%-й инактивированной сывороткой доноров АВ (IV) группы, 2 мМ HEPES-буфера, 0,3 мг/мл глутамина (все реактивы – производства Sigma-Aldrich, США) и гентамицином (100 мкг/мл) при температуре 37 °С и содержании CO₂ на уровне 5%. Для стимуляции клеток использовали моноклональные анти-CD3 антитела (a-CD3, ICO-90, Медбио-спектр, г. Москва, Россия) в концентрации 1 мкг/мл, PlGF в концентрации 0,1–100 нг/мл (R&D System, США). Интенсивность пролиферации оценивали на 5-е сут по включению ³H-тимидина (1 мкКю/луночка), вносимого за 18 ч до окончания культивирования с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика SL-30 (Intertech, Франция).

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние нейтрализующих анти-VEGFR-1 антител (a-VEGFR-1) на супрессорный эффект PlGF. Для этого в культуры МНК, стимулированные a-CD3, добавляли PlGF (5 нг/мл) и выращивали в отсутствие и присутствии нейтрализующих a-VEGFR-1 или a-VEGFR-2 антител (Human VEGFR1/Flt-1; VEGFR2/KDR/Flk-1 антитела 2,5 мкг/мл; R&D System, США), вносимых совместно с PlGF либо через 24 ч после начала культивирования.

Продукцию IL-10 оценивали по относительному содержанию IL-10-секретирующих клеток в гейтах CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии (BD FACSCalibur) с использовани-

ем а-CD3(PE), CD8+(FITC), CD4(PerCP), IL-10(PE) антител (BD Biosciences, США) в 48-часовых культурах МНК, активированных а-CD3 в отсутствие и присутствии PlGF. Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов с помощью набора растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией (BD Biosciences, США). Анализ проводили в пробах после накопления не менее 30 тыс. событий в регионе Т-клеток.

Апоптоз активированных Т-клеток оценивали цитофлуориметрически. МНК, стимулированные а-CD3 (1 мкг/мл), культивировали в присутствии или отсутствии PlGF (5 нг/мл). Через 48 ч культивирования МНК метили анти-CD4(FITC) или анти-CD8(FITC) антителами (BD Biosciences, США) и затем Annexin V/7-ADD (PE-conjugated Annexin V/7-ADDkit) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. В каждом образце оценивали 10 тыс. событий. Процентное содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток, позитивных по аннексину V и (или) 7-ADD, измеряли, используя программное обеспечение CellQuest (BD Biosciences, США).

Экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на Т-клетках оценивали цитофлуориметрически, используя анти-CD4(PE), анти-CD8(FITC), анти-CTLA-4(PE-Cy5), анти-PD-1(APC), анти-TIM-3(PerCP/Cy5.5) и соответствующие контрольные изотип-специфические антитела (BD PharMingen, США). Относительное содержание и среднюю интенсивность флуоресценции (MIF) PD-1, CTLA-4, Tim-3 оценивали в гейтах CD4+ и CD8+ Т-клеток. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1-Q_3]$. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического W -критерия Вилкоксона для зависимых выборок с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибиторный эффект PlGF на а-CD3-активированные Т-клетки является VEGF-независимым. Ранее нами показано, что блокирование VEGFR-1 отменяет супрессорный эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток в а-CD3-стимулированных культурах МНК [14]. Это позволило предположить, что PlGF оказывает прямой ингибирующий эффект на Т-клетки через связывание с VEGFR-1. В то же

время известно, что PlGF способен активировать МНК к продукции VEGF [15], который также может ингибировать пролиферацию Т-клеток [7]. Согласно данным литературы, супрессорный эффект VEGF проявляется с 7-х сут и требует концентраций VEGF [7], существенно превышающих уровень продукции VEGF в культурах МНК [15].

Для того чтобы полностью исключить участие VEGF в реализации ингибиторного эффекта PlGF, мы сравнили блокирующий эффект а-VEGFR-1 и а-VEGFR-2 на супрессорную активность PlGF. Учитывая низкий уровень экспрессии VEGFR на нестимулированных Т-клетках и существенное их возрастание в течение суток, блокирующие антитела добавляли в двух режимах: вместе с PlGF и через 24 ч после начала культивирования (рис. 1).

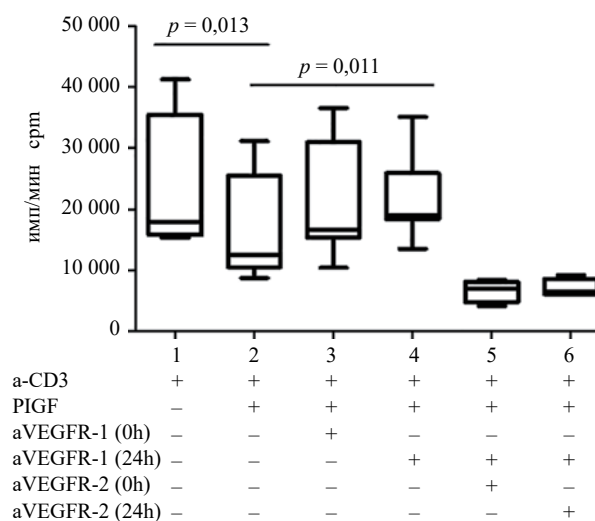


Рис. 1. Нейтрализующие а-VEGFR-1 антитела отменяют ингибиторный эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток: МНК стимулировали а-CD3-антителами в отсутствие (1) и присутствии 5 нг/мл PlGF (2–6); нейтрализующие а-VEGFR-1 (3, 4) или а-VEGFR-2 (5, 6) антитела добавляли в дозе 2,5 мкг/мл одновременно с PlGF (3, 5) или через 24 ч от начала культивирования (4, 6), имп/мин, $Me [Q_1-Q_3]$, $Min-Max$, $n = 8$

Как видно из рис. 1, в присутствии PlGF уровень пролиферативного ответа Т-клеток на стимуляцию а-CD3-антителами снижался на 31% (26–38%; $p = 0,013$). Нейтрализующие а-VEGFR-1 антитела снижали супрессорный эффект PlGF до 9% (3–25%) при добавлении совместно с фактором и до 3% (0–16%) – при добавлении через 24 ч от начала культивирования. Более выраженное подавление супрессорной активности PlGF в данном случае было, по-видимому, связано с более высокой экспрессией VEGFR-1 на Т-клетках через 24 ч после анти-CD3-стимуляции. В то же время блокирование VEGFR-2 не отменяло супрессорный эффект PlGF.

Влияние *PLGF* на продукцию *IL-10* α -*CD3*-активированными *CD4+* и *CD8+* Т-клетками. Для оценки влияния *PLGF* на способность Т-клеток продуцировать *IL-10*, исследовали относительное содержание *CD4+* и *CD8+* Т-клеток с внутриклеточным содержанием *IL-10* в культурах, α -*CD3*-стимулированных МНК в отсутствие и присутствии *PLGF* (рис. 2).

Активация МНК α -*CD3* сопровождалась увеличением относительного содержания *IL-10+* клеток в субпопуляции *CD8+* Т-лимфоцитов ($p = 0,028$). Прирост количества *IL-10*-продуцирующих клеток среди *CD4+* Т-лимфоцитов отмечался также у большей части обследованных доноров, хотя эти изменения не были статистически значимы ($p = 0,06$).

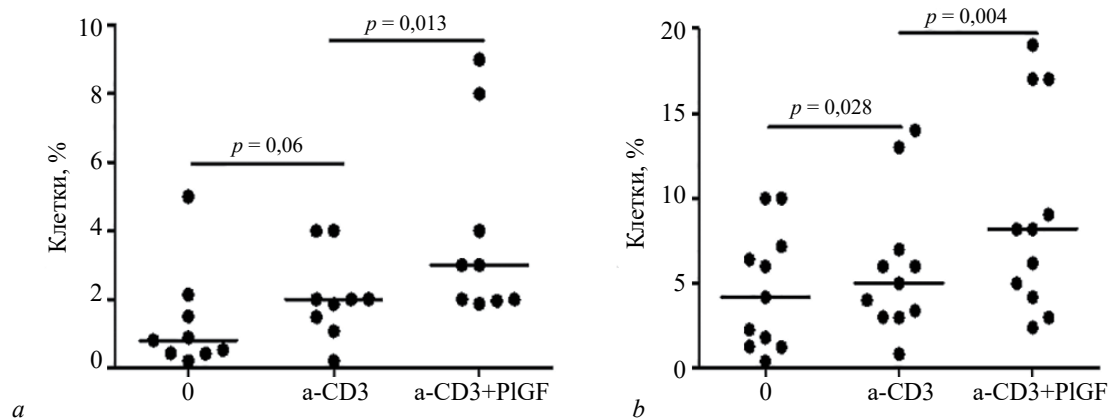


Рис. 2. *PLGF* повышает внутриклеточную *IL-10* экспрессию *CD4+* (a) и *CD8+* (b) Т-лимфоцитами: МНК культивировали в среде (0) или стимулировали α -*CD3* в отсутствие (α -*CD3*) и присутствии 5 нг/мл *PLGF* (α -*CD3*+*PLGF*). Через 48 ч культивирования оценивали внутриклеточную экспрессию *IL-10* в субпопуляциях *CD4+* и *CD8+* Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии. Данные представлены в виде индивидуальных значений и *Me*, $n = 9-11$

Добавление в культуры *PLGF* приводило к возрастанию доли *IL-10+* клеток как среди *CD4+*, так и *CD8+* Т-лимфоцитов по сравнению с МНК стимулированными α -*CD3*-антителами в отсутствие *PLGF*. При этом относительное количество *CD8+IL-10+* Т-клеток в культурах МНК, содержащих *PLGF*, в 2,7 раза превышало количество *CD4+IL-10+* Т-клеток ($p = 0,018$).

PLGF усиливает апоптоз α -*CD3*-активированных Т-клеток. Для оценки возможного участия *PLGF* в регуляции программированной клеточной гибели исследовали влияние фактора на уровень активационно-индуцированного апоптоза *CD4+* и *CD8+* Т-лимфоцитов. Для идентификации апоптотических

и некротических клеток использовали трехцветную проточную цитофлуориметрию. Клетки в состоянии раннего апоптоза не включают ядерный краситель (7-ADD) и определяются как $\text{Ann}^+/7\text{ADD}^-$. Клетки в состоянии позднего апоптоза или некроза, включающие ядерный краситель, идентифицируются как $\text{Ann}^+/7\text{ADD}^+$. В популяции свежее выделенных МНК большинство *CD4+* и *CD8+* Т-клеток были жизнеспособными ($\text{Ann}^-/7\text{ADD}^-$) и содержали очень низкое количество апоптотических клеток. 48-часовая активация МНК α -*CD3*-антителами сопровождалась возрастанием уровня апоптоза в субпопуляциях *CD4+* и *CD8+* Т-клеток (рис. 3).

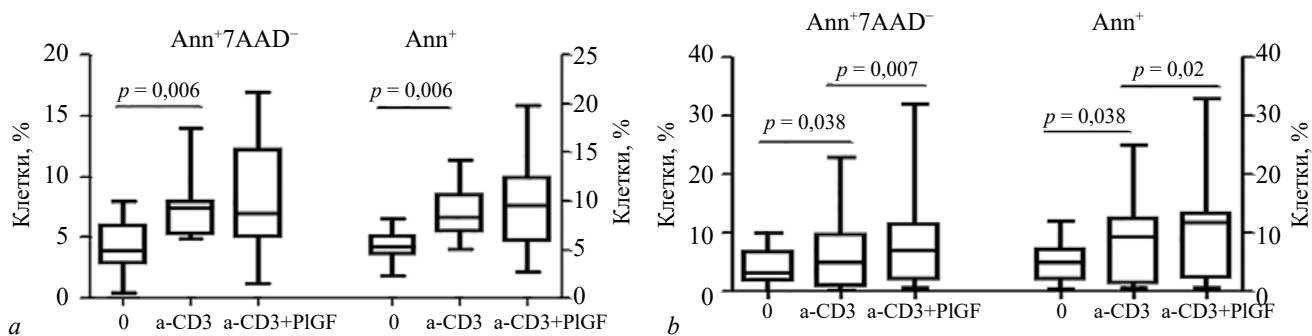


Рис. 3. *PLGF* усиливает апоптоз α -*CD3*-активированных *CD8+* Т-клеток: представлены суммированные данные относительного содержания клеток в стадии раннего апоптоза ($\text{Ann}^+/7\text{AAD}^-$) и общего количества апоптотических клеток (AnnV^+) в гейтах *CD4+* (a) и *CD8+* (b) Т-лимфоцитов. Данные четырех независимых экспериментов проанализированы с помощью парного критерия Вилкоксона, $n = 10$

Т а б л и ц а

Влияние PlGF на экспрессию чек-пойнт молекул на а-CD3-активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, $Me [Q_1-Q_3]$, $n = 8$

МНК	CD4+ Т-клетки, %			CD8+ Т-клетки, %		
	PD-1	CTLA-4	Tim-3	PD-1	CTLA-4	Tim-3
0	3,7 [2,2–4,3]	4,6 [2,1–7,1]	2,9 [2,0–3,6]	2,3 [1,6–2,8]	0,4 [0,1–0,8]	0,7 [0,1–1,6]
а-CD3	6,0* [3,0–8,5]	7,0* [2,4–10,2]	3,7* [2,7–5,3]	3,2* [2,4–4,2]	0,3 [0,1–0,7]	2,4* [1,6–3,2]
а-CD3+PlGF	5,5* [4,5–8,1]	7,3* [4,2–10,0]	5,0*# [3,3–6,6]	3,8*# [2,9–4,5]	0,5 [0,3–0,7]	5,1*# [3,3–6,1]

Примечание. Относительное содержание PD-1, CTLA-4 и Tim-3-позитивных клеток в гейтах CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов оценивали в 48-часовых культурах нестимулированных МНК (0) и МНК, активированных анти-CD3-антителами в отсутствие (а-CD3) и присутствии 5 нг/мл PlGF (а-CD3+PlGF).

* $p < 0,05$ – по сравнению с нестимулированными МНК; # $p < 0,05$ – по сравнению с а-CD3-активированными МНК.

Добавление в культуры PlGF приводило к усилению апоптоза CD8+ Т-клеток ($p < 0,05$), не влияя на уровень гибели CD4+ Т-лимфоцитов. Поскольку количество $Ann^+/7ADD^-$ клеток отражает только проксимальные (ранние) события апоптотического процесса, дополнительно проанализировали общее количество Ann^+ Т-клеток ($Ann^+/7ADD^{-/+}$). Относительное содержание Ann^+CD8^+ Т-лимфоцитов среди МНК, активированных а-CD3 в присутствии PlGF, было выше, чем в контрольных а-CD3-стимулированных культурах. В то же время различий в содержании $AnnV+CD4^+$ Т-клеток в присутствии и отсутствие PlGF не наблюдалось.

PlGF повышает экспрессию ингибиторных рецепторов на активированных Т-клетках. Повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов (также получивших название ингибиторных чек-пойнт молекул) рассматривается в качестве важного механизма ограничения Т-клеточного ответа вследствие Т-клеточного истощения [12]. Чтобы оценить влияние PlGF на экспрессию ингибиторных рецепторов, исследовали экспрессию PD-1, CTLA-4 и Tim-3 на CD4+ и CD8+ Т-клетках в 48-часовых культурах МНК (таблица).

Стимуляция МНК а-CD3 приводила к возрастанию доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих чек-пойнт молекулы. Так, относительное количество CD4+PD-1+ и CD8+PD-1+ Т-клеток в ответ на анти-CD3-стимуляцию статистически значимо превышало их содержание среди нестимулированных МНК. При этом добавление в культуру PlGF увеличивало число PD-1-позитивных CD8+ Т-клеток ($p < 0,05$), но не оказывало такого эффекта в отношении CD4+PD-1+ Т-лимфоцитов. Связывание Т-клеточных рецепторов с а-CD3-антителами приводило к возрастанию доли CD4+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих CTLA-4, однако PlGF не оказывал влияния на количество CTLA-4-экспрессирующих CD4+ или CD8+ Т-клеток. Относительно экспрессии Tim-3, а-CD3-стимуляция также повышала долю Tim-3-позитивных клеток в субпопуляциях CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, при этом в присутствии PlGF количе-

ство как CD4+Tim3+, так и CD8+Tim3+ Т-лимфоцитов статистически значимо увеличивалось ($p < 0,05$).

Важно отметить, что PlGF не только повышал долю PD-1- и Tim-3-позитивных Т-клеток, но и усиливал экспрессию указанных рецепторов на Т-клетках. Так, в присутствии PlGF средняя интенсивность флуоресценции PD-1 на CD4+ Т-клетках возрастала с $(37,1 \pm 3,5)$ до $(47,8 \pm 5,8)$, а в субпопуляции CD8+ Т-клеток – с $(38 \pm 3,3)$ до $(47,0 \pm 4,1)$ ($p < 0,05$). Средняя интенсивность флуоресценции Tim-3 под действием PlGF возрастала на CD4+ Т-клетках с $(41,0 \pm 4,2)$ до $(49,0 \pm 4,9)$ и на CD8+ Т-клетках – с $(44,0 \pm 4,5)$ до $(49,0 \pm 5,3)$ ($p < 0,05$). Таким образом, присутствие в культуре PlGF приводило к умеренному, но статистически значимому возрастанию уровня экспрессии PD-1 и Tim-3 на CD4+ и CD8+ Т-клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные показали, что ингибирующий эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток в а-CD3-стимулированных культурах МНК реализуется через VEGFR-1 и не связан с возможным усилением продукции VEGF активированными МНК [15], поскольку блокирование VEGFR-2 не отменяло супрессорный эффект PlGF. Установлено также, что PlGF повышает продукцию IL-10 активированными CD4+ и CD8+ Т-клетками, усиливает апоптоз CD8+ Т-клеток и повышает экспрессию ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, что свидетельствует о важной роли PlGF/VEGFR-1 сигнального пути в модуляции Т-клеточных функций.

Согласно данным литературы, VEGFR-1 обладает низкой тирозинкиназной активностью, что долгое время позволяло рассматривать VEGFR-1 исключительно как рецептор-ловушку [2]. Однако позже выяснилось, что данный рецептор экспрессируется гемопоэтическими предшественниками, моноцитами/макрофагами и ДК и VEGFR-1 сигнальный путь вовлечен в процессы мобилизации костномозговых предшественников, активации и миграции моноцитов, регуляцию созревания ДК и клеточной пролиферации [3, 16, 17]. Более того, недавние исследования показали, что сигналинг

через VEGFR-1 в гипоксических условиях активирует STAT3 [8], который играет важную роль в регуляции Т-клеточных функций, ингибируя пролиферацию Т-лимфоцитов и их способность продуцировать IL-2 [18]. Эти факты согласуются с нашими данными об ингибирующем эффекте PlGF на пролиферацию Т-клеток через связывание с VEGFR-1.

Одним из выявленных эффектов PlGF явилось стимулирующее действие данного фактора на продукцию IL-10 активированными Т-клетками. Y.L. Lin и соавт. продемонстрировали способность PlGF модулировать цитокин-секреторную функцию Т-клеток опосредованно через ДК. Так, в смешанной культуре лейкоцитов PlGF-модифицированные ДК усиливали продукцию аллогенными Т-клетками IL-13 и IL-5, но при этом не влияли на секрецию IL-10 [6]. Эти данные подчеркивают различия между прямым и ДК-опосредованным действием PlGF.

J.Y. Shin и соавт. описали усиление продукции IL-10 при активации VEGFR-1 на Т-клетках селезенки и линии CD4+ Т-лимфоцитов в результате связывания с VEGF [19], что подтверждает способность VEGFR-1 опосредовать прямой эффект на Т-клетки. Однако авторы не выявили подавления пролиферации Т-клеток при активации VEGFR-1. По-видимому, этот факт объясняется тем, что PlGF и VEGF могут оказывать различные эффекты при связывании с VEGFR-1 в силу активации различных транскрипционных факторов [17].

Как известно, IL-10 является ключевым иммуносупрессорным цитокином, участвующим в ограничении иммунного ответа и индукции толерантности при беременности [20]. Супрессорный эффект IL-10 реализуется через генерацию толерогенных ДК, индукцию регуляторных Т-клеток и активацию JAK1/STAT3 сигнального пути в Т-лимфоцитах [21]. Ингибирующее действие IL-10 наиболее четко продемонстрировано в отношении CD4+ Т-клеток, в которых эндогенная продукция данного цитокина является важным регуляторным механизмом ограничения функций CD4+ Т-лимфоцитов [22].

Влияние IL-10 на функции CD8+ Т-клеток не так однозначно. При опухолевом росте IL-10 может активировать и стимулировать экспансию цитотоксических CD8+ Т-клеток [23], тогда как при хронической инфекции описан прямой ингибирующий эффект IL-10 на CD8+ Т-лимфоциты [24]. Полученные нами результаты свидетельствуют о способности PlGF усиливать продукцию IL-10 не только в популяции CD4+, но и CD8+ Т-клеток. Однако является ли повышенная продукция IL-10 причиной подавления пролиферации Т-клеток и, особенно, CD8+ Т-клеток в присутствии PlGF, остается открытым и требует дальнейших исследований.

Другим важным результатом работы являются данные о способности PlGF усиливать апоптоз CD8+ Т-клеток и экспрессию на Т-клетках ингибиторных рецепторов (PD-1 и Tim-3). Способность PlGF модулировать уровень апоптоза была недавно продемонстрирована в модели эмфиземы легких [25]. Авторы показали, что PlGF повышает апоптоз легочного эпителия через активацию c-JunN-терминальной киназы и протеин киназы С. В нашем исследовании впервые показано, что PlGF усиливает апоптоз активированных CD8+ Т-клеток.

Поскольку PlGF также стимулировал возрастание доли PD-1+ клеток, причем только в субпопуляции CD8+, но не CD4+ Т-лимфоцитов, мы предположили, что усиление апоптоза CD8+ Т-клеток может быть связано с повышенной экспрессией PD-1. Роль ингибиторного рецептора PD-1 в подавлении функций цитотоксических Т-клеток убедительно продемонстрирована при раке [26], а недавно выявлена и при беременности [27]. Сигналинг через PD-1 оказывает ингибиторный эффект на Т-лимфоциты через различные механизмы, включая индукцию апоптоза [28]. Кроме того, повышенная экспрессия ингибиторных чек-пойнт молекул может отражать состояние Т-клеточного истощения [12].

Нами показано также, что наряду с молекулой PD-1 PlGF стимулировал увеличение числа Tim-3-позитивных клеток, причем как в CD8+, так и CD4+ субпопуляциях Т-лимфоцитов. Tim-3 является еще одной чек-пойнт молекулой, которая вовлечена в Т-клеточное истощение и играет важную роль в ослаблении иммунного ответа матери на аллоантигены плода при успешной беременности [29]. Т. Voron и соавт. впервые продемонстрировали способность VEGF-A усиливать через VEGFR-2 сигнальный путь экспрессию различных ингибиторных чек-пойнт молекул (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на CD8+ Т-клетках мышей-опухоленосителей [30]. Авторы также обнаружили одновременную экспрессию нескольких ингибиторных рецепторов на CD8+ Т-клетках в присутствии высоких концентраций VEGF.

Полученные нами результаты показали стимулирующее действие ангиогенных факторов на экспрессию чек-пойнт молекул на Т-лимфоцитах человека и, в частности, способность PlGF усиливать экспрессию PD-1 и Tim-3 на Т-клетках. Причем если стимулирующий эффект PlGF в отношении PD-1 отмечался только в популяции CD8+ Т-клеток, то эффект PlGF на экспрессию Tim-3 выявлялся в обеих (CD4+ и CD8+) субпопуляциях Т-клеток. К сожалению, нами не было проведено анализа ко-экспрессии ингибиторных рецепторов, что является ограничением исследования. Тем не менее увеличение доли CD8+ Т-клеток, экс-

прессурирующих как минимум два типа ингибиторных рецепторов (PD-1 и Tim-3), ассоциированное со снижением пролиферации CD8⁺ Т-клеток в присутствии PlGF, позволяет предполагать, что появление чек-пойнт молекул на поверхности Т-клеток может опосредовать ингибирующий эффект PlGF на Т-клетки.

Полученные данные позволяют рассматривать PlGF в качестве нового иммунного модулятора при беременности. Концентрация PlGF в сыворотке крови при нормальной беременности прогрессивно возрастает, в то время как снижение уровня PlGF при гипоксии плаценты является предиктором преэклампсии и задержки роста плода [10]. Несмотря на высокую прогностическую значимость уровня PlGF, патофизиологическое значение этого фактора до конца не осмыслено. Учитывая важную роль иммунной адаптации при успешной беременности и выраженные иммунные нарушения у женщин с преэклампсией [31, 32], разумно предположить, что PlGF причастен к иммунной модуляции при физиологической беременности, а снижение уровня этого фактора способствует активации иммунной системы и развитию гестационных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, PlGF повышает продукцию IL-10 активированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, усиливает апоптоз CD8⁺ Т-лимфоцитов и повышает экспрессию ингибиторных рецепторов PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, что свидетельствует о важной роли PlGF/VEGFR-1 сигнального пути в модуляции Т-клеточных функций. Учитывая повышенный уровень PlGF при физиологической беременности и его снижение при гестационных осложнениях, полученные данные позволяют предполагать, что ингибиторный эффект PlGF на Т-клеточный ответ может являться еще одним механизмом, обеспечивающим защиту плода от иммунной системы матери.

ЛИТЕРАТУРА

- Stuttfield E., Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 2009; 61 (9): 915–922. DOI: 10.1002/iub.234.
- De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med*. 2012; 44 (1): 1–9. DOI: 10.3858/emm.2012.44.1.025.
- Dewerchin M., Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb. Perspect Med*. 2012; 2 (8): a011056. DOI: 10.1101/cshperspect.a011056.
- Voron T., Marcheteau E., Pernot S., Colussi O., Tartour E., Taieb J., Terme M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol*. 2014; 4: 70. DOI: 10.3389/fonc.2014.00070.
- Lapeyre-Prost A., Terme M., Pernot S., Pointet A.L., Voron T., Tartour E., Taieb J. Immunomodulatory activity of VEGF in cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 2017; 330: 295–342. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.007.
- Lin Y.L., Liang Y.C., Chiang B.L. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol*. 2007; 82 (6): 1473–1480. DOI: 10.1189/jlb.0307164.
- Ziogas A., Gavalas N., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Terpos E., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Antsaklis A., Dimopoulos M., Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int. J. Cancer*. 2012; 130 (4): 857–864. DOI: 10.1002/ijc.26094.
- Albonici L., Giganti M., Modesti A., Manzari V., Bei R. Multifaceted role of the placental growth factor (PlGF) in the antitumor immune response and cancer progression. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20 (12): e2970. DOI: 10.3390/ijms20122970.
- Meng F.-J., Xiao S.-X., Zhang Y., Wang W., Wang B., Fan X.-Y. Prognostic significance of placenta growth factor expression in patients with multiple cancers: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2015; 8 (8): 12726–12735.
- Lecarpentier É., Vieillefosse S., Haddad B., Fournier T., Leguy M., Guibourdenche J., Tsatsaris V. Placental growth factor (PlGF) and sFlt-1 during pregnancy: physiology, assay and interest in preeclampsia. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2016; 74 (3): 259–267. DOI: 10.1684/abc.2016.1158.
- Morelli S., Mandal M., Goldsmith L.T., Kashani B.N., Ponzio N.M. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*. 2015; 6: 171–189. DOI: 10.2147/RRR.S80652.
- Slutsky R., Romero R., Xu Y., Galaz J., Miller D., Done B., Tarca A.L., Gregor S., Hassan S.S., Leng Y., Gomez-Lopez N. Exhausted and senescent T cells at the maternal-fetal interface in preterm and term labor. *J. Immunol. Res*. 2019; 3128010. DOI: 10.1155/2019/3128010.
- Xu Y., Wang S., Lin Y., Li D., Du M. Tim-3 and PD-1 regulate CD8⁺ T cell function to maintain early pregnancy in mice. *J. Reprod. Dev*. 2017; 63 (3): 289–294. DOI: 10.1262/jrd.2016-177.
- Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А. Сигналинг через рецептор к фактору роста эндотелия сосудов 1-го типа как новый механизм подавления Т-клеток при опухолевом неоангиогенезе. *Медицинская иммунология*. 2019; 21 (4): 653–660. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-653-660.
- Bottomley M., Webb N., Watson C., Holt L., Bukhari M., Denton J., Freemont A., Brenchley P. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin. Exp. Immunol*. 2000; 119 (1): 182–188. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2000.01097.x.
- Dikov M., Ohm J., Ray N., Tchekneva E.E., Burlison J., Moghanaki D., Nadaf S., Carbone D.P. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol*. 2005; 174 (1): 215–222. DOI: 10.4049/jimmunol.174.1.215.
- Koch S., Tugues S., Li X., Gualandi L., Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J*. 2011; 437 (2): 169–183. DOI: 10.1042/BJ20110301.

18. Oh H., Yu C.R., Golestaneh N., Amadi-Obi A., Lee Y.S., Esconu A., Mahdi R.M., Ekwuagu C.E. STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (35): 30888–30897. DOI: 10.1074/jbc.M111.253500.
19. Shin J.Y., Yoon I.H., Kim J.S., Kim B., Park C.G. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. *Cell Immunol.* 2009; 256 (1–2): 72–78. DOI: 10.1016/j.cellimm.2009.01.006.
20. Mobini M., Mortazavi M., Nadi S., Zare-Bidaki M., Pourtalebi S., Arababadi M.K. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2016; 19 (2): 119–124.
21. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21 (5): 331–344. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
22. Jankovic D., Kugler D., Sher A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol.* 2010; 3 (3): 239–246. DOI: 10.1038/mi.2010.8.
23. Emmerich J., Mumm J.B., Chan I.H., LaFace D., Truong H., McClanahan T., Gorman D.M., Oft M. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research.* 2012; 72 (14): 3570–3581. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0721.
24. Smith L.K., Boukhaled G.M., Condotta S.A., Mazouz S., Guthmiller J.J., Vijay R., Butler N.S., Bruneau J., Shoukry N.H., Krawczyk C.M., Richer M.J. Interleukin-10 directly inhibits CD8+ T cell function by enhancing N-glycan branching to decrease antigen sensitivity. *Immunity.* 2018; 48 (2): 299–312; e5. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.01.006.
25. Hou H., Cheng S., Chung K., Wei S., Tsao P., Lu H., Wang H., Yu C. PlGF mediates neutrophil elastase-induced airway epithelial cell apoptosis and emphysema. *Respir. Res.* 2014; 15 (1): 106. DOI: 10.1186/s12931-014-0106-1.
26. Chiu Y.M., Tsai C.L., Kao J.T., Hsieh C.T., Shieh D.C., Lee Y.J., Tsay G.J., Cheng K.S., Wu Y.Y. PD-1 and PD-L1 up-regulation promotes T-cell apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2018; 38 (4): 2069–2078. DOI: 10.21873/anticancer.12446.
27. Meggyes M., Miko E., Szigeti B., Farkas N., Szereday L. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019; 19 (1): 74. DOI: 10.1186/s12884-019-2218-6.
28. Shi F., Shi M., Zeng Z., Qi R., Liu Z., Zhang J., Yang Y., Tien P., Wang F.S. PD-1 and PD-L1 up-regulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* 2011; 128 (4): 887–896. DOI: 10.1002/ijc.25397.
29. Banerjee H., Kane L.P. Immune regulation by Tim-3. *Front Immunol.* 2018; 9: 316. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00316.
30. Voron T., Colussi O., Marcheteau E., Pernot S., Nizard M., Pointet A., Latreche S., Bergaya S., Benhamouda N., Tanchot C., Stockmann C., Combe P., Berger A., Zinzindohoue F., Yagita H., Tartour E., Taieb J., Terme M. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J. Exp. Med.* 2015; 212 (2): 139–148. DOI: 10.1084/jem.20140559.
31. Laresgoiti-Servitje E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Leukoc. Biol.* 2013; 94 (2): 247–257. DOI: 10.1189/jlb.1112603.
32. Geldenhuys J., Rossouw T., Lombaard H., Ehlers M., Kock M. Disruption in the regulation of immune responses in the placental subtype of preeclampsia. *Front Immunol.* 2018; 9: 1659. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01659.

Вклад авторов

Черных Е.Р., Останин А.А. – разработка концепции и дизайна. Сметаненко Е.А., Леплина О.Ю. – культуральные работы. Тихонова М.А. – пробоподготовка для цитометрического анализа, цитометрический анализ проб. Леплина О.Ю., Пасман Н.М., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных. Останин А.А., Черных Е.Р. – подготовка текста статьи. Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Сметаненко Екатерина Александровна, аспирант, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Леплина Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-3169-8643.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-2366-1667.

Пасман Наталья Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, Институт медицины и психологии, ННИГУ, г. Новосибирск.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-6895-938X.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-2346-6279.

(✉) Черных Елена Рэмовна, e-mail: ct_lab@mail.ru.

Поступила в редакцию 11.12.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Особенности полиморбидной патологии у больных аутоиммунными буллезными дерматозами

Уфимцева М.А., Изможерова Н.В., Гурковская Е.П., Бочкарев Ю.М.

Уральский государственный медицинский университет (УГМУ)
Россия, 620028, г. Екатеринбург, ул. Ретина, 3

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить частоту выявления и структуру полиморбидной патологии у больных аутоиммунными буллезными дерматозами. Определить индекс полиморбидности Чарлсон и 10-летнюю выживаемость у больных до и после назначения глюкокортикостероидной терапии.

Материалы и методы. Исследование включало ретроспективный и проспективный этапы. На первом этапе проведен анализ первичной медицинской документации, 47 амбулаторных карт и 23 историй болезни больных старше 18 лет до дебюта аутоиммунного буллезного дерматоза. Учитывали клиничко-эпидемиологические данные, основной и сопутствующий диагнозы устанавливали в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Всем пациентам рассчитан индекс Чарлсон, определена 10-летняя выживаемость больных аутоиммунными буллезными дерматозами.

Результаты. Полиморбидная патология до дебюта аутоиммунного буллезного дерматоза зафиксирована у 81,4% больных. У 48,6% пациентов выявлено два и более сопутствующих заболевания. Наиболее часто диагностируются заболевания сердечно-сосудистой системы (первое ранговое место – 52,8%), затем патология желудочно-кишечного тракта (второе ранговое место – 41,4%), на третьем месте – эндокринопатии (20,0%). Медиана индекса Чарлсон у больных данной группы составила 2,5 (1–3), риск летального исхода за 10-летний период 16,5%. Впоследствии 65,7% пациентам, после дебюта аутоиммунного буллезного дерматоза, потребовалось назначение системных глюкокортикостероидов. Декомпенсация сопутствующей патологии диагностирована у 39,1% пациентов. Медиана индекса полиморбидности возросла до 3,5 (2–5), риск развития летального исхода увеличился до 34,5% ($p < 0,05$).

Заключение. Полиморбидная патология ухудшает течение и прогноз аутоиммунных буллезных дерматозов, увеличивает риск инвалидизации и смертности, в особенности у пациентов, получающих системную глюкокортикостероидную терапию, в связи с чем больные должны находиться на диспансерном учете не только у врача-дерматовенеролога, но и смежных специалистов.

Ключевые слова: аутоиммунные буллезные дерматозы, полиморбидность, индекс Чарлсон, глюкокортикостероиды.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии источника финансирования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом УГМУ (протокол № 10 от 16.12.2016).

Для цитирования: Уфимцева М.А., Изможерова Н.В., Гурковская Е.П., Бочкарев Ю.М. Особенности полиморбидной патологии у больных аутоиммунными буллезными дерматозами. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 167–173. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-167-173>.

Features of polymorbid pathology in patients with autoimmune bullous dermatosis

Ufimtseva M.A.¹, Izmozherova N.V.¹, Gurkovskaya E.P.¹, Bochkarev Yu.M.¹

¹ Ural State Medical University

3, Repin Str., Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

ABSTRACT

Autoimmune bullous dermatosis (ABD) is a group of inherited and acquired skin diseases, the main morphological elements of which are the bullas, developed as a result of autoantibody production directed against protein structures of the epidermis and dermo-epidermal junction, leading to epidermal detachment and blistering on the skin and mucous membranes.

The aim of the research is to analyze the detection rate and structure of polymorbid pathology in patients with autoimmune bullous dermatoses and to determine the Charlson index and 10-year viability in patients before and after prescription of glucocorticosteroid therapy.

Materials and methods. The research included retrospective and prospective stages. At the first stage, the analysis of primary medical records was carried out, and histories of 70 patients over 18 years old, before the onset of autoimmune bullous dermatosis were analyzed. Clinical and epidemiological data were taken into account, the main and concomitant diagnoses were determined in accordance with ICD X. The Charlson index was calculated for all patients, the 10-year viability rate of patients with autoimmune bullous dermatoses was determined.

Results. Polymorbid pathology was recorded in 81.4% of patients, before the onset of autoimmune bullous dermatosis. 48.6% of patients had two or more concomitant diseases. Among patients with diseases of internal organs, those with cardiovascular pathology (52.8%) occupied the first place, patients with gastroenteric pathology (41.4%) occupied the second place, patients with endocrinopathy held the third place (20.0%). The Charlson index median in patients of this group was 2.5 (1–3), the risk of fatal outcome over a 10-year period was 16.5%. Subsequently, after the onset of autoimmune bullous dermatosis, 65.7% of patients required the prescription of glucocorticosteroid therapy. Decompensation of concomitant pathology was diagnosed in 39.1% of patients, therefore they needed consultation of related specialists. The median polymorbidity index increased to 3.5 (2–5), the risk of a death increased to 34.5% ($p < 0.05$).

Conclusion. Polymorbid pathology worsens the course of autoimmune bullous dermatoses, increases the risk of disability and mortality, especially in patients receiving systemic glucocorticosteroid therapy, and therefore these patients should be under regular medical check-up not only of a dermatovenereologist, but also of related specialists.

Key words: autoimmune bullous dermatosis, polymorbidity, Charlson index, glucocorticosteroids.

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

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under the Ural State Medical University (Protocol No. 10 of 12.16.2016).

For citation: Ufimtseva M.A., Izmozherova N.V., Gurkovskaya E.P., Bochkarev Yu.M. Features of polymorbid pathology in patients with autoimmune bullous dermatosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 167–173. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-167-173>.

ВВЕДЕНИЕ

Аутоиммунные буллезные дерматозы (АБД) – группа наследственных и приобретенных заболеваний кожи, основным морфологическим элементом которых является пузырь, формирующийся в результате выработки аутоантител, направленных против различных структур дермоэпидермального соединения, приводящих к отслойке эпидермиса [1,

2]. К наиболее тяжелым АБД, приводящим к стойке утрате трудоспособности, а также смертности, относятся акантолитическая пузырчатка, буллезный пемфигOID Левера, герпетиформный дерматит Дюринга, приобретенный и врожденный буллезный эпидермолиз [3, 4].

В настоящее время смертность при АБД, несмотря на патогенетическое лечение системными глюкокортикостероидами (ГКС) и иммуносупрессан-

тами, сохраняется на высоком уровне (15,0–30,0%) [5, 6]. Прогноз заболевания также зависит от наличия сопутствующей полиморбидной патологии. За рубежом авторы отмечают высокий уровень ассоциации АБД с сахарным диабетом, гипотиреозом, воспалительными заболеваниями кишечника, а также приводят сведения о повышении риска развития инсультов у больных данной группы [7, 8]. Наличие полиморбидной патологии приводит к ухудшению состояния больных с АБД, неконтролируемому течению сопутствующих заболеваний и резистентности их к базисной терапии, ухудшению качества жизни и приверженности к медикаментозной терапии, повышению показателей инвалидизации и смертности больных [9].

Большинство исследований отечественных и зарубежных ученых сводятся к выявлению наиболее распространенных заболеваний у больных АБД и не включают оценку тяжести диагностированной полиморбидной патологии, что является актуальным, так как позволит спрогнозировать течение как самого АБД, так и сопутствующей патологии, определить риск летального исхода.

Цель исследования – изучить частоту выявления и структуру полиморбидной патологии у больных аутоиммунными буллезными дерматозами, определить индекс полиморбидности Чарлсон и 10-летнюю выживаемость у пациентов до и после назначения глюкокортикостероидной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало ретроспективный и проспективный этапы. На первом этапе проведен анализ первичной медицинской документации, 47 амбулаторных карт и 23 историй болезни больных старше 18 лет до дебюта аутоиммунного буллезного дерматоза. Учитывали клинко-эпидемиологические данные, основной и сопутствующий диагнозы устанавливали в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Полиморбидность регистрировали по количеству нозологий у одного больного. Для оценки соматической патологии определен индекс Чарлсон, представляющий собой сумму баллов за наличие определенных сопутствующих заболеваний и баллов, начисляемых за каждое десятилетие жизни при повышении пациентом 40-летнего возраста.

К заболеваниям, оценивающимся с помощью индекса Чарлсон, относятся сердечно-сосудистые заболевания, деменция, хронические заболевания легких, болезни соединительной ткани, язвенная болезнь, поражение печени, сахарный диабет, заболевания почек, печени, злокачественные новообразования,

синдром приобретенного иммунодефицита. При этом в зависимости от степени тяжести сопутствующих заболеваний количество начисляемых баллов может быть равно 1, 2, 3 и 6.

С помощью индекса Чарлсон прогнозировали 10-летнюю выживаемость больных аутоиммунными буллезными дерматозами. На втором этапе проведено клинко-инструментальное обследование данной группы больных после дебюта аутоиммунного буллезного дерматоза и назначения им базисной терапии. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакетов Excel 2000 и Statistica 13. Рассчитаны медиана, верхний и нижний квартили $Me (Q_1-Q_3)$, использовались непараметрические статистические методы (χ^2) с поправкой на непрерывность. Уровень статистической значимости различий считался при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании ретроспективного исследования амбулаторных карт и историй болезни 70 больных аутоиммунными буллезными дерматозами, у 81,4% (57/70) из них установлена полиморбидная патология, диагностированная до дебюта буллезного дерматоза. Медиана среднего возраста в группе мужчин, больных АБД, составила 49 (41,5–63,0) лет, в группе женщин – 56 (45,0–67,5) лет. У 48,6% (34/70) пациентов исследуемой группы выявлено два и более сопутствующих заболевания.

При этом в структуре патологии внутренних органов заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС) диагностированы у 52,8% (37/70) пациентов, патология желудочно-кишечного тракта зарегистрирована у 41,4% (29/70), эндокринопатии наблюдались у 20,0% (14/70), заболевания костно-мышечной системы – у 15,7% (11/70) больных АБД (таблица). Также у пациентов зарегистрированы такие заболевания, как бронхиальная астма, почечно-клеточный рак, аденокарцинома толстого кишечника, сенильная катаракта.

Обращает внимание, что среди 37 пациентов с сердечно-сосудистой патологией у всех больных АБД выявлена артериальная гипертензия. При этом у каждого второго пациента зарегистрирована 2-я или 3-я степень повышения артериального давления. У 56,7% (21/37) больных артериальной гипертензией встречалось поражение органов-мишеней (гипертрофия левого желудочка, атеросклеротические бляшки магистральных сосудов, клиренс креатинина < 60 мл/мин), а у 35,1% (13/37) выявлены ассоциированные клинические состояния. Среди ассоциированных клинических состояний у 29,7% (11/37) пациентов с патологией ССС выявлена ишемическая болезнь сердца,

у 8,1% (3/37) больных в анамнезе зарегистрирован инфаркт миокарда, у 24,3% (9/37) диагностирована хроническая сердечная недостаточность, еще у 5,4% (2/37) – хроническая почечная недостаточность. Атерогенная дислипидемия зарегистрирована у 13,5%

(5/37) больных АБД. При этом следует отметить, что двум из трех пациентов с ранее установленной артериальной гипертензией в дальнейшем потребовалось назначение высоких суточных доз системных ГКС в связи с дебютом АБД.

Т а б л и ц а

Структура соматической патологии у больных АБД, n = 70		
Класс болезней по МКБ-10	Всего	
	абс.	%
Класс IX. Болезни системы кровообращения	37	52,8
Класс XI. Болезни органов пищеварения	29	41,4
Класс IV. Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ	14	20,0
Класс XIII. Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани	11	15,7
Класс XIV. Болезни мочеполовой системы	7	10,0
Класс VII. Болезни глаза и его придаточного аппарата	7	10,0
Класс X. Болезни органов дыхания	5	7,1
Класс II. Новообразования	4	5,8
Класс V. Психические расстройства и расстройства	2	2,8
Класс VI. Болезни нервной системы	1	1,4
Всего лиц с патологией внутренних органов	57	81,4

Примечание. Общее количество наблюдений превышает 100% вследствие наличия нескольких патологических состояний у одного человека.

В структуре заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у 65,5% (19/29) больных АБД с патологией ЖКТ диагностированы эндоскопические признаки гастрита, каждый третий пациент страдал хроническим холециститом и (или) хроническим панкреатитом. У 10,3% (3/29) больных в анамнезе зарегистрирована язвенная болезнь желудка. Следует отметить, что только двум больным АБД с жалобами со стороны ЖКТ в анамнезе проведена эзофагогастродуоденоскопия. В одном случае диагностирован эзофагит, в другом обнаружены эрозии на протяжении всего органа, которые расценены как проявления эрозивного эзофагита. Однако данные проявления регрессировали после применения системных ГКС, назначенных в связи с дебютом АБД. Также у одной пациентки наблюдалась стриктура пищевода неизвестной этиологии.

У 72,7% (8/11) больных АБД с патологией костно-мышечной системы наблюдались впервые выявленный или ранее установленный остеопороз и остеопения. Необходимо отметить, что лекарственная терапия у этих пациентов, до включения в исследование, состояла из приема нестероидных противовоспалительных средств и препаратов кальция.

Среди эндокринопатий у 57,1% (8/14) больных АБД диагностирован сахарный диабет 2-го типа (СД2). Данная патология выявлена до приема системных ГКС. У 28,5% (4/14) пациентов диагностирован аутоиммунный тиреоидит.

Патология органов зрения выявлена у семи больных АБД, первое ранговое место занимают больные

с сенильной катарактой, при этом каждому второму пациенту требовалось хирургическое лечение. У двух пациентов диагностирован конъюнктивит и блефарит.

Заболевания других органов и систем, такие как бронхиальная астма, хронический пиелонефрит, сенсорная полинейропатия, железодефицитная анемия, встречались в единичных случаях. Следует отметить, что у четырех из 70 больных АБД диагностировано злокачественное новообразование, которое могло быть триггерным фактором в развитии паранеопластической пузырчатки, буллезного пемфигоида Лёвёра.

Всем больным АБД рассчитан индекс полиморбидности Чарлсон. Медиана индекса Чарлсон у больных АБД составила 2,5 (1–3), риск летального исхода за 10-летний период равен 16,5%, при этом гендерных различий при сравнении индекса Чарлсон не наблюдалось. Необходимо отметить высокий удельный вес больных с артериальной гипертензией, хронической сердечной недостаточностью, СД2, язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Ни у одного больного АБД не были зарегистрированы заболевания, входящие в расчет индекса Чарлсон: поражение периферических сосудов, преходящее нарушение мозгового кровообращения, коллагенозы, цирроз печени без портальной гипертензии, острое нарушение мозгового кровообращения с гемиплегией или параплегией, острый и хронический лимфо- или миелолейкоз, лимфомы, цирроз печени с портальной гипертензией, синдром приобретенного иммунодефицита.

У одного мужчины с буллезным пемфигоидом Левера до дебюта АБД зарегистрировано шесть сопутствующих заболеваний, среди которых почечно-клеточный рак правой почки, ишемическая болезнь сердца: постинфарктный кардиосклероз (2007), стенокардия напряжения (II функциональный класс), гипертоническая болезнь (3-я стадия, риск 4); хроническая сердечная недостаточность (II функциональный класс); СД2, катаракта, доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Индекс Чарлсон равен 8, а риск летального исхода составлял более 79,0% (рис.).



Рисунок. Пациент А., 63 года: диагноз «буллезный пемфигоид Левера»

Следует отметить, что после дебюта АБД назначение патогенетической терапии, а именно системной ГКС-терапии, потребовалось 65,7% (46/70) больных. Пациентам с акантолитической пузырчаткой, буллезным пемфигоидом Левера, приобретенным буллезным эпидермолизом проводилось лечение средними и высокими суточными дозами ГКС. В процессе лечения у 39,1% (18/46) пациентов, получавших ГКС, диагностирована декомпенсация сопутствующей патологии.

У 29,7% (11/37) пациентов с заболеваниями ССС наблюдалось отсутствие коррекции артериальной гипертензии разной степени. Из них у девяти больных зарегистрировано повышение артериального

давления, требующее коррекции антигипертензивной терапии у врача-кардиолога.

Декомпенсация СД2 диагностирована у каждого второго больного с ранее установленной эндокринопатией (7/14), в связи с чем всем больным потребовалась консультация врача-эндокринолога с целью коррекции дозы сахароснижающих лекарственных средств.

После назначения системной ГКС-терапии пациентам с АБД повторно рассчитан индекс Чарлсон. Медиана индекса Чарлсон у 65,7% (46/70) больных АБД, получавших ГКС, составила 3,5 (2–5), что при сравнительном анализе достоверно указывает на повышение риска летального исхода до 34,5% ($p < 0,05$). Следует отметить, что у данной группы пациентов индекс полиморбидности увеличился на единицу, а риск развития летального исхода – на 18,0%, по сравнению с тем, какими были указанные показатели у больных до дебюта АБД и назначения ГКС-терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на невысокую распространенность АБД, смертность, по данным отечественных и зарубежных исследователей, достигает 30,0%, что обусловлено как тяжестью самого заболевания, так и развитием осложнений в процессе лечения [10, 11], в связи с чем больные АБД должны находиться на диспансерном учете врача-дерматовенеролога на протяжении всей жизни [12].

Врачи и ученые во всем мире в последнее десятилетие сообщают о влиянии полиморбидной патологии на клиническое течение заболевания, качество жизни, эффективность лечения основного заболевания и его прогноз, отмечая, что чем больше сопутствующих заболеваний у пациента, тем хуже качество жизни больного и выше риск летального исхода [13, 14]. Зарубежные авторы отмечают, что наиболее распространенными сопутствующими заболеваниями у больных АБД были сердечно-сосудистые, инфекционные и аутоиммунные, а также метаболические нарушения. При этом смертность у этих пациентов была значительно выше, чем у больных такого же возраста, но не имеющих АБД [15]. По результатам проведенного исследования, у 81,4% больных зафиксирована полиморбидная патология, при этом у 48,6% пациентов установлено более двух сопутствующих заболеваний.

M. Pishgahi, N. Namazi (2018) оценивали риск развития фибрилляции предсердия у пациентов с АБД. Авторы отмечают, что смертность среди пациентов с буллезными дерматозами с заболеваниями ССС, такими как ишемическая болезнь сердца и аритмия,

выше, чем в популяции. Ученые сообщают о высоком риске развития аритмии предсердий у пациентов с акантолитической пузырчаткой, при этом риск повышается у пациентов, принимающих высокие дозы глюкокортикостероидов [16, 17].

Нами получены аналогичные данные, однако в исследовании выявлена высокая полиморбидность у больных АБД с артериальной гипертензией и СД2, что, в том числе, обусловлено медикаментозной терапией основного заболевания – длительным приемом пероральных ГКС. При этом необходимо отметить, что сахарный диабет, после назначения высокодозной глюкокортикостероидной терапии, приобретает более тяжелое течение и нуждается в ранней профилактике.

Большинство зарубежных исследований сводится к оценке частоты встречаемости сопутствующих заболеваний у больных АБД без оценки индекса полиморбидности и учета тяжести диагностированного ими полиморбидного заболевания [18, 19]. В исследовании впервые было проведено комплексное обследование больных АБД с определением индекса Чарлсон, который является золотым стандартом в исследованиях различного типа для оценки полиморбидности. С его помощью можно спрогнозировать риск развития летального исхода, а также персонифицировать план диспансерного наблюдения за больными, получающими длительную высокодозную глюкокортикостероидную терапию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полиморбидная патология выявлена у 81,4% пациента до дебюта АБД. При этом наиболее часто встречались артериальная гипертензия, патология желудочно-кишечного тракта, СД2 и остеопороз. После дебюта АБД и назначения системной ГКС-терапии у 39,1% больных наблюдалась декомпенсация соматической патологии. Наличие полиморбидной патологии является негативным прогнозируемым фактором, повышающим риск развития летального исхода, о чем свидетельствует высокий индекс Чарлсон. Таким образом, пациентам с АБД, получающим системную ГКС-терапию, необходимо находиться на диспансерном учете не только у врача-дерматовенеролога, но и смежных специалистов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самцов А.В., Белоусова И.Э. Буллезные дерматозы. СПб.: Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2012: 144.
2. Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С., Иванова О.Л. Дерматовенерология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011: 1024.
3. Махнева Н.В. Современный взгляд на диагностику и лечение аутоиммунных буллезных дерматозов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2011; 9: 15–17.
4. Кубанов А.А., Знаменская Л.Ф., Абрамова Т.В. Дифференциальная диагностика пузырных дерматозов. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2016; 6: 43–56.
5. Ghiasi M., Daneshpazhooh M., Ismonov M., Chams-Davatchi C. Evaluation of autoimmune bullous diseases in elderly patients in Iran: A 10-Year Retrospective Study. *Skinmed*. 2017; 15 (3): 175–180.
6. Patsatsi A., Lamprou F., Kokolios M., Stylianidou D., Trigoni A., Kalampalikis D., Sotiriadis D. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Northern Greece. A 4-year Retrospective Study and Review of the Literature. *Acta Dermatovenol. Croat*. 2017; 25 (3): 195–201.
7. Lai Y.C., Yew Y.W., Lambert W.C. Bullous pemphigoid and its association with neurological diseases: a systematic review and meta-analysis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 2016; 30 (12): 2007–2015. DOI: 10.1111/jdv.13660.
8. Liu Y.D., Wang Y.H., Ye Y.C., Zhao W.L., Li L. Prognostic factors for mortality in patients with bullous pemphigoid: a meta-analysis. *Arch. Dermatol. Res*. 2017; 309 (5): 335–347. DOI: 10.1007/s00403-017-1736-1.
9. Jeon H.W., Yun S.J., Lee S.C., Won Y.H., Lee J.B. Mortality and comorbidity profiles of patients with bullous pemphigoid in Korea. *Ann. Dermatol*. 2018; 30 (1): 13–19. DOI: 10.5021/ad.2018.30.1.13.
10. Хамаганова И.В., Маляренко Е.Н., Денисова Е.В., Воронцова И.В., Плиева К.Т. Ошибка в диагностике вульгарной пузырчатки: клинический случай. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2017; 20 (1): 30–33. DOI: 10.18821/1560-9588-2017-20-1-30-33.
11. Булгакова А.И., Хисматуллина З.Р., Хамзина Г.Р. Распространенность, этиологические аспекты и клинические проявления пузырчатки. *Стоматология для всех*. 2017; 1: 24–29.
12. Лыкова С.Г., Решетникова Т.Б., Спицына А.В. Истинная акантолитическая пузырчатка: патогенетические механизмы и особенности кортикостероидной терапии. *Сибирский журнал дерматологии и венерологии*. 2001; 1: 9–13.
13. Kridin K., Zelber-Sagi S., Bergman R. Risk factors for lethal outcome in patients with pemphigus: a retrospective cohort study. *Eur. J. Dermatol*. 2018; 28 (1): 26–37. DOI: 10.1684/ejd.2018.3252.
14. Försti A.K., Jokelainen J., Timonen M., Tasanen K. Risk of death in bullous pemphigoid: A Retrospective Database Study in Finland. *Acta Derm. Venereol*. 2016; 96 (6): 758–761. DOI: 10.2340/00015555-2347.
15. Ren Z., Hsu D.Y., Brieve J., Silverberg N.B., Langan S.M., Silverberg J.I. Hospitalization, inpatient burden and comorbidities associated with bullous pemphigoid in the U.S.A. *Br. J. Dermatol*. 2017; 176 (1): 87–99. DOI: 10.1111/bjd.14821.
16. Pishgahi M., Dadkhahfar S., Robati R.M., Kheradmand Z., Shahidi-Dadras M., Zargari O., Elpern D.J. Electrocardiographic changes after high-dose corticosteroid pulse therapy in pemphiguspatients. *J. Dermatolog. Treat*. 2018; 29 (8): 802–805. DOI: 10.1080/09546634.2018.1466980.

17. Namazi N., Ariaeenejad S., Azad M.E., Pishgahi M. Risk of atrial fibrillation in pemphigus vulgaris. *Indian Dermatol. Online J.* 2018; 9 (4): 275–277. DOI: 10.4103/idoj.IDOJ_205_17.
18. Chiu Y.W., Chen Y.D., Hua T.C., Wu C.H., Liu H.N., Chang Y.T. Comorbid autoimmune diseases in patients with pemphigus: a nationwide case-control study in Taiwan. *Eur. J. Dermatol.* 2017; 27 (4): 375–381. DOI: 10.1684/ejd.2017.3060.
19. Charlson M., Wells M.T., Ullman R., King F., Shmukler C. The Charlson comorbidity index can be used prospectively to identify patients who will incur high future costs. *PLoS One.* 2014; 9 (12): e112479. DOI: 10.1371/journal.pone.0112479.

Вклад авторов

Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М. – консультирование по дерматологическому заболеванию, редактирование статьи. Изможерова Н.В. – консультирование по наличию полиморбидной патологии, редактирование статьи. Гурковская Е.П. – проведение клинического исследования, подготовка статьи.

Сведения об авторах

Уфимцева Марина Анатольевна, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой дерматовенерологии и безопасности жизнедеятельности, УГМУ, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0002-4335-9334.

Изможерова Надежда Владимировна, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, УГМУ, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-7826-9657.

Гурковская Евгения Петровна, ассистент, кафедра дерматовенерологии и безопасности жизнедеятельности, УГМУ, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-7535-5429.

Бочкарев Юрий Михайлович, канд. мед. наук, доцент, кафедра дерматовенерологии и безопасности жизнедеятельности, УГМУ, г. Екатеринбург. ORCID 0000-0001-6298-7216.

(✉) Гурковская Евгения Петровна, e-mail: gurkovskaya-e@mail.ru.

Поступила в редакцию 19.07.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Особенности цитокинового профиля у детей с расстройством аутистического спектра

Худякова М.И.¹, Черевко Н.А.¹, Новиков П.С.¹, Березовская К.В.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634055, г. Томск, Московский тракт, 2

² ООО «Центр семейной медицины»
Россия, 634050, г. Томск, ул. Трифонова, 22

РЕЗЮМЕ

Цель работы: выявить уровень концентрации цитокинов IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ в сыворотке крови у детей с расстройством аутистического спектра (РАС).

Материалы и методы. Материалом исследования служили образцы крови, полученные от детей двух групп исследования: детей с расстройством аутистического спектра ($n = 93$) и клинически здоровых детей ($n = 30$). Средний возраст в обеих группах составил (7 ± 2) лет.

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию цитокинов IL-17A (с применением набора Bender Medsystems, Австрия) и IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ (Вектор-Бест, Россия). Оценку когнитивных и психофизиологических показателей проводили с помощью анкеты Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC).

Результаты. У детей с РАС повышены значения концентрации IL-17A ($U = 54$; $p = 0,015$) и IFN γ ($U = 4,64$; $p = 0,006$) и снижены – IL-6 ($U = 327$; $p = 0,001$) и IL-4 ($U = 177$; $p = 0,001$) по сравнению с этими показателями у детей в контрольной группе. Установлены корреляции между концентрацией IL-6 и IL-4 ($r = 0,68$; $p < 0,05$); между IL-17A и IFN γ ($r = 0,41$; $p < 0,05$), IL-6 ($r = 0,87$; $p < 0,05$), количеством баллов АТЕС ($r = 0,24$; $p < 0,05$) у детей с РАС.

Заключение. Установленный нами дисбаланс цитокинов у детей с РАС подтверждает гипотезу его участия в развитии РАС и свидетельствует об Th17-направлении иммунорегуляции в патогенезе расстройств аутистического спектра.

Ключевые слова: расстройство аутистического спектра, цитокины, нейроиммунное воспаление, интерлейкин 17A.

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

Источник финансирования. Работа выполнена за счет средств ООО «Центр семейной медицины» (г. Томск), благотворительного фонда «Созидание» (г. Москва), с участием ТРОО «АРДА «АУРА» (г. Томск).

Соответствие принципам этики. Все родители детей подписали информированное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом ООО «Центра семейной медицины» (протокол № 7 от 18.03.2019).

Для цитирования: Худякова М.И., Черевко Н.А., Новиков П.С., Березовская К.В. Особенности цитокинового профиля у детей с расстройством аутистического спектра. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 174–178. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-174-178>.

Features of the cytokine profile in children with autism spectrum disorder

Khudiakova M.I.¹, Cherevko N.A.¹, Novikov P.S.¹, Berezovskaya K.V.²

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

² Center of Family Medicine

22, Trifonova Str., Tomsk, 634055, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study: to reveal the particularities of the concentration of cytokines IL4, IL6, IL10, IL17, IFN γ in blood serum in children with autism spectrum disorder (ASD).

Materials and methods. The blood samples obtained from children of two study groups: children with autism spectrum disorder ($n = 93$) and clinically healthy children ($n = 30$), served as the material for the study. Cytokine concentrations were determined in blood serum using the Bender Medsystems (Austria) kits for IL17A and Vector-Best (Russia) kits for IL4, IL6, IL10, IFN γ . Serum cytokine concentrations were determined by enzyme immunoassay using kits for IL17A (Bender Medsystems, Austria), IL4, IL6, IL10, IFN γ (Vector-Best, Russia). Assessment of cognitive and psychophysiological indicators in children was performed using the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC).

Results. The concentrations of IL17A ($U = 54$; $p = 0,015$) and IFN γ ($U = 4.64$; $p = 0,006$) were increased and the concentrations of IL6 ($U = 327$; $p = 0.001$) and IL4 ($U = 177$; $p = 0.001$) were decreased in children with ASD.

The concentration of IL6 correlates with the concentration of IL4 ($r = 0.68$; $p < 0.05$). The concentration of IL17A correlates with the concentration of IFN γ ($r = 0.41$; $p < 0.05$), IL6 ($r = 0.87$; $p < 0.05$) and ATEC score ($r = 0.24$; $p < 0.05$) in the group of children with ASD.

Conclusion. The cytokine disbalance in children with ADS, which was observed in our study, confirms the hypothesis of their participation in the development of the disease and clearly shows the Th17 immunoregulation pathway in the pathogenesis of the autism spectrum disorder.

Key words: autism spectrum disorder, cytokines, neuroimmune inflammation, interleukin 17A.

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

Source of financing. The study was sponsored by the Center of Family Medicine (Tomsk, Russia), "Sozidaniye" charity fund (Moscow, Russia), and Association of Parents of Autistic Children "AURA" (Tomsk, Russia).

Conformity with the principles of ethics. All parents of the children signed an informed consent for complex research and processing of personal data. The study was approved by the local ethics committee under the Center of Family Medicine (Protocol No. 7 of 18.03.2019).

For citation: Khudiakova M.I., Cherevko N.A., Novikov P.S., Berezovskaya K.V. Features of the cytokine profile in children with autism spectrum disorder. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 174–178. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-174-178>.

ВВЕДЕНИЕ

Расстройство аутистического спектра (РАС) – современная проблема XXI в., с каждым годом увеличивается количество детей с таким диагнозом. По данным статистики, распространенность РАС составляет 1 : 68 среди детей в возрасте до 8 лет [1].

Анализ научных источников за последние 5 лет, посвященных изучению РАС, демонстрирует активный рост интереса к данному заболеванию во всем мире. Однако по-прежнему актуальным остается вопрос о патогенезе РАС. Одной из современных теорий развития РАС является гипотеза нейромунного воспаления, связанная с нарушением

пищевой толерантности к продуктам и когнитивными дисфункциями с вовлечением врожденного, адаптивного иммунитета, микробиоты [2, 3]. В проведенных ранее исследованиях мы выявляем особенности пищевой гиперчувствительности у детей с РАС [4].

В связи с этим представляется актуальным изучение роли интерлейкина (IL) 17, с которым связывают поддержание иммунного гомеостаза слизистой кишечника; IL-6, интерферона гамма (IFN γ) и цитокинов с противовоспалительными свойствами IL-4 и IL-10 в патогенезе РАС у детей [5].

Цель данного исследования – выявить уровень концентрации цитокинов IL-4, IL-6, IL-10, IL-17,

IFN γ в сыворотке крови у детей с расстройством аутистического спектра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе поликлинического отделения ООО «Центр семейной медицины». В нем приняли участие 123 ребенка, которые были разделены на две группы: основную ($n = 93$, стаж постановки диагноза РАС различной степени тяжести составил 4–5 лет) и контрольную ($n = 30$, соматически здоровые дети). Средний возраст детей в обеих группах составил (7 ± 2) лет. В обеих группах детей ранее мы выделили дифференцированные реакции пищевой гиперчувствительности [4]. Все родители детей подписали информированное согласие на проведение комплексных исследований и обработку персональных данных.

В качестве материала исследования использовали кровь, взятую из подкожных вен области локтевого сгиба локтевого сгиба натошак. Оценка концентрации цитокинов в сыворотке крови была произведена методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением наборов Bender Medsystems (Австрия) к IL-17A и «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) к IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ .

На период сдачи анализа крови для оценки показателей когнитивных и психофизиологических изменений у детей с РАС, а также определения степени тяжести заболевания родители детей на основании собственных наблюдений заполняли специализированную анкету Autism Treatment Evaluation Checklist (АТЕС). Результаты анкетирования родителей детей контрольной группы не превышали 10 баллов, что свидетельствовало об отсутствии заболевания у детей.

Статистический анализ был выполнен в программе IBM SPSS Statistics 23.0 (США) с использованием критериев Колмогорова – Смирнова, U -критерия Манна – Уитни, W -критерия Вилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1 - Q_3)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования показано, что концентрация IL-17A у детей с РАС превышает таковую, измеренную у детей контрольной группы ($U = 54$; $p = 0,015$), (таблица).

IL-17A является провоспалительным цитокином, который продуцируется рядом иммунных клеток человека, включая клетки Th17, нейтрофилы и мононуклеарные клетки периферической крови, врожденные лимфоидные клетки типа 3 (ILC3).

Большинство из этих клеток располагаются в барьерных тканях, где они участвуют в поддержании гомеостаза кишечника. Вырабатываемые клетками ILC3 цитокины IL-17A, IL-17F и IL-22 усиливают барьерную функцию эпителия кишечника, стимулируя выработку муцина и антимикробного пептида [6]. Нарушение регуляции клеток Th17 и продукции IL-17A связывают с развитием многочисленных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в том числе и воспалительных заболеваний кишечника [7].

Таблица

Концентрация цитокинов у детей с расстройством аутистического спектра, пг/мл, $Me (Q_1 - Q_3)$		
Цитокин	Дети с РАС, $n = 93$	Контрольная группа, $n = 30$
IL-4	1,75 (1,00–14,93)*	16,30 (15,58–17,13)
IL-6	3,20 (1,00–15,33)*	15,75 (18,30–20,43)
IL-10	17,45 (15,38–20,89)	17,50 (16,28–19,48)
IL-17A	9,58 (3,76–26,75)*	6,85 (2,95–15,05)
IFN γ	14,90 (13,12–16,10)*	13,35 (11,85–14,20)

* $p < 0,05$.

В литературе приводятся данные об эффекторной роли IL-17A в формировании вызванных материнской иммунной активацией поведенческих аномалий у потомства, раскрывающие важную связь между нейровоспалительным состоянием и поведенческими проявлениями [8, 9]. Важно отметить, что самые высокие значения концентрации IL-17A в крови у обследованных нами детей с РАС были зарегистрированы в случаях тяжелых проявлений заболевания, определенных по результатам теста АТЕС ($r = 0,24$; $p < 0,05$). Это может указывать на то, что увеличение концентрации IL-17A в сыворотке тесно связано со степенью тяжести РАС.

Увеличение концентрации IL-17A в сыворотке крови у детей с РАС может быть связано с повышением уровня IFN γ ($r = 0,41$; $p < 0,05$). Есть данные, что увеличение продукции IFN γ связано с пластичностью Th17-клеток. Повторная стимуляция различными микробными антигенами в дифференцированных клетках приводит к транскрипционным изменениям в линии Th17. Примером этой пластичности являются Th17/Th1-клетки или клетки, которые могут секретировать как IL-17A, так и IFN γ – клетки ILC3 [10, 11].

В свою очередь, IL-17A является стимулятором продукции провоспалительных цитокинов, IFN γ и IL-12 макрофагами [12]. Это может объяснять повы-

шение концентрации IFN γ в сыворотке детей с РАС по сравнению с показателями в группе детей контрольной группы ($U = 4,64$; $p = 0,006$). В литературе описано, что прямое действие IFN γ в повышенных концентрациях может препятствовать нормальному развитию нервной системы, влияя на морфологию дендритов и образованию синапсов, что может приводить к развитию РАС [13].

Как показывает проведенное нами исследование, у детей с РАС концентрация IL-17A обнаруживает однонаправленное изменение с уровнем IL-6 ($r = 0,87$; $p < 0,05$), концентрация которого снижена ($U = 327$; $p = 0,001$). Известно, что IL-6 – ключевой фактор дифференцировки клеток Th17 [14], относится к многофункциональным цитокинам, вызывающим клеточные ответы, которые опосредуют воспаление, нейрогенез, глиогенез, рост и выживаемость клеток, миелинизацию и демиелинизацию в центральной нервной системе [15]. Кроме того, обладает регенеративной или противовоспалительной активностью и участвует в регуляции метаболических и нервных процессов [16]. Таким образом, IL-6 участвует в активации иммунной системы, гипотетически провоцируя развитие РАС-подобных фенотипов у потомства [17].

В свою очередь, у детей с РАС концентрация IL-6 коррелирует с концентрацией IL-4 ($r = 0,68$; $p < 0,05$), которая оказалась ниже аналогичных показателей у детей контрольной группы ($U = 177$; $p = 0,001$). Установлено, что IL-4 участвует в когнитивных процессах в качестве нейротропного фактора [18]. Он активируется во время воспаления центральной нервной системы, вызывая альтернативную активацию глиальных клеток, защищая их от апоптоза. Возможно, снижение концентрации IL-4 связано с развитием РАС. Концентрация IL-10 у детей с РАС, по нашим данным, не отличается в обеих группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленный нами дисбаланс цитокинов у детей с РАС подтверждает гипотезу его участия в развитии РАС и свидетельствует об Th17-направлении иммунорегуляции в патогенезе расстройств аутистического спектра. Однако требуется дальнейшее изучение особенностей цитокинов у пациентов с РАС, которое позволит понять механизм, посредством которого воспаление способствует развитию нейродегенеративных расстройств, таких как РАС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Christensen D.L., Baio J., Braun K.V.N., Bilder D., Charles J., Constantino J.N. Prevalence and characteristics of autism

- spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network. *MMWR Surveillance Summaries*. 2016; 65 (3): 1–23. DOI: 10.15585/mmwr.ss6503a1.
2. Hu C.C., Xu X., Xiong G.L., Xu Q., Zhou B.R., Li C.Y., Qin Q., Liu C.X., Li H.P., Sun Y.J., Yu X. Alterations in plasma cytokine levels in Chinese children with autism spectrum disorder. *Autism Research*. 2018; 11 (7): 989–999. DOI: 10.1002/aur.1940.
3. Fattorusso A., Di Genova L., Dell’Isola G.B., Mencaroni E., Esposito S. Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients*. 2019; 11 (3): 521. DOI: 10.3390/nu11030521.
4. Худякова М.И., Черевко Н.А., Скирневская А.В., Розенштейн М.Ю., Розенштейн А.З., Кондаков С.Э., Березовская К.В. Особенности пищевой гиперчувствительности у детей с расстройством аутистического спектра. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4 (5): 61–68. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.10.
5. Eftekharian M.M., Ghafouri-Fard S., Noroozi R., Omrani M.D., Arsang-Jang S., Ganji M., Gharzi V., Noroozi H., Komaki A., Mazdeh M., Taheri M. Cytokine profile in autistic patients. *Cytokine*. 2018; 108: 120–126. DOI: 10.1016/j.cyt.2018.03.034.
6. Ohnmacht C., Marques R., Presley L., Sawa S., Lochner M., Eberl G. Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cellular Microbiology*. 2011; 13 (5): 653–659. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01577.x.
7. Wilke C.M., Bishop K., Fox D., Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in Immunology*. 2011; 32: 603–611. DOI: 10.1016/j.it.2011.08.003.
8. Wong H., Hoeffler C. Maternal IL-17A in autism. *Experimental Neurology*. 2018; 299 (PtF): 228–240. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.04.010.
9. Choi G.B., Yim Y.S., Wong H., Kim S., Kim H., Kim S.V., Hoeffler C.A., Littman D.R., Huh J.R. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016; 351 (6276): 933–939. DOI: 10.1126/science.aad0314.
10. Sandquist I., Kolls J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research*. 2018; 7: 205. DOI: 10.12688/f1000research.13020.1.
11. Duhon R., Glatigny S., Arbelaez C.A., Blair T.C., Oukka M., Bettelli E. Cutting edge: The pathogenicity of IFN- γ -producing Th17 cells is independent of T-bet. *The Journal of Immunology*. 2013; 190 (9): 4478–4482. DOI: 10.4049/jimmunol.1203172.
12. AL-Ayadhi L.Y., Mostafa G.A.. Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *Journal of Neuroinflammation*. 2012; 9 (1): 158. DOI: 10.1186/1742-2094-9-158.
13. Leipzig N.D., Xu C., Zahir T., Shoichet M.S. Functional immobilization of interferon-gamma induces neuronal differentiation of neural stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010; 93 (2): 625–633. DOI: 10.1002/jbm.a.32573.
14. Kuchroo V.K., Awasthi A. Emerging new roles of Th17 cells. *European Journal of Immunology*. 2012; 42 (9): 2211–2214. DOI: 10.1002/eji.201242872.

15. Erta M., Quintana A., Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*. 2012; 8 (9): 1254–1266. DOI: 10.7150/ijbs.4679.
16. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1813 (5): 878–888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
17. Atladottir H.O., Thorsen P., Ostergaard L., Schendel D.E., Lemcke S., Abdallah M., Parner E.T. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2010; 40 (12): 1423–1430. DOI: 10.1007/s10803-010-1006-y.
18. Gadani S.P., Cronk J.C., Norris G.T., Kipnis J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *The Journal of Immunology*. 2012; 189 (9): 4213–4219. DOI: 10.4049/jimmunol.1202246.

Сведения об авторах

Худякова Мария Ивановна, соискатель, ординатор, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6320-5017.

Черевко Наталья Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-1023-4137.

Новиков Павел Сергеевич, соискатель, СибГМУ, г. Томск.

Березовская Ксения Валерьевна, врач-педиатр, ООО «Центр семейной медицины», г. Томск.

(✉) **Худякова Мария Ивановна**, e-mail: khudiakovami@mail.ru.

Поступила в редакцию 07.02.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Экспрессия провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких

Чурина Е.Г.^{1,2}, Ситникова А.В.¹, Уразова О.И.^{1,3}, Патышева М.Р.^{2,4}, Новицкий В.В.^{1,3}, Голубчиков П.Н.⁵, Степанова Е.П.⁵

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

⁴ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

⁵ Томский фтизиопульмонологический медицинский центр
634009, г. Томск, ул. Р. Люксембург, 17

РЕЗЮМЕ

Цель работы – установить особенности экспрессии провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным лекарственным средствам.

Материалы и методы. Обследованы 40 пациентов (36 мужчин и 4 женщины): 18 пациентов с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) (16 мужчин и 2 женщины, средний возраст (44,56 ± 8,10) лет) и 22 пациента с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) (20 мужчин и 2 женщины, средний возраст (46,54 ± 5,24) лет) с туберкулезом легких (ТБ). Из них было 30 пациентов, выделяющих *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), чувствительные к основным противотуберкулезным средствам (ПТС), и 10 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к лекарственным средствам основного ряда противотуберкулезной терапии. Группу сравнения составили 15 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Материалом исследования являлась венозная кровь. Для выделения моноцитов из цельной крови с целью их трансформации в макрофаги использовали метод центрифугирования в градиенте фиколла плотностью 1,077 г/см³ с последующей иммуномагнитной сепарацией CD14⁺ клеток. Моноциты культивировали в полной питательной среде X-VIVO 10 с добавлением колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) (5 нг/мл) в концентрации 1 × 10⁶ клеток/мл со стимуляторами: интерлейкином (IL) 4 (10 нг/мл) и интерфероном (IFN) γ (100 нг/мл). Иммунофенотипирование макрофагов проводили с использованием моноклональных антител к CD80, CD86, HLA-DR на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX LX (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США). Полученные результаты анализировали статистическими методами.

Результаты. Количество интактных и стимулированных цитокинами (IL-4 и IFNγ) CD80-позитивных макрофагов у больных ИТБ и с лекарственно-устойчивым ТБ (ЛУ ТБ) превышало их число не только у здоровых доноров, но и у больных ДТБ и с лекарственно-чувствительным ТБ (ЛЧ ТБ) соответственно. Кроме того, у больных ИТБ и ЛУ ТБ регистрировалось повышение экспрессии CD86 на макрофагах после добавления в

суспензионную культуру IFN γ (индуктор M1-активации). У больных ДТБ и ЛЧ ТБ количество макрофагов с экспрессией костимулирующих молекул семейства B7 при индукции цитокинами, напротив, снижалось или сохранялось в пределах нормы в отсутствие реакции на цитокины. Дефицит HLA-DR-позитивных макрофагов обнаруживался у всех больных ТБ. Минимальное число макрофагов, экспрессирующих HLA-DR, установлено у больных ДТБ и ЛЧ ТБ после инкубации клеток с IL-4 (индуктор M2-активации).

Заключение. Оценка экспрессии мембранных молекул B7 (CD80/86) и HLA-DR на макрофагах у больных ТБ позволяет сделать вывод о нарушениях противотуберкулезного иммунного ответа на стадии презентации антигена (у всех обследованных больных ТБ) и костимуляции (при ДТБ и ЛЧ ТБ). Увеличение экспрессии макрофагами поверхностных молекул CD80 (при M1- и M2-стимуляции) и CD86 (при M1-стимуляции) у больных ИТБ и ЛУ ТБ свидетельствует о повышении реактивности клеток при данных формах течения ТБ. Наряду с этим дефицит экспрессии на макрофагах HLA-DR (ключевого маркера провоспалительной активации клеток) при ТБ можно рассматривать как общий (не зависящий от клинической формы болезни и лекарственной чувствительности возбудителя) патогенетический фактор иммунного дисбаланса при туберкулезе легких.

Ключевые слова: макрофаги, туберкулез легких, врожденный иммунитет, иммунный ответ, костимулирующие молекулы, IL-4, IFN γ , CD80, CD86, HLA-DR.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7) и РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90018.

Соответствие принципам этики. Пациенты подписали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 5648 от 27.11.2017).

Для цитирования: Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Новицкий В.В., Голубчиков П.Н., Степанова Е.П. Экспрессия провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 179–188. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-179-188>.

Expression of pro-inflammatory and co-stimulatory molecules on the surface of macrophages *in vitro* in patients with pulmonary tuberculosis

Churina E.G.^{1,2}, Sitnikova A.V.¹, Urazova O.I.^{1,2}, Novitskiy V.V.^{1,2}, Patysheva M.R.^{2,4}, Golubchikov P.N.⁵, Stepanova E.P.⁵

¹ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University
36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics
40, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁴ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, the Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

⁵ Tomsk Phthisiopulmonological Medical Center
17/1, R. Luksemburg Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to identify features of the expression of pro-inflammatory and co-stimulatory molecules on the surface of macrophages *in vitro* in patients with pulmonary tuberculosis, depending on the clinical form of the disease and sensitivity of the pathogen to anti-TB drugs.

Materials and methods. 40 patients (36 men and 4 women) with pulmonary tuberculosis (TB) were examined: 18 patients (16 men and 2 women, average age (44.56 $\pm$ 8.10) years) with disseminated tuberculosis (DTB) and

22 patients (20 men and 2 women, average age (46.54 ± 5.24) years) with infiltrative tuberculosis (ITB). Of those, 30 patients secreted *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) sensitive to the basic anti-TB drugs (ATBD), and 10 patients secreted MBT resistant to first-line anti-TB drugs. Venous blood was the study material. To isolate monocytes from the whole blood in order to transform them into macrophages, ficoll density gradient centrifugation with gradient density of 1.077 g/cm^3 was used followed by immunomagnetic separation of CD14^+ cells. Monocytes were cultured in a complete culture medium X-VIVO 10 with gentamicin and phenol red with the addition of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (5 ng/ml) at a concentration of 1×10^6 cells/ml with the following stimulators: interleukin (IL) 4 (10 ng/ml) and interferon (IFN) γ (100 ng/ml). Immunophenotyping of macrophages was performed using monoclonal antibodies to CD80, CD86, and HLA-DR on a Beckman Coulter CytoFLEX LX flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The analysis of the obtained data was carried out using the CytExpert 2.0 software application. The results were analyzed using statistical methods.

Results. The number of intact and cytokine-stimulated (IL-4 and IFN γ) CD80-positive macrophages in patients with ITB and drug-resistant TB (DR TB) exceeded their number not only in healthy donors, but also in patients with DTB and drug-sensitive TB (DS TB), respectively. In addition, an increase in CD86 expression on the surface of macrophages was registered in patients with ITB and DR TB after adding IFN γ (M1-activation inducer) to the suspension culture. In contrast, in patients with DTB and DS TB, the number of macrophages with expression of B7 family co-stimulating molecules decreased or remained within the normal values in the absence of a reaction to cytokines during cytokine induction. Deficiency of HLA-DR-positive macrophages was found in all TB patients. The minimal number of macrophages expressing HLA-DR was found in patients with DTB and DS TB after cell incubation with IL-4 (M2-activation inducer).

Conclusion. Evaluation of the expression of B7 (CD80/86) and HLA-DR membrane molecules on macrophages in TB patients allows to conclude that anti-TB immune response is impaired at stages of antigen presentation (in all examined patients with TB) and co-stimulation (in DTB and DS TB). An increase in the expression of macrophage surface molecules CD80 (with M1- and M2-stimulation) and CD86 (with M1-stimulation) in patients with ITB and DR TB indicates an increase in cell reactivity in these forms of TB. In addition, deficit of expression of HLA-DR (a key marker of pro-inflammatory cell activation) on the surface of macrophages in TB can be considered as a general (independent of the clinical form of the disease and drug sensitivity of the pathogen) pathogenetic factor of immune imbalance in pulmonary tuberculosis.

Key words: macrophages, pulmonary tuberculosis, innate immunity, immune response, co-stimulating molecules, IL-4, IFN γ , CD80, CD86, HLA-DR.

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

Source of financing. The reported study was funded by Council for Grants of the President of the Russian Federation for leading scientific schools (SS-2690.2018.7) and the RFBR, project number 19-315-90018.

Conformity with the principles of ethics. All patients participating in the study signed an informed consent. The study was approved by the local Ethics Committee at SSMU (Protocol No. 5648 of 27.11.2017).

For citation: Churina E.G., Sitnikova A.V., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Patysheva M.R., Golubchikov P.N., Stepanova E.P. Expression of pro-inflammatory and co-stimulatory molecules on the surface of macrophages *in vitro* in patients with pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 179–188. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-179-188>.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что иммунитет — это комплекс факторов жизнедеятельности организма, направленных на сохранение его гомеостаза. Приобретенная резистентность к туберкулезу является продуктом сложных иммунных реакций с участием макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов и гранулоцитов. В то же время макрофаги и лимфатическая система человека служат «филогенетической колыбелью» возбудителя туберкулезной инфекции, способству-

ют возникновению симбионтных отношений микобактерий туберкулеза с организмом хозяина [1]. Очевидно, что макрофаги играют ключевую роль в успешной реализации механизмов врожденной иммунной защиты при проникновении патогенов, в том числе и *Mycobacterium tuberculosis* (MBT), в слизистые оболочки дыхательных путей.

Макрофаги — самые древние иммунокомпетентные клетки. Они представляют собой гетерогенную популяцию резидентных профессиональных антигенпрезентирующих клеток. Макрофаг — главная

эффекторная клетка в защите хозяина от патогенов и регуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций. Макрофаги участвуют в remodelировании и репарации поврежденных тканей [2, 3]. Феномен универсальности и пластичности макрофагов обеспечивает возможность быстрой конверсии их функционального фенотипа в очаге воспаления. Такая гетерогенность определяется способностью макрофагов реализовывать разные программы активации в ответ на различные стимулы: цитокиновые сигналы и сигналы, связанные с повреждением клетки или проникновением в организм паттернов патогенности (DAMPs/RAMPs). При классической активации макрофаги поддерживают течение острого воспалительного Th1-зависимого иммунного ответа, одновременно осуществляя эффекторную функцию (M1-активация). При альтернативной активации макрофаги приобретают противовоспалительный фенотип, в результате чего происходит их функциональная перестройка, и они начинают выполнять толерогенную функцию, способствуя фиброгенезу и усиленной пролиферации клеток (M2-активация) [4, 5].

«Классическая» активация макрофагов, приводящая к поляризации их созревания в направлении M1-клеток, индуцируется интерфероном (IFN) γ , продуцируемым Т-хелперами типа 1 (Th1) и натуральными киллерами (NK), а также фактором некроза опухоли (TNF) α и бактериальным липополисахаридом (LPS) [6]. Основные факторы дифференцировки альтернативно-активированных M2-макрофагов – интерлейкины (IL) 4 и 10 [7, 8]. Толл-подобные рецепторы (TLR) на поверхности и внутри макрофагов распознают паттерны патогенности и, таким образом, запускают процесс активации врожденного иммунитета. Функционально важную группу поверхностных молекул макрофагов образуют молекулы главного комплекса гистосовместимости MHC (HLA-DR) и костимулирующие молекулы группы B7. Экспрессия молекул MHC-II усиливается при активации клеток, в роли костимулирующих выступают молекулы CD80 и CD86. Первая из них появляется на поверхности макрофага только после активации, вторая экспрессируется конститутивно, но при индукции антигеном интенсивность экспрессии усиливается [9–11].

Воспаление – главный эффекторный механизм врожденного иммунитета, который реализуется в легких в ответ на проникновение *M. tuberculosis* в альвеолярные макрофаги. Это происходит, если макрофаги по какой-либо причине не осуществили полноценную фагоцитарную функцию. Эффективность воспалительно-регенераторного потенциала макрофагов определяется, прежде всего, их функци-

ональным фенотипом и интенсивностью экспрессии на клетках провоспалительных молекул.

Таким образом, целью работы явилось установление особенностей экспрессии провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы обследованы 40 пациентов (36 мужчин и 4 женщины): 18 пациентов с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) (16 мужчин и 2 женщины, средний возраст $(44,56 \pm 8,10)$ лет) и 22 пациента с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) (20 мужчин и 2 женщины, средний возраст $(46,54 \pm 5,24)$ лет). Диагноз устанавливался на основании анамнеза, клинической картины заболевания, а также результатов рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты.

У всех обследованных больных ТБ была определена лекарственная чувствительность возбудителя к основным ПТС. По данному критерию выявлены 30 пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТС, и 10 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). Критериями исключения больных ТБ из исследования являлись возраст младше 20 и старше 55 лет, наличие аллергии, тяжелых сопутствующих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза. Группу сравнения составили 15 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Материалом исследования являлась венозная кровь, взятая у здоровых доноров и у больных туберкулезом легких. Забор крови осуществлялся однократно, до начала курса противотуберкулезной химиотерапии, в момент разгара заболевания. Для выделения моноцитов из цельной крови с целью последующей их трансформации в макрофаги применяли метод магнитной сепарации CD14⁺ моноцитов (MACS MultiStand, Германия) согласно инструкции производителя Monocytes isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Германия).

Цельную венозную кровь в количестве 20 мл забирали в вакуумные системы с антикоагулянтом (К₃-ЭДТА). Кровь разводили 1 : 1 PBS (фосфатно-солевым буфером) и наслаивали на 15 мл фикола с плотностью 1,077 г/см³. Образцы центрифугировали 30 мин при 0,016 g. Полученную мононуклеарную фракцию собирали и 2 раза отмывали PBS. После этого добавляли 5 мл PBS, перемешивали, затем под-

считывали количество моноклеаров с помощью автоматического счетчика клеток Scepter 2,0 (Merck Millipore, Германия). Клеточную суспензию центрифугировали, снимали надосадок и из расчета количества клеток добавляли соответствующее количество MACS Separation Buffer (содержащий бычий сывороточный альбумин (БСА), ЭДТА и 0,09%-й азид) и CD14⁺ магнитных частиц (Micro Beads, Германия), инкубировали 40 мин. Полученная суспензия подвергалась позитивной магнитной сепарации по протоколу компании (Miltenyi Biotec, Германия).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ IN VITRO

Моноциты культивировали в полной питательной среде X-VIVO 10, With Gentamicin and Phenol Red (Lonza, Швейцария) в концентрации 1×10^6 клеток/мл с добавлением колониестимулирующего фактора макрофагов M-CSF (5 нг/мл; RnD Systems, США). Для дополнительной индукции клеток использовали рекомбинантные цитокины – IL-4 (10 нг/мл; PeproTech, США) (для M2-активации клеток) и IFN γ (100 нг/мл; PeproTech, США) (для M1-активации клеток). Пробы без дополнительной стимуляции и с добавлением цитокинов M1- и M2-активации культивировали в течение 6 сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и уровне CO₂ 7,5%.

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ

Фенотипирование макрофагов проводили на 6-е сут культивирования. Для сбора клеток плашку с культурой клеток помещали на лед и выдерживали 10 мин, затем с помощью клеточного скребка (Cell-scraper, США) собирали клетки. Для иммунофено-

типирования макрофагов добавляли моноклональные антитела к CD80, CD86, HLA-DR (eBioscience, США). Измерение образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США).

Для статистического анализа полученных результатов использовали программы SPSS Statistics 17.0 и Microsoft Excel. Данные представляли в виде $Me (Q_1-Q_3)$, где Me – медиана, Q_1-Q_3 – интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиля). Для выполнения сравнительного анализа применяли непараметрический критерий Манна – Уитни с введением поправки Бенджамини – Хохберга. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении экспрессии костимулирующих молекул B7 (CD80/86) и маркера активации HLA-DR на поверхности макрофагов было обнаружено, что количество макрофагов с экспрессией молекулы CD80 у больных ИТБ выше, чем в группе контроля и у больных ДТБ (табл. 1, рис. 1). У больных ДТБ оно было ниже, чем у здоровых доноров. Добавление в культуру клеток IFN γ у больных ИТБ сопровождалось увеличением экспрессии CD80, а внесение в культуру IL-4, напротив, ее снижением по сравнению со значением показателя в отсутствие стимуляции. При ДТБ уровень цитокин-индуцированной экспрессии CD80 существенно не отличался от нормы, но в отсутствие стимуляции был существенно ниже, чем у здоровых доноров.

Таблица 1

Экспрессия провоспалительных маркеров на макрофагах в зависимости от клинической формы заболевания у больных ТБ, %, $Me (Q_1-Q_3)$				
Маркеры макрофагов	Группы сравнения	При культивировании без стимуляции	При культивировании с IL-4	При культивировании с IFN γ
CD80	Здоровые доноры	23,11 (15,14–27,11)	15,25 (7,53–25,14)	20,32 (10,91–31,44)
	Больные ДТБ	12,23 (8,42–25,13) $p_1 = 0,012$	11,65 (8,01–26,13)	18,70 (9,34–28,27)
	Больные ИТБ	48,60 (24,17–51,14) $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,022$	41,61 (20,15–53,23) $p_1 = 0,015$ $p_2 = 0,031$	58,50 (28,73–70,35) $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,012$ $p_4 = 0,014$
CD86	Здоровые доноры	11,12 (8,52–28,01)	43,51 (32,53–54,55) $p_3 = 0,012$	23,22 (10,01–31,14) $p_3 = 0,016$ $p_4 = 0,025$
	Больные ДТБ	14,14 (9,37–21,52)	13,48 (4,73–19,04) $p_1 = 0,012$	15,52 (7,14–25,37) $p_1 = 0,013$

Окончание табл. 1

Маркеры макрофагов	Группы сравнения	При культивировании без стимуляции	При культивировании с IL-4	При культивировании с IFN γ
CD86	Больные ИТБ	16,54 (9,22–27,63)	19,12 (8,56–23,14) $p_1 = 0,021$	27,02 (15,23–39,14) $p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,015$ $p_4 = 0,034$
HLA-DR	Здоровые доноры	95,61 (76,66–98,73)	97,33 (85,41–98,43)	96,66 (76,32–99,32)
	Больные ДТБ	71,12 (51,33–83,72) $p_1 = 0,021$	57,71 (33,62–77,71) $p_1 = 0,022$ $p_3 = 0,025$	74,16 (42,74–84,23) $p_1 = 0,017$ $p_4 = 0,014$
	Больные ИТБ	75,44 (51,51–87,53) $p_1 = 0,012$	67,51 (45,63–78,42) $p_1 = 0,013$	62,51 (44,72–83,43) $p_1 = 0,024$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя в группе здоровых доноров – p_1 ; у больных ДТБ – p_2 ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции – p_3 ; при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) – p_4 .

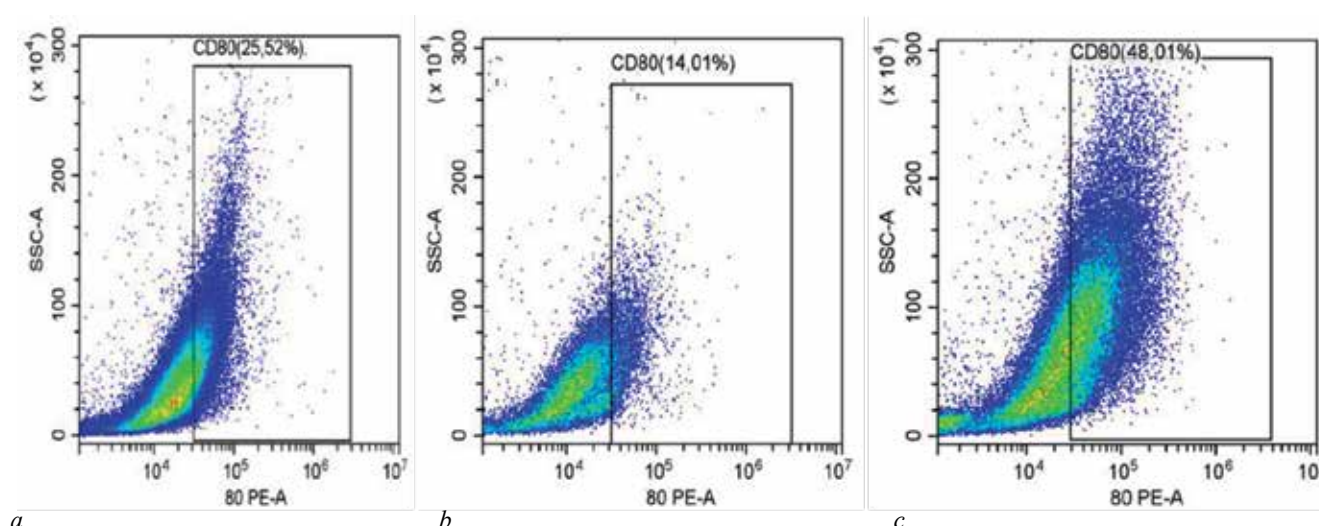


Рис. 1. Экспрессия CD80 на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %: а – здоровые доноры; б – больные ДТБ; с – больные ИТБ

Анализ экспрессии CD80 у больных ТБ в зависимости от чувствительности МБТ к ПТС выявил максимальное количество CD80⁺-макрофагов у больных лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТБ относительно их числа у здоровых доноров и больных лекарственно-чувствительным (ЛЧ) ТБ (табл. 2). При этом у больных ЛУ ТБ экспрессия CD80 на макрофагах, стимулированных цитокинами IL-4 и IFN γ была значимо выше, чем на нестимулированных клетках. У больных ЛЧ ТБ после индукции клеток IFN γ (M1-активация) число CD80⁺-макрофагов соответствовало таковому у здоровых доноров, но было в 1,9 раза выше, чем при стимуляции IL-4 (M2-активация) и без добавления цитокинов.

Различий по экспрессии молекулы CD86 макрофагами в отсутствие стимуляции рекомбинантными цитокинами у больных ТБ независимо от клиниче-

ской формы заболевания не выявлено (см. табл. 1, рис. 2). Экспрессия CD86 на макрофагах у здоровых доноров повышалась при добавлении в культуру клеток цитокинов: в 3,9 раза в ответ на индукцию IL-4 (M2-активация) и в 2,1 раза – на индукцию IFN γ (M1-активация) сравнительно с таковой без стимуляции. У больных ИТБ количество CD86-экспрессирующих макрофагов при индукции IFN γ было выше, чем при ДТБ, а также по сравнению с их численностью в отсутствие стимуляции и при индукции клеток IL-4 (она, напротив, снижалась) (см. табл. 1). Кроме того, при действии IFN γ увеличение экспрессии CD86 макрофагами отмечалось при ЛУ ТБ по сравнению с группой больных ЛЧ ТБ и у здоровых доноров, а также по сравнению с экспрессией маркера нестимулированными макрофагами и при индукции клеток IL-4 (см. табл. 2).

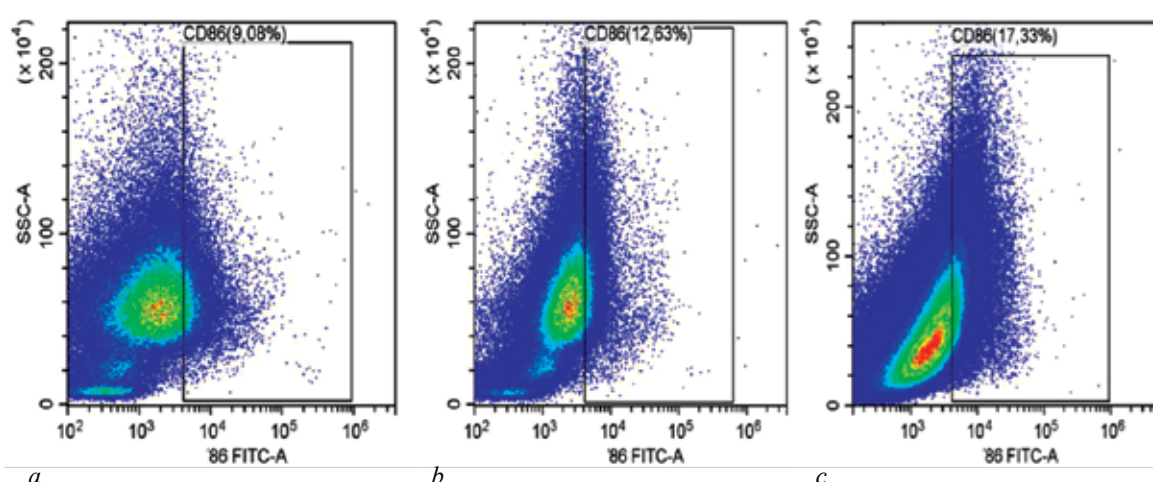


Рис. 2. Экспрессия CD86 на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %: *a* – здоровые доноры; *b* – больные ДТБ; *c* – больные ИТБ

Таблица 2

Экспрессия провоспалительных маркеров на макрофагах в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТС, %, $Me (Q_1-Q_3)$				
Маркеры макрофагов	Группы сравнения	При культивировании без стимуляции	При культивировании с IL-4	При культивировании с IFN γ
CD80	Здоровые доноры	23,11 (15,14–27,11)	15,25 (7,53–25,14)	20,32 (10,91–31,44)
	Больные ДТБ	11,01 (9,21–26,63) $p_1 = 0,041$	12,22 (10,02–28,41)	23,55 (11,5–34,24) $p_3 = 0,025$ $p_4 = 0,017$
	Больные ИТБ	51,22 (23,11–68,33) $p_1 = 0,015$ $p_2 = 0,022$	62,33 (37,21–71,42) $p_1 = 0,037$ $p_2 = 0,025$ $p_3 = 0,027$	61,22 (32,45–70,66) $p_1 = 0,026$ $p_2 = 0,022$ $p_3 = 0,011$
CD86	Здоровые доноры	11,12 (8,52–28,01)	43,51 (32,53–54,55) $p_3 = 0,010$	23,22 (10,01–31,14) $p_3 = 0,015$ $p_4 = 0,024$
	Больные ДТБ	14,02 (8,51–21,44)	13,54 (10,25–25,11) $p_1 = 0,031$	17,23 (10,32–28,55)
	Больные ИТБ	18,22 (9,25–30,45) $p_1 = 0,030$	25,23 (14,01–36,12) $p_1 = 0,042$ $p_2 = 0,010$	34,45 (18,23–41,56) $p_1 = 0,024$ $p_2 = 0,014$ $p_3 = 0,012$ $p_4 = 0,021$
HLA-DR	Здоровые доноры	95,61 (76,66–98,73)	97,33 (85,41–98,43)	96,66 (76,32–99,32)
	Больные ДТБ	69,23 (56,25–86,12) $p_1 = 0,012$	55,12 (43,22–75,23) $p_1 = 0,022$ $p_3 = 0,011$	66,23 (42,5–84,23) $p_1 = 0,031$ $p_3 = 0,015$
	Больные ИТБ	80,23 (59,12–94,54) $p_1 = 0,044$ $p_2 = 0,012$	76,12 (49,52–90,13) $p_1 = 0,034$ $p_2 = 0,012$	72,12 (57,32–86,42) $p_1 = 0,035$ $p_2 = 0,014$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя в группе здоровых доноров – p_1 ; у больных с ЛЧ ТБ – p_2 ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции – p_3 ; при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) – p_4 .

Анализ экспрессии маркера активации HLA-DR на макрофагах выявил ее снижение у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТС по сравнению с группой здоровых доноров (см. табл. 1, 2, рис. 3).

Максимальное снижение числа макрофагов, экспрессирующих HLA-DR, регистрировалось у больных ДТБ и ЛЧ ТБ после инкубации клеток с IL-4 по сравнению с их количеством при культивировании клеток без стимуляции и при индукции IFN γ .

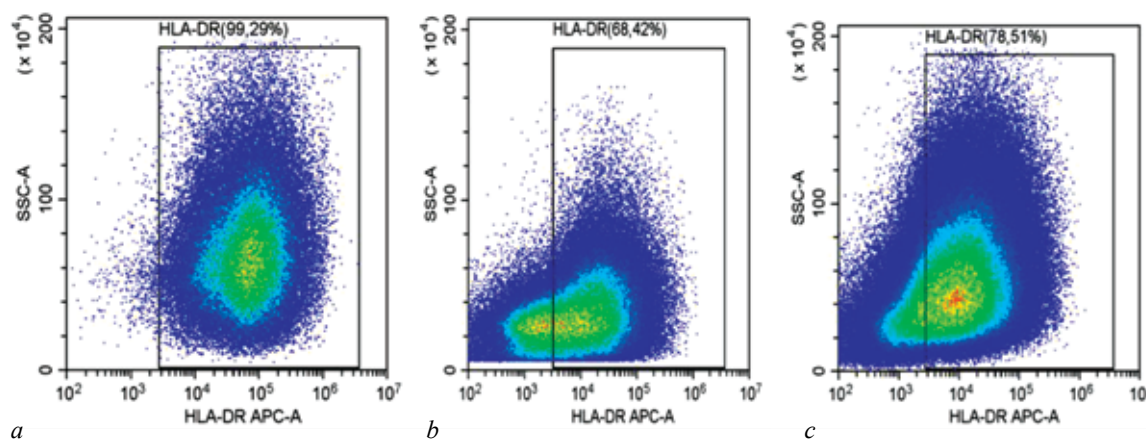


Рис. 3. Экспрессия HLA-DR на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %: а – здоровые доноры; б – больные ДТБ; с – больные ИТБ

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии провоспалительных маркеров – молекул костимуляции B7 (CD80, CD86) и маркера активации HLA-DR на макрофагах – показал, что у больных ДТБ и ИТБ, особенно при M2-активации клеток, снижается численность макрофагов, экспрессирующих молекулу HLA-DR, которая необходима для полноценной реализации их антигенпрезентирующей функции.

Интересно, что экспрессия на макрофагах молекул CD80 и CD86 у больных ТБ имела разнонаправленный характер. Так, при ИТБ мы наблюдали значительное увеличение числа CD80⁺-клеток, особенно при стимуляции IFN γ (при M1-активации), в то время как при ДТБ количество CD80⁺-макрофагов, напротив, снижалось (см. табл. 1, рис. 1). Отметим, что при ЛУ-варианте течения заболевания экспрессия молекулы CD80 резко повышалась как при M1-, так и при M2-активации макрофагов (см. табл. 2).

Что касается молекулы CD86, то ее экспрессия на нестимулированных макрофагах в целом не отличалась от показателей контрольной группы. Однако при M1-активации клеток у больных с инфильтративным и лекарственно-устойчивым ТБ она повышалась (см. табл. 1, 2). Можно предположить, что интенсивная экспрессия костимулирующей молекулы CD86 при дифференцировке макрофагов *in vitro* в направлении M1-клеток при ИТБ и ЛУ ТБ вызвана сохранением их провоспалительного по-

тенциала. В то же время необходимо учитывать естественную экспрессию CD86 на макрофагах, не зависящую от антигенной нагрузки и медиаторной стимуляции.

Известно, что костимулирующие молекулы CD80 и CD86 являются членами семейства B7 [12]. Маркеры CD80 и CD86 обнаружены не только на дендритных клетках, активированных В-лимфоцитах и макрофагах [13], но и на непрофессиональных антигенпрезентирующих клетках [14]. Молекула CD80, часто в тандеме с CD86, играет важную роль в регуляции как адаптивного, так и врожденного иммунного ответа. Эти молекулы являются лигандами для рецептора CD28 на наивных Т-лимфоцитах, и их взаимодействие – важный костимулирующий сигнал в иммунологическом синапсе между макрофагом и Т-клеткой, который приводит к активации, пролиферации и дифференцировке Т-лимфоцитов в необходимом направлении [15]. CD80 является ключевым маркером активации макрофагов, и в отсутствие антигенной нагрузки он не экспрессируется на клетках [16]. При воспалении взаимодействие макрофага через МНС-II с рецептором на Т-клетке приводит к активации CD80 [13].

HLA-DR конститутивно экспрессируется на моноцитах, макрофагах и дендритных клетках. Моноциты здоровых людей также экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR в высокой плотности. Ранее при исследовании дендритных клеток, трансформированных *in vitro* из моноцитов крови,

у больных ТБ мы показали усиленную генерацию толерогенных дендритных клеток (HLA-DR-негативных), ассоциированную с дисбалансом их цитокинсекреторной активности [17].

Экспрессия HLA-DR на моноцитах и макрофагах имеет ключевое значение для презентации микробных пептидов Т-клеткам, что способствует инициации адаптивного иммунного ответа [18]. Показана отрицательная роль снижения экспрессии HLA-DR на макрофагах. Моноциты и макрофаги со сниженной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антигенпрезентирующую функцию. Изменение экспрессии HLA-DR на моноцитах/макрофагах считается информативным маркером динамики иммунного ответа при критических состояниях [19]. Снижение численности HLA-DR-позитивных моноцитов описано при тяжелых травмах, в послеоперационном периоде, при остром панкреатите и ожоговой болезни [20, 21]. При развитии внутрибольничной инфекции снижение экспрессии на моноцитах HLA-DR опосредует развитие сепсиса [22].

Таким образом, установленное нами значительное снижение числа HLA-DR-позитивных клеток (особенно у больных ДТБ) (см. табл. 1, рис. 3) свидетельствует о нарушении механизма классической активации макрофагов и их антигенпрезентирующей и эффекторной функций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, изменения *in vitro* экспрессии на макрофагах молекул костимуляции CD80/CD86 у больных ТБ имеют разнонаправленный характер. При ДТБ и ЛЧ ТБ численность интактных (нестимулированных) CD80-позитивных макрофагов ниже, а при ИТБ и ЛУ ТБ – выше нормы, как в отсутствие стимуляции, так и при M2- и, особенно, M1-активации макрофагов. Последнее в сочетании с увеличением экспрессии молекулы CD86 при IFN γ -опосредованной M1-индукции макрофагов у больных ИТБ и ЛУ ТБ свидетельствует о повышении провоспалительной реактивности клеток при данных формах течения ТБ. Отсутствие повышения или, напротив, снижение экспрессии CD80 и CD86 на макрофагах в ответ на стимуляцию цитокинами у больных ДТБ и ЛЧ ТБ в сочетании с дефицитом экспрессии на клетках HLA-DR – ключевого маркера их провоспалительной активации – при обеих клинических формах ТБ вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя можно рассматривать как патогенетический фактор иммунного дисбаланса и проявление вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких, а также показатель неблагоприятного прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К., Воронкова О.В., Филинук О.В., Шилько Т.А. Патология иммунитета: причина или следствие туберкулезной инфекции? *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5 (2): 70–74.
2. Murray P., Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11 (11): 723–737. DOI: 10.1038/nri3073.
3. Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Чумакова С.П., Винс М.В., Береснева А.Е., Новицкий В.В. Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фенотип и функции (обзор). *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 142–154. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-142-154.
4. Swirski F.K., Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013; 339 (6116): 161–166. DOI: 10.1126/science.1230719.
5. Possamai L.A., Thursz M.R., Wendon J.A., Antoniadis C.G. Modulation of monocyte/macrophage function: a therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure. *J. Hepatol.* 2014; 61 (2): 439–445. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.03.031.
6. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.* 2011; 11: 2391–2402. DOI: 10.1100/2011/213962.
7. Hussell T., Bell T. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Immunol.* 2014; 14 (2): 81–93. DOI: 10.1038/nri3600.
8. Hoeffel G., Ginhoux F. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Immunology*. 2015; 6: 486. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00486.
9. Schenk M., Fabri M., Krutzik S.R., Lee D.J., Vu D.M., Sieling P.A., Montoya D., Liu P.T., Modlin R.L. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2014; 141 (2): 174–180. DOI: 10.1111/imm.12167.
10. Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32 (5): 593–604. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
11. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008; 1 (13): 453–461. DOI: 10.2741/2692.
12. Peyravian N., Gharib E., Moradi A., Mobahat M., Tarban P., Azimzadeh P., Nazemalhosseini-Mojarad E., Asadzadeh Aghdaci H. Evaluating the expression level of co-stimulatory molecules CD 80 and CD 86 in different types of colon polyps. *Curr. Res. Transl. Med.* 2018; 66 (1): 19–25. DOI: 10.1016/j.retram.2017.11.003.
13. Owen J., Punt J., Stranford S., Jones P., Kuby J. Kuby Immunology. New York: W.H. Freeman & Co., 2013: 574.
14. Scarpa M., Brun P., Scarpa M., Morgan S., Porzionato A., Kotsafti A., Bortolami M., Buda A., D'Inca R., Macchi V., Sturmiolo G.C., Rugge M., Bardini R., Castagliuolo J., Angriman I., Castoro C. CD80-CD28 signaling controls the progression of inflammatory colorectal carcinogenesis. *Oncotarget*. 2015; 6 (24): 20058–20069. DOI: 10.18632/oncotarget.2780.
15. Ganesan A., Moon T.C., Barakat K.H. Revealing the atomistic details behind the binding of B7–1 to CD28 and CTLA-4: A comprehensive protein-protein modelling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2018; 1862 (12): 2764–2778. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.08.010.

16. Wang L.X., Mei Z.Y., Zhou J.H., Yao Y.S., Li Y.H., Xu Y.H., Li J.X., Gao X.N., Zhou M.H., Jiang M.M., Gao L., Ding Y., Lu X.C. Low dose decitabine treatment induces CD80 expression in cancer cells and stimulates tumor specific cytotoxic T lymphocyte responses. *PLoS One*. 2013; 8 (5): e62924. DOI: 10.1371/journal.pone.0062924.
17. Urazova O.I., Churina E.G., Hasanova R.R., Novitskiy V.V., Poletika V.S. Association between polymorphisms of cytokine genes and secretion of IL-12p70, IL-18, and IL-27 by dendritic cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2019; 115: 56–62. DOI: 10.1016/j.tube.2019.02.003.
18. Zhuang Y., Peng H., Chen Y., Zhou S., Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2017; 22: 1344–1354. DOI: 10.2741/4547.
19. Venet F., Lukaszewicz A.C., Payen D., Hotchkiss R., Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* 2013; 25 (4): 477–483. DOI: 10.1016/j.coi.2013.05.006.
20. Monneret G., Venet F., Pachot A., Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.* 2008; 14 (1-2): 64–78. DOI: 10.2119/2007-00102.
21. Monneret G., Lepape A., Voirin N., Bohe J., Venet F., Debard A.L. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006; 32 (8): 1175–1183. DOI: 10.1007/s00134-006-0204-8.
22. Grimaldi D., Louis S., Pène F., Sirgo G., Rousseau C., Claessens Y. E., Vimeux L., Cariou A., Mira J. P., Hosmalin A., Chiche J.D. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock intensive care. *Med.* 2011; 37 (9): 1438–1446. DOI: 10.1007/s00134-011-2306-1.

Вклад авторов

Чурина Е.Г. – разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи. Ситникова А.В. – пробоподготовка биоматериала, выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, написание и оформление текста рукописи. Уразова О.И. – материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, написание, оформление и перевод текста рукописи. Патышева М. Р. – выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, консультативная помощь при разработке дизайна исследования. Новицкий В.В. – консультирование соавторов по гематологическим аспектам исследования, корректировка текста рукописи. Степанова Е.П. – взаимодействие с пациентами, обеспечение забора биоматериала. Голубчиков П.Н. – взаимодействие с пациентами, консультирование соавторов по вопросам фтизиатрии и пульмонологии.

Сведения об авторах

Чурина Елена Георгиевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра органической химии, вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-8509-9921.

Ситникова Анжелика Владимировна, аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID 0000-0002-9457-8879.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID 0000-0002-9577-8370.

Патышева Марина Ринатовна, мл. науч. сотрудник, лаборатория биологии опухолевой прогрессии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; мл. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5758-7330.

Голубчиков Петр Николаевич, зам. гл. врача по медицинской части, Томский фтизиопульмонологический медицинский центр, г. Томск.

Степанова Екатерина Петровна, врач-фтизиатр, врач-пульмонолог, зав. отделением для больных туберкулезом органов дыхания, Томский фтизиопульмонологический медицинский центр, г. Томск.

(✉) Чурина Елена Георгиевна, e-mail: Lena1236@yandex.ru.

Поступила в редакцию 18.06.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Интернет-зависимость у подростков Центральной Сибири: анализ распространенности и структура потребляемого контента

Эверт Л.С.^{1,2}, Терещенко С.Ю.¹, Зайцева О.И.^{1,2}, Семенова Н.Б.¹, Шубина М.В.¹

¹ Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ФИЦ КНЦ СО РАН), Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера (НИИ МПС) – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г

² Хакасский государственный университет (ХГУ) им. Н.Ф. Катанова
Россия, 655000, Республика Хакасия, г. Абакан, ул. Хакасская, 68

РЕЗЮМЕ

Цель данного исследования – изучение распространенности интернет-зависимости (ИЗ) и структуры потребляемого контента у подростков Центральной Сибири.

Материалы и методы. С января по май 2019 г. обследованы 3 012 подростков (45,8% мальчиков и 54,2% девочек) в возрасте 12–18 лет (средний возраст $14,5 \pm 1,3$). Младшие подростки (12–14 лет) составили 52,5%, старшие (15–18 лет) – 47,5%. Особенности онлайн-поведения оценивались по шкале интернет-зависимости Чена (CIAS) в адаптации В.Л. Малыгина, К.А. Феклисова; величина общего CIAS-балла, равная 65 и выше, свидетельствовала о наличии интернет-зависимости.

Игровая зависимость оценивалась по шкале Game Addiction Scale for Adolescents, зависимость от социальных сетей – по шкале The Social Media Disorder Scale. Структура потребляемого контента оценена в общей выборке и двух возрастных группах. Полученные данные обработаны методами непараметрической статистики в программе Statistica 12. Количественные признаки представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}–Q_{75})$, бинарные признаки – как доля (%) и доверительный интервал. Значимость различий p для количественных показателей оценивалась по U -критерию Манна – Уитни, для бинарных признаков – по критерию χ^2 Пирсона. Различия между группами считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Общая распространенность ИЗ составила 6,9%, адаптивное пользование интернетом отмечалось у 49,4% подростков, неадаптивное – у 43,6%. Частота встречаемости интернет-зависимости увеличивается с возрастом: с 6,0% у подростков 12–14 лет до 8,0% – у подростков 15–18 лет ($p = 0,0324$). Потребляемый подростками контент включал игровую зависимость (11%), зависимость от социальных сетей (8,0%), смешанную (2,6%) и недифференцированную интернет-зависимость (2,8%). У младших подростков чаще формируется зависимость от онлайн-игр (12,2%), социальных сетей (9,3%) и смешанная (3,3%), у старших подростков – недифференцированная ИЗ (39,5%).

Заключение. Высокий уровень распространенности ИЗ у подростков Центральной Сибири подтверждает актуальность данной проблемы и свидетельствует о необходимости разработки профилактических мероприятий, направленных на сохранение здоровья детского подросткового населения.

Ключевые слова: подростки, интернет, интернет-зависимость, потребляемый контент.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-22032/18).

Соответствие принципам этики. Письменное информированное согласие на участие в исследовании было подписано родителями подростков младше 15 лет или самими школьниками в возрасте старше

15 лет. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН (протокол № 1 от 16.01.2019).

Для цитирования: Эверт Л.С., Терещенко С.Ю., Зайцева О.И., Семенова Н.Б., Шубина М.В. Интернет-зависимость у подростков Центральной Сибири: анализ распространенности и структура потребляемого контента. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 189–197. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-189-197>.

Internet addiction in adolescents in Central Siberia: analysis of prevalence and structure of consumed content

Evert L.S.^{1,2}, Tereshchenko S.Yu.¹, Zaitseva O.I.^{1,2}, Semenova N.B.¹, Shubina M.V.¹

¹ Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (KSC SB RAS), Research Institute of Medical Problems of the North – a separate unit of KSC SB RAS
3G, Partizana Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

² Khakass State University named after N.F. Katanov
68, Khakasskaya Str., Abakan, 655000, Republic of Khakassia, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the prevalence of Internet addiction (IA) and the structure of consumed content among adolescents in Central Siberia.

Materials and methods. From January to May 2019, 3,012 adolescents (45.8% of boys and 54.2% of girls) aged 12–18 years were examined (average age 14.5 ± 1.3 years). Younger adolescents (12–14 years old) accounted for 52.5%, and seniors (15–18 years old) accounted for 47.5%. Peculiarities of online behavior were evaluated according to Chen's Internet Addiction Scale (CIAS) adapted by V.L. Malygin and K.A. Feklisov; a total CIAS score of ≥ 65 indicated Internet addiction. Gambling addiction was rated according to the Game Addiction Scale for Adolescents, and addiction to social networks was rated according to the Social Media Disorder Scale. The structure of the consumed content was estimated in the overall sample and in two age groups. The data obtained were processed by non-parametric statistical methods using the Statistica 12.0 software. Quantitative characteristics are presented as the median and the interquartile range $Me (Q_{25} - Q_{75})$, binary signs are represented as a share (%) and the confidence interval. The significance of the differences (p) for quantitative indicators was evaluated by Mann – Whitney U -test and for binary characters by Pearson's χ^2 criterion. The differences between the groups were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results. The overall prevalence of IA was 6.9%, adaptive use of the Internet was observed in 49.4% of adolescents, non-adaptive use was registered in 43.6% of cases. The frequency of Internet addiction increases with age: from 6.0% in 12–14 year-old adolescents to 8.0% in 15–18 year-old adolescents ($p = 0.0324$). Content consumed by adolescents included gambling addiction (11%), addiction to social networks (8.0%), mixed IA (2.6%), and undifferentiated Internet addiction (2.8%). Younger adolescents are more often dependent on online games (12.2%), social networks (9.3%), and mixed IA (3.3%), while in older adolescents, undifferentiated IA is more often observed (39.5%).

Conclusion. High level of IA prevalence in adolescents in Central Siberia confirms the relevance of this problem and indicates the need to develop preventive measures aimed at maintaining child and adolescent health.

Keywords: adolescents, Internet, Internet addiction, consumed content.

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (No. 18-29-22032/18).

Compliance with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at the Research Institute of Medical Problems of the North (RI MPN) – a separate unit of the KSC SB RAS (Protocol No. 1 of 16.01.2019).

For citation: Evert L.S., Tereshchenko S.Yu., Zaitseva O.I., Semenova N.B., Shubina M.V. Internet addiction in adolescents in Central Siberia: analysis of prevalence and structure of consumed content. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 189–197. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-189-197>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема интернет-зависимости (ИЗ) во всем мире приобретает особую актуальность вследствие высокой распространенности и тенденции к увеличению, что требует незамедлительного решения, особенно в подростковой и молодежной среде [1–3]. Интернет является новейшим средством коммуникации, оказывающим на психику человека как позитивное, так и негативное воздействие [4], предъявляет особые требования к физическому и психическому здоровью современного человека [5].

По данным межнациональных эпидемиологических исследований, распространенность ИЗ у подростков европейских стран варьирует и составляет от 4,4% в Италии (адаптивное пользование интернетом (АПИ), или отсутствие интернет-зависимости, 83,4%; неадаптивное пользование интернетом (НПИ) 12,2%), 5,1% в Германии (АПИ 79,7%; НПИ 15,2%), 7,2% в Испании (АПИ 75,5%; НПИ 17,3%), 8,7% в Румынии (АПИ 68,9%; НПИ 22,4%) до 11,5% в Эстонии (АПИ 63,4%; НПИ 25,1%) [6]. В странах Азиатско-Тихоокеанского региона: 6,2% в Японии, 9,6% в Китае, 9,7% в Южной Корее, 14,1% в Малайзии, 16,4% в Гонконге и 21,1% на Филиппинах [7]. Распространенность интернет-аддикций у подростков российских регионов варьирует от 4,2% в Москве [8], 12,0% в Хабаровске [9], достигая 38% в ряде других регионов России [10]. В последние годы в России зафиксирована тенденция увеличения интернет-зависимых пользователей [11]. Значительный разброс показателей, полученных в разных странах, свидетельствует о том, что распространенность ИЗ обусловлена множеством причин, в т. ч. социальными и этнокультурными факторами, географическим регионом, страной и местом проживания (город или село), этнической принадлежностью, а также отсутствием единой методологии, различиями используемого диагностического инструментария и применяемых оценочных критериев [12].

Следует отметить, что большинство проведенных исследований содержат результаты изучения распространенности и структуры онлайн-поведения, нередко включают анализ психопатологических состояний и нарушений психоэмоционального статуса, но, к сожалению, не всегда описывают структуру потребляемого контента, в связи с чем затруднительно оценивать и сравнивать представленные данные. Вместе с тем изучение особенностей пребывания подростков в сети Интернет, безусловно, является важным аспектом в решении проблемы предупреждения

интернет-зависимости. Обзор большого числа исследований распространенности компьютерных игр среди молодежи и подростков по всему миру показал, что 0,2–12,3% обследованных соответствуют критериям игровой зависимости [13].

В последние годы отмечен и рост зависимости подростков от социальных сетей – от 1,6 до 34% (по данным различных авторов) [14]. Однако риски частого и длительного пребывания в социальных сетях для развития ИЗ остаются недостаточно исследованными, авторами используются различные методы скрининга и режимы отсечения, что затрудняет сравнение результатов по всем исследованиям.

Интернет-зависимость – это сложный многоаспектный феномен, не сводящийся исключительно к аддиктивному или зависимому поведению субъекта или к его социальным, психологическим и психофизиологическим особенностям [15]. Он обусловлен спецификой современной системы взаимоотношений молодых людей, в которой интернет является частью их субкультуры, а также индивидуально-типическими свойствами, детерминирующими интегративное развитие их личности [16], уровнем социальной напряженности, низким уровнем жизни и другими объективными причинами [17–19], но во всех случаях интернет – фон для их развития. Наиболее подверженными зависимости от компьютерных игр и интернета являются подростки [20, 21].

Исследованию частоты встречаемости ИЗ и структуры потребляемого контента с использованием четких критериев диагностики и валидных методик в целом в Российской Федерации и у подростков Сибирского региона в частности посвящено небольшое количество исследований, что затрудняет проведение сравнительного анализа результатов. В контексте приведенных данных исследование распространенности и структуры интернет-зависимости, особенностей потребляемого онлайн-контента у подростков различных регионов и разных возрастных групп является актуальным направлением научного поиска, конечная цель которого – обоснование и разработка эффективных методов коррекции и профилактики интернет-зависимого поведения у детского подросткового населения.

Целью данного исследования являлось изучение распространенности интернет-зависимости и структуры потребляемого контента у подростков Центральной Сибири. Были выдвинуты две гипотезы: 1) частота встречаемости и выраженность ИЗ будет ассоциирована с возрастом подростков; 2) структура потребляемого контента будет различной в разных возрастных группах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С января по май 2019 г. обследованы случайные выборки подростков 12–18 лет (мальчиков и девочек) – учащихся 10 общеобразовательных учебных заведений пяти районов г. Красноярска в количестве 3 012 человек (средний возраст $14,5 \pm 1,3$). Младшие подростки (12–14 лет) составили 52,5%, старшие (15–18 лет) – 47,5%.

Сбор необходимой информации проводился методом анкетирования после получения письменного информированного согласия на участие в исследовании родителей подростков младше 15 лет или самих школьников в возрасте старше 15 лет. Критериями включения в исследование были возраст 12–18 лет, постоянное место проживания в г. Красноярске, статус учащегося общеобразовательной школы, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения: возраст моложе 12 и старше 18 лет, проживание вне г. Красноярска, отсутствие статуса учащегося общеобразовательной школы, отказ от участия в исследовании. Все изучаемые показатели анализировались в целом во всей популяции обследованных подростков, а также в двух возрастных группах: 12–14 лет (1 580 человек) и 15–18 лет (1 432 человека).

Нами использовался терминологический аппарат, применяемый при проведении международных медико-социальных исследований нарушений онлайн-поведения у подростков [6]. Рассматривались три вида онлайн поведения: 1) адаптивное пользование интернетом, или adaptive internet use (AIU), при котором имеется минимальный риск интернет-зависимого поведения; 2) неадаптивное пользование интернетом, или Maladaptive Internet use (MIU), при котором имеется склонность к возникновению интернет-зависимого поведения; 3) патологическое пользование интернетом (ППИ), или pathological internet use (PIU), при котором имеется выраженный и устойчивый паттерн интернет-зависимого поведения, или интернет-зависимость.

Для верификации вида онлайн-поведения подростков применялась международно-принятая шкала интернет-зависимости Чена (CIAS) [22], адаптированная В.Л. Малыгиным и К.А. Феклисовым [23]. Критериями наличия интернет-зависимости были значения суммарного CIAS-балла по шкале Чена 65 баллов и более, при величине данного показателя в диапазоне 27–42 балла верифицировали АПИ, при величине 43–64 констатировали НПИ.

Анализ контент-структуры онлайн-поведения у подростков проводился с использованием русскоязычной версии опросника для оценки игровой зависимости Game Addiction Scale for Adolescents [24]

и опросника зависимости от социальных сетей The Social Media Disorder Scale [25]. В структуре потребляемого контента выделяли следующие виды: игровую зависимость, зависимость от социальных сетей, смешанную (наличие одновременно игровой зависимости и зависимости от социальных сетей) и недифференцированную интернет-зависимость (подростки с ИЗ, подтвержденной величиной суммарного CIAS-балла по шкале Чена, равной 65 и более, не имеющие игровой зависимости, зависимости от социальных сетей, но с преобладанием других видов онлайн деятельности).

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики в программе Statistica 12. Результаты анализа количественных признаков представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}-Q_{75})$; бинарные признаки – как доля (%) и доверительный интервал (ДИ), оцененный по методу Уилсона. Достигнутый уровень значимости различий p для количественных показателей определялся по U -критерию Манна – Уитни, для бинарных признаков – по критерию χ^2 Пирсона. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из всех включенных в обследование подростков опросник Чена заполнили 2 936 человек. Анализ шкальных оценок опросника позволил установить, что адаптивное пользование интернетом характерно для 49,4% (1451/2936) опрошенных, ДИ = 47,6–51,2%; неадаптивным пользованием интернета отличались 43,6% (1281/2936) подростков, ДИ = 41,9–45,4%. Патологическое пользование интернетом выявлено у 6,9%, (204/2936) обследованных, ДИ = 6,1–7,9%, эти подростки были идентифицированы как интернет-зависимые.

Анализ сетевого поведения с позиции возрастных различий продемонстрировал снижение адаптивного и рост патологического пользования интернетом (интернет-зависимости) с возрастом. Так, адаптивное пользование интернетом было характерно для 51,2% (786/1536) подростков 12–14 лет, ДИ = 48,7–53,7% и 47,5% (665/1400) обследованных 15–18 лет, ДИ = 44,9–50,1% ($p = 0,0469$). Частота встречаемости неадаптивных вариантов пользования интернетом была сопоставимой у подростков обеих сравниваемых групп: 42,8% (658/1536), ДИ = 40,4–45,3% у подростков младшей возрастной группы и 44,5% (623/1400), ДИ = 41,9–47,1% у обследованных старшей возрастной группы ($p = 0,3646$). Интернет-зависимых подростков оказалось больше в старшей

возрастной группе в сравнении с младшей: 8,0% (112/1400), ДИ = 6,7–9,5% против 6,0% (92/1536), ДИ = 4,9–7,3% ($p = 0,0324$).

Следует отметить выявленное нами отсутствие значимых различий доли (%) встречаемости в сравниваемых группах подростков с АПИ и НПИ, а также ППИ (свидетельствующего о наличии интернет-зависимости) по результатам сравнительного анализа ключевых симптомов интернет-зависимости (КСИЗ) и проблем, связанных с интернет-зависимостью, (ПИЗ) в возрастных группах 12–14 и 15–18 лет. В то же время анализ количественных значений шкал ключевых симптомов интернет-зависимости выявил наличие статистически значимых различий между вышеуказанными возрастными группами (таблица).

Таблица

Количественные значения показателей шкал ключевых симптомов интернет-зависимости в возрастных группах 12–14 и 15–18 лет, Me (Q_{25} – Q_{75})			
Показатель	Группы обследованных		p (U-критерий)
	12–14 лет ($n = 1\,579$)	15–18 лет ($n = 1\,442$)	
Суммарный балл по шкале ключевых симптомов интернет-зависимости (IA-Sym)	24,0 (19,0–30,0)	25,0 (20,0–30,0)	0,0507
Суммарный балл по шкале проблем, связанных с интернет-зависимостью (IA-RP)	17,0 (14,0–21,0)	17,0 (15,0–22,0)	0,0382
Общий CIAS-балл	42,0 (35,0–51,0)	43,0 (35,0–52,0)	0,0364

Анализ потребляемого подростками контента выявил наличие зависимости от онлайн-игр у 11,0% (331/3012) от общего числа обследованных, ДИ = 9,9–12,2%; зависимость от социальных сетей установлена у 8,0% (241/3012), ДИ = 7,1–9,0%; смешанная ИЗ – у 2,6% (79/3012), ДИ = 2,1–3,3% и недифференцированная ИЗ – у 2,8% (85/3012), ДИ = 2,3–3,5% подростков.

При анализе структуры потребляемого контента у подростков двух возрастных групп установлено, что игровая зависимость, зависимость от социальных сетей и смешанный вариант зависимости (сочетают общение в сети с играми) в значительной степени чаще регистрировались у подростков младшей возрастной группы (рис.). Подростки младшей возрастной группы отличались более высокими значениями количественных показателей игровой зависимости 10,0 (7,0–14,0) в сравнении со старшей группой 10,0 (7,0–13,0), $p < 0,0001$.

С возрастом у подростков происходит снижение интереса к интернет-играм: с 12,2% (193/1580), ДИ = 10,7–13,9% в младшей возрастной группе

до 9,6% (138/1432), ДИ = 8,2–11,3% – в старшей ($p = 0,0239$). Общение в социальных сетях занимает внимание большего числа младших подростков – 9,3% (147/1580), ДИ = 8,0–10,8% в сравнении со старшими – 6,6% (94/1431), ДИ = 5,4–8,0% ($p = 0,0057$). Подростки 12–14 лет характеризовались и большей встречаемостью смешанной интернет-зависимости (при которой имело место сочетание увлеченности интернет-играми с общением в социальных сетях) – 3,3% (52/1580), ДИ = 2,5–4,3% против 1,9% (27/1431), ДИ = 1,3–2,7% в группе старших подростков ($p = 0,0161$). Распространенность недифференцированной интернет-зависимости была сопоставимой в обеих возрастных группах: 34,3% (36/105), ДИ = 25,9–43,8% – в группе 12–14 лет и 39,5% (49/124), ДИ = 31,4–48,3% – в группе 15–18 лет ($p = 0,4143$) (см. рис.).

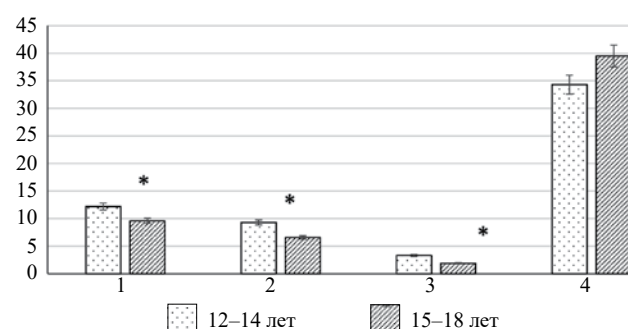


Рисунок. Частота встречаемости игровой зависимости (1), зависимости от социальных сетей (2), смешанной (3) и недифференцированной (4) интернет-зависимости у подростков младшей и старшей возрастной группы, %: * статистически значимые различия между группами

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами впервые в Центральной Сибири проведен широкомасштабный скрининг онлайн поведения подростков (3 012 человек), проанализированы возрастные особенности интернет-зависимости и потребляемого онлайн-контента. Интернет-зависимость выявлена у 6,9% подростков, адаптивное пользование интернетом было характерно для 49,4%, неадаптивное – для 43,6% обследованных. В проведенном исследовании подтверждена наша гипотеза о росте патологического пользования интернетом в популяции красноярских подростков с возрастом, в частности установлено, что более высокой встречаемостью интернет-зависимости отличаются подростки старшей возрастной группы (8,0%) в сравнении с младшей (6,0%, $p = 0,0324$). Данная тенденция подтверждалась и направленностью изменений количественных показателей анализируемых шкал: для старшей подростковой группы были характерны

более высокие значения шкальных оценок ключевых симптомов интернет-зависимости, а подростки младшей возрастной группы отличались более высокими количественными значениями суммарного балла игровой зависимости.

Вторым нашим предположением было наличие зависимости структуры потребляемого онлайн-контента от возраста. Результаты проведенного нами сравнительного анализа подтверждено, что особенности потребляемого онлайн-контента подростков младшей возрастной группы отличаются от старшей возрастной группы и включают большую частоту встречаемости игровой зависимости, зависимости от социальных сетей и смешанной интернет-зависимости, тогда как распространенность недифференцированной интернет-зависимости сопоставима в обеих возрастных группах.

По данным ряда исследований, проведенных в различных странах, распространенность ИЗ среди подростков варьирует от 1 до 18% и зависит от сравниваемых возрастных и этносоциальных групп, использованных опросников и критериев диагностики [26]. Так, в Европе ИЗ выявлена у 1–11% подростков, в среднем 4,4%, в США доля интернет-зависимых подростков в общей выборке составляет 0,3–8,1% [6, 27, 28]. По нашим данным, частота встречаемости ИЗ (6,9% в общей выборке) оказалась сопоставимой с распространенностью ИЗ у подростков Испании (7,2%) [6] и Японии (6,2%) [7], а в ряде случаев различалась с результатами скрининга в других странах. Так, установленная нами частота ИЗ у красноярских школьников была выше ее уровня у подростков г. Москвы и Московской области (4,2%) [8], Италии (4,4%) и Германии (5,1%) [6]. В то же время доля встречаемости ИЗ у обследованного нами контингента был ниже, чем в подростковых популяциях Румынии (8,7%) и Эстонии (11,5%) [6], в России – Хабаровска (12,0%) [9]. Исследованиями последних лет установлено, что в азиатских странах (Китай, Гонконг, Южная Корея и др.) распространенность ИЗ среди подростков и молодых взрослых значительно выше, чем в Европе и США – от 9 до 37,9 % [29, 30].

Полученные нами результаты оказались в целом ниже сведений, приводимых исследователями азиатских стран. Уровень верифицированной нами ИЗ у красноярских подростков оказался ниже показателей в Китае (9,6%), Южной Корее (9,7%), Малайзии (14,1%), Гонконге (16,4%) и на Филиппинах (21,1%) [7]. В своей работе мы сопоставили также структуру потребляемого контента у школьников г. Красноярска с аналогичными характеристиками онлайн-поведения подростков в других странах. Известно, что

основными компонентами структуры потребляемого контента у интернет-зависимых лиц является игровая зависимость и зависимость от социальных сетей. Изучение распространенности онлайн-игр среди молодежи многих стран мира показало, что частота встречаемости игровой зависимости в обследованных популяциях подростков и студентов составляет 0,2–12,3% [13, 16]. Численность школьников с игровой зависимостью в г. Красноярске (11% в общей выборке) оказалась сопоставимой с данными у подростков Хорватии (12,3%), но превышала показатели Великобритании (0,8%), Гонконга (0,9%), Дании (1,3%), Германии (2,2%), Соединенного Королевства (2,2%), Италии (2,6%), Сербии (3,1%), Норвегии (3,4%), Литвы (4,2%), Швеции (4,2%), Кипра (4,4%), Испании (4,6%), Финляндии (4,8%), Румынии (4,9%) и Албании (5,3%) [13].

Выявленная нами частота зависимости от социальных сетей у интернет-зависимых подростков Красноярска (8% в общей выборке) оказалась выше уровня данного показателя в Нигерии (1,6%), сопоставима с данными Перу (8,6%), но ниже данного показателя Китая (12%) и Гонконга (34%) [14], а также ниже уровня зависимости от социальных сетей у подростков Голландии (11%) [31].

Таким образом, все использованные нами психометрические инструменты (шкала CIAS, SMDS, GASA) показывают, что распространенность патологического использования интернета у городских подростков Центральной Сибири ниже, чем в большинстве азиатских стран, но превышает среднеевропейский уровень. Неоднозначность популяционных данных, полученных в разных странах, говорит о том, что показатели распространенности ИЗ зависят от многих причин, в том числе от социальных и этнокультурных факторов, методологии исследования, диагностического инструментария и оценочных критериев.

К настоящему времени предложено несколько этиопатогенетических моделей формирования интернет-зависимого поведения у подростков [32]. Отдельные исследователи предполагают наличие преимущественно нейробиологических факторов риска, ассоциированных с недостаточной зрелостью определенных отделов головного мозга подростка, что проявляется недостаточной эффективностью волевого контроля, высокой импульсивностью и чрезмерно активированной системой вознаграждений (reward circuitry) [33, 34]. Однако наиболее признанной большинством исследователей в настоящее время является «компонентная биопсихосоциальная модель», предполагающая комбинацию психосоциальных проблем (в особенности проблем во взаимо-

отношениях с родителями и сверстниками) и нейробиологических факторов риска [32, 35, 36].

В русле «компонентной биопсихосоциальной модели» формирования ИЗ у подростков, различия в ее распространенности могут быть объяснены как этнически детерминированным спектром секреции и рецепции нейромедиаторов, так и социокультурными особенностями популяций. Анализ доступной литературы показывает, что этническому фактору при анализе распространенности ИЗ уделяется недостаточное внимание. Так, в фундаментальном систематическом обзоре S.E. Luczak и соавт. [37], посвященном этническим различиям 11 форм аддиктивного поведения в классификации S. Sussman, M. Lisha и M. Griffiths, смогли найти только одно исследование (процитированное ранее в обзоре D.J. Kuss и соавт. [38]), учитывающее этнический фактор ИЗ.

T.M. Yates и соавт. [39] при обследовании 1 470 студентов колледжа с близкими социально-культурными условиями жизни и по единому протоколу смогли показать большую частоту интернет-зависимости у представителей азиатских национальностей (8,6%) в сравнении с неазиатскими представителями (3,8%). В этом же обзоре процитирован целый ряд источников, показывающих большую частоту зависимости от компьютерных игр у коренных жителей, негроидов Америки в сравнении с представителями белой расы [37].

В крупном мультицентровом (11 стран) Европейском исследовании интернет-зависимости у подростков была выявлена наиболее выраженная коморбидность с суицидальным поведением, депрессией и тревожностью, однако вклад каждого фактора коморбидности различался от страны к стране. Авторы делают вывод о необходимости дальнейших исследований в этом направлении с обязательным учетом социокультурных и, возможно, этнических (генетических) различий [40, 41]. С нашей точки зрения, анализ этногеографических различий интернет-зависимости с одновременным учетом этнических различий в распространенности этногенотипических особенностей популяций представляется очень перспективным направлением популяционной нейрогенетики аддикций у подростков, особенно в такой многонациональной стране, как Российская Федерация.

В настоящее время нами реализуется исследовательский проект «Интернет-зависимость у подростков Центральной Сибири: распространенность, контент-структура, этногеографические различия, психическая и соматическая коморбидность, нейромедиаторные ассоциации и генетические предикторы», поддержанный Российским фондом фундаментальных исследований, частью которого являются

представленные в настоящей статье данные. Проектом, в частности, предусматривается изучение распространенности различных по степени выраженности, паттерну аддикции и контенту вариантов интернет-зависимости у подростков крупных, этнически различающихся городов Центральной Сибири (г. Красноярск, Абакан, Кызыл). Кроме того, планируется исследование ассоциативной роли кандидатных нейромедиаторов и проведение популяционного анализа полиморфизмов генов-кандидатов окситоцин-, допамин-, серотонин-, норадреналин-, мелатонин- и никотинергических нейромедиаторных систем формирования ИЗ.

Разработанный для данного проекта дизайн исследования предполагает в дальнейшем проведение психо-нейробиологических сопоставлений, что в соответствии с высказанной нами гипотезой позволит выявить конкретные гены-предикторы и нейромедиаторы, соответствующие определенным паттернам сетевого поведения подростков с учетом этно-социальных особенностей популяций. Результаты исследования помогут открыть новые перспективы в оценке фундаментальных нейробиологических причин формирования интернет-зависимости и персонализации терапевтической тактики у интернет-зависимых подростков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшим направлением в настоящее время является современная эпидемиология интернет-зависимости, основанная на валидных диагностических подходах, с обязательным учетом региональных, возрастно-половых, этносоциальных факторов и спектра потребляемого контента. С этих позиций новизна проведенного нами исследования обусловлена тем, что впервые было проведено крупнейшее по объему выборки (включавшее тестирование 3 012 респондентов 12–18 лет) исследование распространенности интернет-зависимости у российских подростков с использованием валидизированного психометрического инструмента, позволяющего проводить кросс-национальные и кросс-социокультурные сравнения и разработанного специально для подросткового возраста «Теста интернет-зависимости Чена (шкала CIAS) в адаптации В.Л. Малыгина, К.А. Феклисова». Впервые были получены данные о распространенности ИЗ у городских подростков Центральной Сибири – патологическое интернет-зависимое поведение зарегистрировано у 6,9% несмещенной школьной выборки г. Красноярска.

Результаты нашего исследования демонстрируют достаточно высокую распространенность интернет-зависимости и пограничных форм онлайн-

поведения в подростковой среде, что подтверждает актуальность проблемы. Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения особенностей онлайн-поведения подростков и структуры потребляемого ими контента. Предметом дальнейших исследований, по нашему мнению, должно быть изучение интернет-зависимости с учетом половой и этнической принадлежности, особенностей региональных и экологических условий проживания, а также факторов риска ее формирования для оптимизации коррекционных и профилактических мероприятий в подростковой популяции пользователей интернета.

ЛИТЕРАТУРА

- Schneider L.A., King D.L., Delfabbro P.H. Family factors in adolescent problematic Internet gaming: a systematic review. *Journal of Behavioral Addictions*. 2017; 6 (3): 321–333. DOI: 10.1556/2006.6.2017.035.
- Moawad G.E., Ebrahim G.G.S. The relationship between use of technology and parent-adolescents social relationship. *Journal of Education and Practice*. 2016; 7 (14): 168–178.
- Ballarotto G., Volpi B., Marzilli E., Tambelli R. Adolescent internet abuse: A study on the role of attachment to parents and peers in a large community sample. *BioMed Research International*. 2018; Article ID 5769250: 10. DOI: 10.1155/2018/5769250.
- Azab H.M., Effat S.M.A., Aly H.Y., Mahmoud O.A.A.. Correlation of internet addiction with anxiety, depression and personality traits – Upper Egypt study. *Sohag Medical Journal*. 2019; 23 (1): 142–153. DOI: 10.21608 / smj.2019.41384.
- Сухотина Н.К. Психическое здоровье детей и определяющие его факторы. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2013; 5 (2): 16–22.
- Kaess M., Durkee T., Brunner R., Carli V., Parzer P., Wasserman C. Pathological Internet use among European adolescents: psychopathology and selfdestructive behaviours. *Eur. Child Adolesc. Psych.* 2014; 23 (11): 1093–1020. DOI: 10.1007/s00787-014-0562-7.
- Mak K.K., Lai C.M., Ko C.H., Chou C., Kim D.I., Watanabe H. et al. Psychometric properties of the Revised Chen Internet Addiction Scale (CIAS-R) in Chinese adolescents. *J. Abnorm. Child. Psychol.* 2014; 42 (7): 1237–1245.
- Малыгин В.Л., Хомерики Н.С., Антоненко А.А. Индивидуально-психологические свойства подростков как факторы риска формирования интернет-зависимого поведения. *Медицинская психология в России: электрон. науч. журн.* 2015; 7 (30): 7. URL: <http://mprj.ru> (дата обращения: 09.08.2019).
- Рагулина М.В. Эмоциональное неблагополучие интернет-зависимых подростков. *Научные тенденции: Педагогика и психология*. 2017. DOI: 10.18411/spc-04-12-2017-24.
- Титова В.В., Катков А.Л., Чугунов Д.Н. Интернет-зависимость: причины и механизмы формирования. *Диагностика, подходы к лечению и профилактике. Педиатр*. 2014; 5 (4): 132–139.
- Варламова С.Н., Гончарова Е.Р., Соколова И.В. Интернет-зависимость молодежи мегаполисов: критерии и типология. *Мониторинг общественного мнения*. 2015; 2 (125): 165– DOI: 18210.14515/monitoring.
- Pontes H.M., Kuss D., Griffiths M. Clinical psychology of Internet addiction: a review of its conceptualization, prevalence, neuronal processes, and implications for treatment. *Neuroscience and Neuroeconomics*. 2015; 4 (11): 23.
- Calado F., Alexandre J., Griffiths M.D. Prevalence of adolescent problem gambling: A systematic review of recent research. *J. Gambl. Stud.* 2017; 33: 397–424. DOI: 10.1007/s10899-016-9627-5.
- Online social network site addiction: A comprehensive review. 2015; 2 (2): 175–184.
- Вайнштейн А. Интернет-зависимость: диагностика, коморбидность и лечение. *Медицинская психология в России: электронный научный журнал*. 2015; 4 (33): 3. URL: <http://mprj.ru> (дата обращения: 12.08.2019).
- Хомерики Н.С. Индивидуально-психологические особенности подростков, склонных к интернет-зависимому поведению. *Психическое здоровье*. 2013; 5 (84): 49–51.
- Individual differences in implicit learning abilities and impulsive behavior in the context of Internet addiction and Internet Gaming Disorder under the consideration of gender. *Addictive Behaviors Reports*. 2017; 5: 19–28. DOI: 10.1016/j.abrep.2017.02.002.
- Internet gaming disorder: Trends in prevalence 1998–2016. *Addictive Behaviors*. 2017; 75: 17–24. DOI: 10.1016/j.addbeh.2017.06.010.
- Mindfulness facets and problematic Internet use: A six-month longitudinal study. *Addictive Behaviors*. 2017; 72: 57–63. DOI: 10.1016/j.addbeh.2017.03.018.
- Karacic S., Oreskovic S. Internet addiction through the phase of adolescence: A questionnaire study. *JMIR Mental Health*. 2017; 4 (2). Article e11. DOI: 10.2196/mental.5537.
- Reiner I.A., Tibubos N., Hardt J., Müller K., Wölfling K., Beutel M.E. Peer attachment, specific patterns of internet use and problematic internet use in male and female adolescents. *European Child and Adolescent Psychiatry*. 2017; 26 (10): 1257–1268. DOI: 10.1007/s00787-017-0984-0.
- Chen S.-H., Weng L.-J., Su Y.-J., Wu H.-M., Yang P.-F. Development of chinese internet addiction scale and its psychometric study. *Chinese Journal of Psychology*. 2003; 45: 251–266. DOI: 10.1037/t44491-000.
- Малыгин В.Л., Феклисов К.А. Интернет-зависимое поведение. Критерии и методы диагностики: учебное пособие. М.: МГМСУ; 2011: 32.
- Lemmens J.S., Valkenburg P.M., Peter J. Development and validation of a game addiction scale for adolescents. *Media Psychol.* 2009; 12 (1): 77–95. DOI: 10.1080/15213260802669458.
- Van den Eijnden R.J.J.M., Lemmens J.S., Valkenburg P.M. The social media disorder scale. *Computers in Hum. Behav.* 2016; 61: 478–487. DOI: 10.1016/j.chb.2016.03.038.
- Cerniglia L., Zoratto F., Cimino S., Laviola G., Ammaniti M., Adriani W. Internet addiction in adolescence: neurobiological, psychosocial and clinical issues. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2017; 76: 174–184. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.024.

27. Floros G., Fisoun V., Siomos K. Internet addiction in the island of hippokrates: impact of gender and age in teenage use and abuse of the internet. *European Psychiatry*. 2010; 25: 414. DOI: 10.1016/S0924-9338(10)70410-7.
28. Kuss D.J., van Rooij A., Shorter G.W., Griffiths M.D., van de Mheen D. Internet addiction in adolescents: Prevalence and risk factors. *Computers in Human Behavior*. 2013; 29 (5): 1987–1996. DOI: 10.1016/j.chb.2013.04.002.
29. Wang H., Zhou X., Lu C., Wu J., Deng X., Hong L. Problematic internet use in high school students in Guangdong Province, China. *PLoS One*. 2011; 6 (5). Article ID e19660. DOI: 10.1371/journal.pone.0019660.
30. Takahashi M., Adachi M., Nishimura T., Hirota T., Yasuda S., Kuribayashi M., Nakamura K. Prevalence of pathological and maladaptive Internet use and the association with depression and health-related quality of life in Japanese elementary and junior high school-aged children. *Soc. Psych. Psychiatr. Epidemiol.* 2018; 53 (12): 1349–1359. DOI: 10.1007/s00127-018-1605-z.
31. Jelenchick L.A., Hawk S.T., Moreno M.A. Problematic internet use and social networking site use among Dutch adolescents. *J. Adolesc. Med. Health*. 2016; 28 (1): 119–121. DOI: 10.1515/ijamh-2014-0068.
32. Cimino S., Cerniglia L. A longitudinal study for the empirical validation of an etiopathogenetic model of internet addiction in adolescence based on early emotion regulation. *BioMed Research International*. 2018; 2018: 4038541. DOI: 10.1155/2018/4038541.
33. Hong S.B., Zalesky A., Cocchi L., Fornito A., Choi E.J., Kim H.H., Suh J.E., Kim C.D., Kim J.W., Yi S.H. Decreased functional brain connectivity in adolescents with internet addiction. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e57831. DOI: 10.1371/journal.pone.0057831.
34. Kuss D.J., Lopez-Fernandez O. Internet addiction and problematic Internet use: A systematic review of clinical research. *World J. Psychiatry*. 2016; 6 (1): 143–176. DOI: 10.5498/wjp.v6.i1.143.
35. Griffiths M. A ‘components’ model of addiction within a biopsychosocial framework. *Journal of Substance Use*. 2005; 10 (4): 191–197. DOI: 10.1080/14659890500114359.
36. Kim H.S., Hodgins D.C. Component model of addiction treatment: A pragmatic transdiagnostic treatment model of behavioral and substance addictions. *Front. Psychiatry*. 2018; 9: 406. DOI: 10.3389/fpsy.2018.00406.
37. Luczak S.E., Khoddam R., Yu S., Wall T.L., Schwartz A., Sussman S. Review: Prevalence and co-occurrence of addictions in US ethnic/racial groups: Implications for genetic research. *Am. J. Addict.* 2017; 26 (5): 424–436. DOI: 10.1111/ajad.12464.
38. Kuss D.J., Griffiths M.D., Karila L., Billieux J. Internet addiction: a systematic review of epidemiological research for the last decade. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 (25): 4026–4052. DOI: 10.2174/13816128113199990617.
39. Yates T.M., Gregor M.A., Haviland M.G. Child maltreatment, alexithymia, and problematic internet use in young adulthood. *Cyberpsychol. Behav. Soc. Netw.* 2012; 15 (4): 219–225. DOI: 10.1089/cyber.2011.0427.
40. Durkee T., Carli V., Floderus B., Wasserman C., Sarchiapone M., Apter A., Balazs J.A., Bobes J., Brunner R., Corcoran P., Cosman D., Haring C., Hoven C.W., Kaess M., Kahn J.P., Nemes B., Postuvan V., Saiz P.A., Varnik P., Wasserman D. Pathological internet use and risk-behaviors among European adolescents. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016; 13 (3). DOI: 10.3390/ijerph13030294.
41. Kaess M., Parzer P., Brunner R., Koenig J., Durkee T., Carli V., Wasserman C., Hoven C.W., Sarchiapone M., Bobes J., Cosman D., Varnik A., Resch F., Wasserman D. Pathological internet use is on the rise among European adolescents. *J. Adolesc. Health*. 2016; 59 (2): 236–239. DOI: 10.1016/j.jadohealth.2016.04.009.

Вклад авторов

Эверт Л.С. – анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи. Терещенко С.Ю. – разработка концепции и дизайна. Зайцева О.И. – обоснование рукописи. Семенова Н.Б. – окончательное утверждение для публикации рукописи. Шубина М.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания.

Сведения об авторах

Эверт Лидия Семеновна, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, клиническое отделение соматического и психического здоровья детей, НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск; профессор, кафедра общепрофессиональных дисциплин, ХГУ им. Н.Ф. Катанова, г. Абакан. ORCID 0000-0003-0665-7428.

Терещенко Сергей Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель клинического отделения соматического и психического здоровья детей, НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-1605-7859.

Зайцева Ольга Исаевна, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, лаборатория клинической патофизиологии, НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. ORCID 0000-0001-7199-2308.

Семенова Надежда Борисовна, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, клиническое отделение соматического и психического здоровья детей, НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-2790-7740.

Шубина Маргарита Валерьевна, мл. науч. сотрудник, клиническое отделение соматического и психического здоровья детей, НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-6724-1058.

(✉) Эверт Лидия Семеновна, e-mail: lidiya_evert@mail.ru.

Поступила в редакцию 06.10.2019

Подписана в печать 25.12.2019

УДК 616-001.17-06:616.12

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-198-206>

Поражение сердца при ожоговой болезни (обзор литературы)

Ватутин Н.Т.^{1,2}, Игнатенко Г.А.¹, Тарадин Г.Г.^{1,2}, Ещенко Е.В.³, Гончарук М.С.^{1,2}, Куликова С.О.¹

¹ Донецкий национальный медицинский университет (ДонНМУ) имени М. Горького
Донецкая Народная Республика (Украина), 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16

² Институт неотложной и восстановительной хирургии (ИНВХ) имени В.К. Гусака
Донецкая Народная Республика (Украина), 283045, г. Донецк, пр. Ленинский, 47

³ Мирноградский центр первичной медико-санитарной помощи
Украина, 85323, г. Мирноград, ул. Соборная, 20

РЕЗЮМЕ

Обзор посвящен особенностям поражений сердечно-сосудистой системы при ожоговой болезни. Приведены эпидемиологические данные о распространенности термических поражений. Подробно рассмотрены патогенетические механизмы повреждения сердца в различные периоды ожоговой травмы, а также патоморфологические изменения миокарда. Выделены основные клинические проявления поражений сердца на фоне ожоговой болезни (сердечная недостаточность, миокардит, инфекционный эндокардит, нарушения ритма и проводимости сердца, инфаркт миокарда). Особое внимание уделено лабораторным и инструментальным методам исследования состояния сердца с обсуждением преимуществ и недостатков каждого метода. Рассмотрены основные терапевтические подходы ведения ожоговых больных с кардиальной патологией, а также возможности и эффективность использования современных методов лечения, направленных на улучшение выживаемости, выраженности сердечно-сосудистых нарушений и улучшение прогноза таких пациентов.

Ключевые слова: термические ожоги, ожоговая болезнь, сердце при ожоговой травме, сердечная недостаточность, патогенез, патоморфология, клиническая картина, диагностика, лечение.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Ватутин Н.Т., Игнатенко Г.А., Тарадин Г.Г., Ещенко Е.В., Гончарук М.С., Куликова С.О. Поражение сердца при ожоговой болезни (обзор литературы). *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 198–206. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-198-206>.

Cardiac disorders in burn injury

Vatutin N.T.^{1,2}, Ignatenko G.A.¹, Taradin G.G.^{1,2}, Eshchenko E.V.³, Goncharuk M.S.^{1,2}, Kulikova S.O.¹

¹ M. Gorky Donetsk National Medical University
16, Ilyicha Av., Donetsk, 283003, Donetsk People's Republic (Ukraine)

✉ Тарадин Геннадий Геннадьевич, e-mail: taradin@inbox.ru.

² V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery
47, Leninsky Av., Donetsk, 283045, Donetsk People's Republic (Ukraine)

³ Myrnodgrad Center for Primary Health Care
20, Sobornaya Str., Myrnodgrad, 85323, Ukraine

ABSTRACT

The presented review highlights the peculiarities of cardiovascular system damages in burn injury. The epidemiological data on the incidence of thermal injuries are reported. The pathogenic mechanisms of heart disorders during various periods of burn injury, as well as pathological changes in the myocardium are examined in detail. The main clinical manifestations of heart damage on the background of burn disease have been identified (heart failure, myocarditis, infectious endocarditis, cardiac arrhythmias and conduction disturbances, myocardial infarction). Special attention is paid to laboratory and instrumental methods for investigation of the heart with a discussion of the benefits and disadvantages of each method. The manuscript discusses the main therapeutic approaches for the management of burn patients with cardiac pathology, as well as the possibilities of using and the effectiveness of modern treatment methods aimed at improving survival, diminishing the severity of cardiovascular disorders and improving the prognosis of such patients.

Key words: thermic burns; burn injury; heart in burn trauma; heart failure; pathogenesis; pathomorphology; clinical picture; diagnosis; management.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors received no specific funding for this work.

For citation: Vatutin N.T., Ignatenko G.A., Taradin G.G., Eshchenko E.V., Goncharuk M.S., Kulikova S.O. Cardiac disorders in burn injury. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 198–206. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-198-206>.

ВВЕДЕНИЕ

Термические поражения представляют собой серьезную медицинскую, социальную и экономическую проблему. Это связано с высокой частотой ожоговых травм в быту, на производстве и в период военных конфликтов, сложностью и длительностью лечения таких больных, частой инвалидизацией и высокой летальностью. В 2004 г. 11 млн человек во всем мире обратились за медицинской помощью по поводу ожогов. Риск ожогов имеет тенденцию повышаться при снижении социально-экономического статуса, и до 90% ожогов происходит в странах с низким или средним уровнем дохода [1, 2]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире ежегодно регистрируется около 180 тыс. случаев летальных исходов, вызванных ожогами [1]. В Украине общая частота термических поражений также достаточно высока: 152 случая на 100 тыс. населения. В Российской Федерации за 2018 г. зафиксировано 251 480 ожогов, что составляет 171,2 случая на 100 тыс. населения [3].

При обширных и глубоких ожогах развивается клинически выраженная общая реакция организма, которая начинается с первых часов после получения

травмы и продолжается не только весь период существования ран, но и некоторое время после полного восстановления кожного покрова. Этот сложный комплекс взаимосвязанных патофизиологических изменений и клинических проявлений, возникающих в ответ на ожоговое поражение, именуется «ожоговая болезнь» [4].

Термическая травма сопровождается рядом отклонений и расстройств в деятельности организма в целом и со стороны сердца в частности. При обширных ожогах наблюдаются разнообразные по характеру морфологические изменения миокарда, снижается его сократительная способность, возникают различные нарушения ритма и проводимости, развивается сердечная недостаточность (СН). Так, по некоторым данным, при ожоговой болезни признаки миокардита выявляются у 20–40%, а аритмии и блокады сердца – примерно у 35% больных.

Повреждение сердца при ожоговой болезни на фоне существующих заболеваний сердечно-сосудистой системы может достигать значительной выраженности и быть не только причиной тяжелой СН, но и смерти пострадавших [5]. Так, наличие исходно у обожженных сердечно-легочной патологии

повышает риск развития инфаркта миокарда (ИМ) или смерти более чем в 6 раз. Тем не менее, несмотря на высокий уровень ожогов и при этом частое поражение сердца, особенности кардиальной патологии в литературе освещены весьма скудно, недостаточно представлены данные о патофизиологических событиях, современных методах диагностики и лечения.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Ожоговая болезнь имеет сложный многокомпонентный патогенез, отдельные звенья которого приобретают преобладающее значение в различные временные отрезки после получения ожога. В первые сутки после ожоговой травмы развиваются гиповолемия, гемодинамические сдвиги и нарушения микроциркуляции, затем наступает выраженная интоксикация (первые 1–2 нед) и в дальнейшем – инфекционные осложнения. В связи с этим в течении ожоговой болезни выделяют четыре периода: ожоговый шок (первые 3–5 сут), острая ожоговая токсемия (5–10 сут), септикотоксемия (с 11-х сут до полного заживления ран) и период реконвалесценции.

В первые часы ожоговой травмы, еще при отсутствии массивных сдвигов в водных пространствах организма, тяжесть состояния больного связана с болевым синдромом и психоэмоциональным стрессом, которые служат пусковым механизмом к нейроэндокринному ответу. Первичная реакция происходит на уровне спинальных нервно-рефлекторных дуг с раздражением симпатической нервной системы и выбросом в сосудистое русло катехоламинов, что приводит к спазму сосудов, повышению общего периферического сосудистого сопротивления, централизации кровообращения. Это, в конечном итоге, обуславливает возникновение гипоксии периферических тканей и ацидоза.

Это состояние усугубляется нарушением функции внешнего дыхания (уменьшением дыхательного объема и жизненной емкости легких), что, в свою очередь, обуславливает снижение насыщения крови кислородом и оксигенации тканей, накопление недоокисленных продуктов обмена, развитие респираторного и метаболического ацидоза. Одновременно происходит непродолжительное увеличение ударного и минутного объема сердца, повышение артериального давления (АД), которые в последующем, по мере нарастания гиповолемии, начинают снижаться.

Отмечается повышение свертываемости крови, возникают микротромбозы, нарушается микроциркуляция, что усугубляет тканевую гипоксию и ацидоз, на фоне чего происходит паралитическое расширение капилляров, нарастают микроциркуляторные и электролитные нарушения. В дальнейшем

развивается патологическая деполяризация клеточных мембран кардиомиоцитов с нарушением их проницаемости. Через несколько часов после ожога развивается выраженный шок, обусловленный падением преднагрузки при развитии отека обожженных тканей [6].

Сразу же после ожога угнетается функция сердца за счет провоспалительного эффекта интерлейкина (IL) 1В и фактора некроза опухоли α (TNF α), который может блокироваться нокаутом CD14 или замедляться с помощью блокаторов нуклеарного фактора каппа В [7]. Через 2 сут после ожога развивается тахикардия с повышением сердечного выброса (СВ), а в миокарде – выраженное воспаление благодаря β -адренергическому воздействию [8]. Снижение фракции выброса правого желудочка [9], наблюдаемое после эндотоксемии, может нивелироваться за счет блокады тромбоксана. Изначально после наблюдаемого увеличения общего сосудистого сопротивления в катаболическую фазу при системном воспалении и сепсисе наступает вазоплегия, что усугубляет кардиогенный и перераспределительный шок, приводя к мультиорганной недостаточности.

Установлено [10], что при ожоговой травме вследствие ацидоза в кардиомиоцитах повышается содержание цитозольного кальция, увеличивается секреция этими клетками провоспалительных цитокинов, активируются процессы апоптоза и аутофагии. Повреждение миокарда при ожоговой болезни приводит к нарушению его сократительной способности и развитию СН. Воспалительные цитокины (TNF α , IL-6) способствуют развитию диастолической дисфункции левого желудочка (ЛЖ).

В момент термического воздействия на кожу происходит разрушение и повреждение огромного количества клеток с высвобождением массы различных биологически активных веществ – медиаторов воспаления (кининов, серотонина, гистамина, острофазовых белков, факторов комплемента и др.). Все они обладают вазоактивным действием и значительно увеличивают проницаемость сосудистой стенки. У ожоговых больных метаболический дисбаланс наряду с расстройствами эндокринной, респираторной систем и психоэмоционального статуса оказывают негативное влияние на сердечно-сосудистую систему [11].

Еще одним механизмом повреждения миокарда при ожоговой болезни является гиперпродукция активных форм кислорода и липидных радикалов. Избыток свободных радикалов вызывает нарушение проницаемости мембран кардиомиоцитов, изменение ионного гомеостаза, повреждение их генетиче-

ского аппарата и активацию программированных механизмов гибели клетки [12].

Дисбаланс кислотно-основного состояния и содержания электролитов (в частности, гипер- или гипокалиемия), характерный для ожоговой болезни, может приводить к возникновению различных нарушений проводимости и ритма сердца, включая жизнеопасные аритмии. В условиях деструкции тканей вследствие ожога, собственные белки пострадавшего приобретают свойства аутоантигенов. При этом антитела, которые вырабатываются в организме больного, взаимодействуют как с патологически измененными, так и с нормальными компонентами тканей, в частности с антигенными детерминантами кардиомиоцитов. Одним из механизмов развития аутоенсибилизации является образование ассоциаций тканевых и микробных антигенов, в которых микробная часть выступает в качестве адъюванта. Все эти процессы могут приводить к развитию ожоговых миокардитов.

В период ожоговой токсемии и септикотоксемии вследствие присоединения бактериальной флоры возможно и инфекционное поражение сердца. При этом могут развиваться миокардиты, перикардиты и инфекционные эндокардиты (ИЭ).

ПАТОМОРФОЛОГИЯ

О поражении сердца при ожоговой болезни свидетельствуют и морфологические исследования. У умерших в первые дни ожоговой болезни на секции обнаруживаются признаки расстройства кровообращения, отек межуточной и периваскулярной ткани, очаги белковой и жировой дистрофии. При аутопсии в периоде септикотоксемии ожоговой болезни размеры сердца оказывались увеличенными в поперечном направлении, стенки его становились дряблыми, полости растянутыми и были заполнены массивными пестрыми сгустками крови. При гистологическом исследовании такого миокарда обнаруживались распространенные дистрофические изменения, особенно выраженные в стенке ЛЖ, небольшие поля повреждения и мелкоочаговые некрозы миоцитов.

Патоморфологические изменения сердца в период септикотоксемии характеризуются распространенными дистрофическими поражениями и отеком межуточной и периваскулярной ткани миокарда. У лиц молодого и среднего возраста повреждения такого характера чаще всего возникали на фоне сепсиса. У пожилых людей, ранее страдавших сердечными заболеваниями, обширные дистрофические поражения миокарда обнаруживались и без генерализации инфекции.

КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

Существенное место в клинической картине поражения сердца при ожоговой болезни занимает СН. При небольших поражениях (до 10% общей площади поверхности тела, ОППТ) у пострадавших может наблюдаться лишь умеренная тахикардия и незначительное повышение АД. При более обширных и глубоких ожогах (свыше 10–15% ОППТ) в первом периоде ожоговой болезни нередко возникают одышка, приступы сердцебиения и боли в области сердца. Клинически выявляются акроцианоз, тахикардия и ослабление I тона у верхушки сердца. АД несколько повышается в эректильной фазе ожогового шока и снижается в торпидной. В некоторых (прогностически неблагоприятных) случаях уже в ранние сроки после термической травмы появляется стойкая артериальная гипотензия. У лиц, страдающих гипертонической болезнью, АД в период шока обычно понижается до нормальных цифр и нередко на протяжении всего последующего периода болезни остается на этом же уровне [4].

В периоде токсемии у пострадавших могут сохраняться одышка, сердцебиение и боли в области сердца. Часто на фоне тахикардии отмечаются систолический шум на верхушке, снижение АД, расширение границ сердца. В периоде септикотоксемии у обожженных часто развиваются миокардит, перикардит и эндокардит, что может быть одной из причин развития и прогрессирования СН. В этих случаях введение большого объема жидкости, используемое при лечении больных с ожогами, может усугубить их состояние за счет значительного увеличения пред- и постнагрузки.

Электролитный дисбаланс (гипер- или гипокалиемия), ишемия, ИМ, миокардит или фоновая патология сердца могут стать причиной различных нарушений ритма и проводимости у лиц с ожоговой болезнью. Эти изменения могут происходить в течение 6–8 ч после получения травмы, поэтому чем раньше будут начаты мероприятия, предупреждающие или компенсирующие их, тем больше вероятность благоприятного течения ожоговой болезни и меньшей частоты ее тяжелых осложнений [4].

Сравнительно редким, но весьма грозным осложнением ожоговой болезни является острый коронарный синдром, включая развитие ИМ. Описываются вазоспастические формы острой коронарной недостаточности при ожоговой болезни, в генезе которой рассматривают высвобождение эндогенного никеля, обладающего мощным вазоконстрикторным эффектом [13]. М. Caliskan и соавт. [14] продемонстрировали, что вазоконстрикция коронарных артерий и артериол возникает вследствие стрессовых факторов

и повышенной активности симпатического тонуса, характерных для ожоговых повреждений. В дальнейшем авторы обнаружили, что вазоконстрикция вызывает ухудшение систолической и диастолической функции ЛЖ, уменьшение резерва скорости коронарного кровотока, отражающее микроваскулярную дисфункцию при отсутствии обструкции или сужения просвета коронарных артерий [14].

В литературе также описаны случаи развития на фоне ожоговой травмы, стресс-индуцированной кардиомиопатии (такоцубо) с тяжелыми нарушениями гемодинамики. Результаты исследований подтвердили основную концепцию посттравматического поражения сердца как стресс-индуцированной кардиомиопатии и продемонстрировали потенциальную значимость стресса в ускорении смертельного исхода у пациентов с травмами и термическими ожогами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные тесты. Известно, что в течение первых 3–4 сут ожоговой болезни у пострадавших, как правило, наблюдается повышение калия в крови, что может быть причиной развития различных, в том числе и жизнеопасных, нарушений ритма и проводимости сердца.

Определение уровней тропонина используется в настоящее время в качестве стандартного биомаркера в диагностике ИМ и острого коронарного синдрома [15, 16]. При ожоговой болезни отмечается повышение в крови уровня маркеров повреждения миокарда, таких как сердечные тропонины и МВ-фракции креатинфосфокиназы. Степень их повышения отражает тяжесть повреждения миокарда. В этом контексте следует отметить, что повышение уровней тропонина возникает при воздействии широкого спектра некардиальных и кардиальных факторов, таких как физические упражнения на выносливость, сепсис и другие тяжелые заболевания, включая инсульт, тромбоэмболию легочной артерии [17], перикардит, миокардит, синдром такоцубо [18], острый коронарный синдром, острую СН, тахикардию и т.д. В качестве возможного механизма, ответственного за повышение уровня тропонина, предполагают, что TNF α повышает проницаемость клеточной мембраны в условиях стрессовых воздействий или воспаления [15].

В связи с вышеуказанными некардиальными причинами, многие авторы показали, что уровни тропонина могут быть увеличены при ожогах значительных размеров. Повышение уровня тропонина обычно происходит у пациентов с ожогами, поражающими $\geq 15\%$ ОППТ, и в течение первых 3 сут после травмы. В исследовании A. William и соавт. [15] ни

у одного пациента с ожогами $<20\%$ ОППТ не было отмечено повышения уровня тропонина, несмотря на сопоставимые возрастные, весовые и половые характеристики с теми больными, у кого распространенность ожогов превышала 20% ОППТ. Были предоставлены данные проспективного исследования, обнаружившие корреляцию между повышенными уровнями тропонина Т и регионарными нарушениями движения стенки ЛЖ у пациентов с ожоговой площадью $>20\%$ ОППТ. Ни у одного больного с выявленными региональными нарушениями движения стенок ЛЖ не было отмечено нормального уровня кардиального тропонина. Примечательно, что в экспериментальных исследованиях и у больных ожоговой болезнью выявлено снижение уровня тропонина после хирургической эскартомии (хирургического иссечения ожогового струпа) [15].

Концентрация мозгового натрийуретического пептида и его предшественника (NT-proBNP) в плазме крови отражает степень гемодинамической нагрузки на сердце. Есть предположения, что эти показатели могут быть использованы для оценки прогноза у обожженных больных, находящихся в крайне тяжелом состоянии. Так, уровень NT-proBNP тесно коррелирует с размером ожоговой поверхности, степенью задержки жидкости, тяжестью органной недостаточности и показателями смертности. Кроме того, определение уровня мозгового натрийуретического пептида в сыворотке крови считается достаточно простым и информативным методом выявления СН у пациентов с тяжелыми ожогами во время проведения реанимационных мероприятий при шоке.

Электрокардиограмма (ЭКГ). На ЭКГ могут определяться снижение вольтажа, синусовая тахикардия, различные нарушения ритма (фибрилляции и трепетание предсердий, экстрасистолы, наджелудочковая и желудочковая тахикардия, фибрилляция желудочков), нарушения проводимости и патологические изменения начальной и конечной части желудочкового комплекса. Нередко наблюдается увеличение дисперсии интервала QT, причем отмечается тесная корреляция этого показателя с тяжестью поражения сердца. Что касается variability сердечного ритма, определяемого при суточном мониторинге ЭКГ, установлено, что отклонение показателей от нормы у пациентов в ранний послеожоговый период является мощным предиктором смертельного исхода [19, 20]. При ожоговой травме наблюдается угнетение волновой структуры сердечного ритма и показателей общей мощности спектра [21]. S.Y. Joo и соавт. [20] выявили у пациентов с ожогами преобладание симпатической активности автономной

нервной системы в дневное время и снижение парасимпатической – ночью.

Эхокардиография, как трансторакальная, так и трансэзофагеальная (ТЭЭ), имеет важное диагностическое значение у тяжелых больных, поскольку позволяет оценить структуру и функцию миокарда, уточнить причины СН. По результатам систематического обзора, посвященного значимости применения ТЭЭ у 128 ожоговых больных, основными патологическими находками при применении этого метода являлись ухудшение систолической и диастолической функции ЛЖ, обнаружение вегетаций на клапанах сердца, легочной гипертензии, перикардiallyного выпота и правожелудочковой СН.

Преимущества ТЭЭ над трансторакальной эхокардиографией обусловлены возможностью более точной оценки функции клапанного аппарата, сократительной способности миокарда и, возможно, наиболее важным, мониторинга адекватности острого гемодинамического восстановления и преднагрузки в острую фазу реанимационных мероприятий. ТЭЭ особенно информативна в оценке структуры клапанного аппарата сердца для подтверждения или исключения ИЭ и его осложнений благодаря близости расположения высокочастотного ультразвукового датчика к сердцу. Учитывая восприимчивость ожоговых пациентов к локальным и общим инфекционным осложнениям, ИЭ может развиваться у любого больного независимо от площади ожогового поражения. Тем не менее необходимо тщательное обсуждение показаний для проведения ТЭЭ, учитывая относительную инвазивность метода, нередкое термическое поражение ротовой полости и глотки, несчастую, но существующую вероятность разрыва пищевода и риск bacteriemia.

Коронарография используется у больных с клиникой острого коронарного синдрома или острого ИМ, которые, как уже отмечалось, могут развиваться на фоне ожоговой болезни.

ЛЕЧЕНИЕ

Помимо соответствующей обработки ожоговых ран, в период шока лечение ожоговой болезни включает в себя купирование болевого синдрома и возбуждения больного, устранение гиповолемии, восполнение объема циркулирующей крови, стабилизацию гемодинамики, коррекцию метаболических нарушений и борьбу с инфекцией [22].

Боль во время процедур усложняет ведение больных и приводит к использованию мощных методов лечения, таких как использование сильных опиоидов, кетамин и местной или общей анестезии. К сожалению, высокие дозы опиоидов имеют ряд серьез-

ных недостатков, в частности угнетение сознания и дыхания, риск развития делирия, артериальной гипотензии и нередко кишечной непроходимости. Таким образом, существует обоснованная необходимость в снижении доз опиатов, вводимых на протяжении всего лечения, и в то же время в обеспечении переносимого болевого порога [23]. Показано, что внутривенное введение лидокаина, начиная с болюсной дозы (1 мг/кг) и затем в виде непрерывной инфузии (180 мг/ч), практически не сопровождалось побочными эффектами и позволило на 25% снизить дозировку опиоидных анальгетиков [23].

Учитывая массивные объемы трансфузий растворов в этот период, рекомендуется проводить инотропную поддержку миокарда допамином в дозе 5–10 мг/кг/мин. В такой дозировке допамин улучшает сократимость миокарда и увеличивает СВ. При появлении признаков застойной СН следует сократить объем инфузионной терапии и назначить диуретики.

В лечении ожоговой токсемии основными задачами являются детоксикация, борьба с инфекцией и коррекция гомеостаза [22]. Необходимо проведение своевременной и адекватной коррекции кислотно-основного состояния и электролитного дисбаланса, возникающих у больных с тяжелой ожоговой травмой. При развитии жизнеопасных нарушений ритма и проводимости (фибрилляция желудочков, желудочковая тахикардия, асистолия, электромеханическая диссоциация, некоторые формы наджелудочковых тахикардий) проводят активную антиаритмическую терапию и осуществляют неотложные реанимационные мероприятия. Плановая антиаритмическая терапия назначается в тех случаях, когда возникающая аритмия или блокада сердца существенно не влияет на состояние больного. Так, при синусовой тахикардии обычно применяют β -адреноблокаторы (пропранолол, бисопролол) или антагонисты кальция (верапамил, дилтиазем).

Для терапии гемодинамически значимой синусовой брадикардии применяют атропин (0,5–2,0 мг), изопrenalin (2–20 мкг/мин внутривенно) или электрокардиостимуляцию.

Экстрасистолия обычно не требует активной антиаритмической терапии, поскольку прогноз при этой форме аритмии целиком зависит от основного процесса и степени органического поражения сердца. Антиаритмические препараты II и III классов, омакор используют для устранения экстрасистол высоких градаций (парных, групповых, ранних), вызывающих нарушения гемодинамики у лиц с тяжелой кардиальной патологией (ИМ, миокардит, выраженная дисфункция ЛЖ).

Для устранения фибрилляции/трепетания предсердий применяют электрическую кардиоверсию или антиаритмические препараты (пропафенон, новокаинамид, амиодарон или соталол). При невозможности устранения фибрилляции предсердий для контроля частоты желудочкового ритма используют дигоксин, верапамил или β -адреноблокаторы. В связи с высоким риском тромбоэмболических осложнений, обсуждают вопрос о назначении антикоагулянтов.

Приступы атриовентрикулярной тахикардии купируют вагусными пробами, внутривенным введением аденозинтрифосфата (10–30 мг), аденозина (6–12 мг) или верапамила. Эффективны также чреспищеводная электрокардиостимуляция и электрическая кардиоверсия. Радикальным способом борьбы с этой аритмией считается радиочастотная катетерная абляция. Наиболее эффективным методом лечения острого коронарного синдрома и ИМ является urgentное чрескожное коронарное вмешательство с максимально быстрым восстановлением коронарного кровотока.

В последние годы активно изучается эффективность различных подходов к профилактике повреждения и дисфункции миокарда, возникающих вследствие ожогов. Рассматривается возможность применения с этой целью ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, препаратов, модулирующих ионные каналы, противовоспалительных агентов, антиоксидантов, метаболитических препаратов и кардиопротекторов. Активно дискутируется вопрос о назначении пропранолола взрослым больным, получившим термическую травму, с целью снижения гиперметаболического ответа [24–27].

Пропранолол успешно применяется для блокады эффектов эндогенных катехоламинов, которые участвуют в качестве первых медиаторов гиперметаболического ответа. На первых стадиях ожогового поражения уровень катехоламинов в крови повышен в 10 раз. Гипердинамический тип кровообращения, повышение уровня основного обмена и катаболизм белков скелетной мускулатуры в совокупности резко отрицательно действуют на организм больного. Эффекты пропранолола у ожогового больного включают понижение термогенеза, купирование или замедление тахикардии, уменьшение СВ и затрат энергии в состоянии покоя. Применяемая дозировка индивидуальна для каждого больного, однако снижение ЧСС на 20% вызывает уменьшение нагрузки на сердце и жировой инфильтрации (вторично к снижению периферического липолиза). Показано, что пропранолол усиливает внутриклеточную циркуляцию аминокислот, что приводит к уменьшению

атрофии мышечной ткани, тем самым увеличивая мышечную массу тела. Карведилол может обладать дополнительными преимуществами благодаря своим способностям блокировать α -адренорецепторы и удалять свободные радикалы [6].

Научно обоснованным является использование озонотерапии для лечения термических поражений. Медицинский озон обладает бактерицидным и анальгетическим действием, способствует улучшению микроциркуляции, нормализации иммунитета и оксидантно-антиоксидантного состояния крови и клеток. Имеются данные о том, что на фоне озонотерапии при тяжелой термической травме повышается функциональная активность миокарда и СВ, наблюдается антиаритмический эффект, уменьшается ишемия миокарда (с улучшением процессов реполяризации миокарда на ЭКГ), улучшаются гемодинамические показатели.

В ряде работ показано, что проведение раннего оперативного вмешательства (некротомия, некрэктомия, дермабразия с ксенопластикой, аутодермотрансплантация), оптимизация течения раневого процесса с использованием культуры фетальных эмбриональных человеческих фибробластов, стволовых клеток [28, 29], адекватная трансфузионная и антибактериальная терапия позволяют уменьшить количество осложнений ожоговой болезни и снизить летальность пациентов.

Показано благотворное влияние прослушивания музыки на течение ожоговой болезни. Так, по данным метаанализа [30], охватившего 17 рандомизированных контролируемых исследований и 804 пациента с ожоговой травмой, прослушивание музыки способствовало облегчению болевых ощущений, снижению тревожности и уменьшению частоты сердечных сокращений.

ПРОГНОЗ

Наиболее явные последствия термической травмы связаны с поражением кожных покровов. Тем не менее системные реакции, возникшие при ожоговой болезни, затрагивают многие органы и ткани, включая сердце, нередко обуславливая неблагоприятный исход в начале заболевания и оказывая отрицательное влияние в отдаленном периоде. Так, согласно данным J.M. Duke и соавт. [31], по сравнению с лицами без ожогов в анамнезе, пациенты, получившие термическую травму в возрасте старше 45 лет, в 1,46 раз чаще (95%-й доверительный интервал (95%-й ДИ): 1,36–1,56) и почти в 3 раза дольше (95%-й ДИ: 2,60–3,25) пребывали на стационарном лечении по поводу патологии сердечно-сосудистой системы.

Пациенты с ожогами в анамнезе чаще госпитализировались по поводу ишемической болезни сердца (1,21; 95%-й ДИ: 1,07–1,36), СН (2,29; 95%-й ДИ: 1,85–2,82), цереброваскулярной патологии (1,57; 95%-й ДИ: 1,33–1,84), а также имели более высокие показатели смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы (1,11; 95%-й ДИ: 1,02–1,20). Схожие данные были получены и среди детей, пострадавших от термической травмы в возрасте моложе 15 лет [32]. Так, по мнению L. Knowlin и соавт. [5], нарушения функций сердца у обожженных детей может сохраняться до двух лет после ожоговой травмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, следует подчеркнуть, что своевременная диагностика поражения сердца при ожоговой болезни, лечение и профилактика его возникновения, включающая коррекцию электролитных нарушений, адекватную антибиотикотерапию, применение препаратов, воздействующих на сердечно-сосудистую систему, позволяет улучшить качество лечения и уменьшить смертность таких больных.

ЛИТЕРАТУРА

- Ожоги. Информационный бюллетень. Всемирная организация здравоохранения. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/burns> (дата обращения: 06.03.2018).
- Greenhalgh D.G. Management of burns. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380 (24): 2349–2359. DOI: 10.1056/NEJMra1807442.
- Социально значимые заболевания населения России в 2018 г. Статистический сборник 2018 г. Министерства здравоохранения Российской Федерации. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-9>.
- Шабанов В.Э., Деменко В.В., Савин Ю.Н., Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Бобровников А.Э. Клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи пострадавшим с термической в чрезвычайных ситуациях. М., 2015: 2–37.
- Knowlin L., Reid T., Williams F., Cairns B., Charles A. Burn mortality in patients with preexisting cardiovascular disease. *Burns.* 2017; 43 (5): 949–955. DOI: 10.1016/j.burns.2017.01.026.
- Culnan D.M., Capek K.D., Sheridan R.L. Etiology and prevention of multisystem organ failure. *Total Burn Care.* 2018; 30: 307–317. DOI: 10.1016/b978-0-323-47661-4.00030-7.
- Nielson C.B., Duethman N.C., Howard J.M., Moncure M., Wood J.G. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. *J. Burn Care Res.* 2017; 38 (1): e469–481. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000355.
- Guillory A.N., Clayton R.P., Herndon D.N., Finnerty C.C. Cardiovascular dysfunction following burn injury: what we have learned from rat and mouse models. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (1): 53. DOI: 10.3390/ijms17010053.
- Coz Y.A., Aguinaga M.M., Buch K.P., Disselkamp M.A. Hospital and intensive care unit management of decompensated pulmonary hypertension and right ventricular failure. *Heart Fail Rev.* 2016; 21 (3): 323–346. DOI: 10.1007/s10741-015-9514-7.
- Hur J., Yang H.T., Chun W., Kim J.H., Shin S.H., Kang H.J., Kim H.S. Inflammatory cytokines and their prognostic ability in cases of major burn injury. *Ann. Lab. Med.* 2015; 35 (1): 105–110. DOI: 10.3343/alm.2015.35.1.105.
- Leung B., Younger J.F., Stockton K., Muller M., Paratz J. Cardiovascular risk profile in burn survivors. *Burns.* 2017; 43 (7): 1411–1417. DOI: 10.1016/j.burns.2017.07.010.
- Szczesny B., Brunyánszki A., Ahmad A., Oláh G., Porter C., Toliver-Kinsky T., Sidossis L., Herndon D.N., Szabo C. Time-dependent and organ-specific changes in mitochondrial function, mitochondrial DNA integrity, oxidative stress and mononuclear cell infiltration in a mouse model of burn injury. *PLoS One.* 2015; 10 (12): e0143730. DOI: 10.1371/journal.pone.0143730.
- Culnan D.M., Sood R. Coronary vasospasm after burn injury: first described case series of a lethal lesion. *J. Burn Care Res.* 2018; 39 (6): 1053–1057. DOI: 10.1093/jbcr/irx032.
- Caliskan M., Turk E., Karagulle E., Ciftci O., Oguz H., Kostek O., Moray G., Haberal M. Coronary flow velocity reserve in burn injury: a prospective clinical cohort study. *J. Burn Care Res.* 2016; 37 (5): 400–408. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000302.
- William A., Schneider H.G., Smith C., Cleland H. The incidence and significance of raised troponin levels in acute burns. *J. Burn Care Res.* 2018; 39 (5): 729–735. DOI: 10.1093/jbcr/irx020.
- Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J., Morrow D.A., White H.D.; ESC Scientific document group. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur. Heart J.* 2019; 24 (3): 237–269. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy462.
- Ватутин Н.Т. Тромбоз легочной артерии. Донецк, 2019: 193.
- Ватутин Н.Т., Тарадин Г.Г., Смирнова А.С., Эль-Хатиб М.А., Гриценко Ю.П., Борт Д.В., Картамышева Е.В., Гасендич Е.С. Синдром такоцубо: современное состояние проблемы. Обзор рекомендаций Ассоциации сердечной недостаточности Европейского общества кардиологов 2016. *Практична ангіологія.* 2016; 3 (74): 56–70.
- Loguidice M.J., Schutt R.C., Horton J.W., Minei J.P., Keeley E.C. Heart rate variability as a predictor of death in burn patients. *J. Burn Care Res.* 2016; 37 (3): e227–233. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000260.
- Joo S.Y., Hong A.R., Lee B.C., Choi J.H., Seo C.H. Autonomic nerve activity indexed using 24-h heart rate variability in patients with burns. *Burns.* 2018; 44 (4): 834–840. DOI: 10.1016/j.burns.2017.12.012.
- Пугачев М.И., Ливарский А.П., Салухов В.В., Ивченко Е.В., Харитонов М.А., Шустов С.Б. Вариабельность сердечного ритма как индикатор состояния пациентов с тяжелой ожоговой травмой. *Военно-медицинский журнал.* 2017; 8: 24–33.
- Lundy J.B., Chung K.K., Pamplin J.C., Ainsworth C.R., Jeng J.C., Friedman B.C. Update on severe burn management for the intensivist. *J. Intensive Care Med.* 2016; 31 (8): 499–510. DOI: 10.1177/0885066615592346.

23. Abdelrahman I., Steinvall I., Elmasry M., Sjöberg F. Lidocaine infusion has a 25% opioid-sparing effect on background pain after burns: a prospective, randomised, double-blind, controlled trial. *Burns*. 2020; 46 (2): 465–471. DOI: 10.1016/j.burns.2019.08.010.
24. Nuñez-Villaveiran T., Sanchez M., Millan P., Garcia-de-Lorenzo A. Systematic review of the effect of propranolol on hypermetabolism in burn injuries. *Med. Intensiva*. 2015; 39 (2): 101–113. DOI: 10.1016/j.medint.2014.08.002.
25. Brown D.A., Gibbons J., Honari S., Klein M.B., Pham T.N., Gibran N.S. Propranolol dosing practices in adult burn patients: implications for safety and efficacy. *J. Burn Care Res*. 2016; 37 (3): 218–226. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000240.
26. Guillory A.N., Herndon D.N., Silva M.B., Andersen C.R., Edgu-Fry E., Suman O.E., Finnerty C.C. Propranolol kinetics in plasma from severely burned adults. *Burns*. 2017; 43 (6): 1168–1174. DOI: 10.1016/j.burns.2016.10.019.
27. Manzano-Nunez R., Garcia-Perdomo H.A., Ferrada P., Ordoñez Delgado C.A., Gomez D.A., Foianini J.E. Safety and effectiveness of propranolol in severely burned patients: systematic review and meta-analysis. *World J. Emerg Surg*. 2017; 12: 11. DOI: 10.1186/s13017-017-0124-7.
28. Ahmadi A.R., Chicco M., Huang J., Qi L., Burdick J., Williams G.M., Cameron A.M., Sun Z. Stem cells in burn wound healing: A systematic review of the literature. *Burns*. 2019; 45 (5): 1014–1023. DOI: 10.1016/j.burns.2018.10.017.
29. Francis E., Kearney L., Clover J. The effects of stem cells on burn wounds: a review. *Int. J. Burns Trauma*. 2019; 9 (1): 1–12.
30. Li J., Zhou L., Wang Y. The effects of music intervention on burn patients during treatment procedures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Complement Altern. Med*. 2017; 17 (1): 158. DOI: 10.1186/s12906-017-1669-4.
31. Duke J.M., Randall S.M., Fear M.W., Boyd J.H., Rea S., Wood F.M. Understanding the long-term impacts of burn on the cardiovascular system. *Burns*. 2016; 42 (2): 366–374. DOI: 10.1016/j.burns.2015.08.020.
32. Duke J.M., Randall S.M., Fear M.W., Boyd J.H., Rea S., Wood F.M. Long-term effects of pediatric burns on the circulatory system. *Pediatrics*. 2015; 136 (5): e1323–1330. DOI: 10.1542/peds.2015-1945.

Сведения об авторах

Ватутин Николай Тихонович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии, ДонНМУ им. М. Горького; руководитель отдела кардиохирургии и неотложной кардиологии, ИНВХ им. В.К. Гусака, г. Донецк. ORCID 0000-0003-4307-1522.

Игнатенко Григорий Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. НАМНУ, зав. кафедрой пропедевтической и внутренней медицины, ДонНМУ им. М. Горького, г. Донецк. ORCID 0000-0003-3611-1186.

Тарадин Геннадий Геннадьевич, канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой терапии ФИПО им. проф. А.И. Дядька, ДонНМУ им. М. Горького; ст. науч. сотрудник, отдел кардиохирургии и неотложной кардиологии, ИНВХ им. В.К. Гусака, г. Донецк. ORCID 0000-0003-3984-8482.

Ещенко Евгения Викторовна, врач-терапевт, Мирноградский центр первичной медико-санитарной помощи, г. Мирноград. ORCID 0000-0001-9180-7827.

Гончарук Максим Сергеевич, ассистент, кафедра госпитальной терапии, ДонНМУ им. М. Горького, г. Донецк. ORCID 0000-0001-6345-0138.

Куликова Светлана Олеговна, студентка, 6-й курс, 2-й лечебный факультет, ДонНМУ им. М. Горького, г. Донецк. ORCID 0000-0001-9252-2452.

(✉) Тарадин Геннадий Геннадьевич, e-mail: taradin@inbox.ru.

Поступила в редакцию 11.11.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Виртуальные пациенты как база проблемно ориентированной подготовки врачей-кардиологов

**Карась С.И.^{1,2}, Аржанник М.Б.^{1,2}, Кара-Сал Э.Э.³, Гракова Е.В.¹, Васильцева О.Я.¹,
Усов В.Ю.¹, Ваизов В.Х.¹, Завадовский К.В.¹, Гуляев В.М.¹, Баев А.Е.¹, Колганов С.О.⁴,
Кочетков С.Б.⁴, Дацюк В.В.⁴, Корнеева Т.Б.⁵, Ноздрин Г.К.⁴**

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

⁴ Общество с ограниченной ответственностью (ООО) «Элекард-Мед»
Россия, 634055, пр. Развития, 3/539

⁵ Общество с ограниченной ответственностью (ООО) «Контек-Софт»
Россия, 634055, пр. Развития, 3

РЕЗЮМЕ

Виртуальные пациенты позволяют избежать рисков в отношении реального больного, неоднократно использовать стандартизованные клинические ситуации, обеспечить удаленный доступ к информации. Для создания виртуальных пациентов в команду проекта включены специалисты с компетенциями в разных предметных областях. Каждый виртуальный пациент является структурированной моделью лечебно-диагностического процесса реального больного, наполненной текстовой и мультимедийной информацией. Сформирована выборка из 50 архивных историй болезни пациентов с типичными сердечно-сосудистыми заболеваниями и редкими вариантами патологии. Текстовая информация из историй болезни дополнена мультимедийными результатами инструментальных и лабораторных исследований. Созданная база данных и знаний о виртуальных пациентах предназначена для демонстрации обучающимся завершённых случаев кардиоваскулярных заболеваний в линейной траектории с возможностью Web-доступа. Репозиторий виртуальных пациентов станет фактологической основой проблемно ориентированного дистанционного обучения студентов и врачей.

Ключевые слова: виртуальные пациенты, case-технологии, анализ прецедента, дистанционное обучение, стандартизация, мультимедиа, Web-сервис, геймификация, репозиторий, база данных, база знаний.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-013-00231).

Для цитирования: Карась С.И., Аржанник М.Б., Кара-Сал Э.Э., Гракова Е.В., Васильцева О.Я., Усов В.Ю., Ваизов В.Х., Завадовский К.В., Гуляев В.М., Баев А.Е., Колганов С.О., Кочетков С.Б., Дацюк В.В., Корнеева Т.Б., Ноздрин Г.К. Виртуальные пациенты как база проблемно ориентированной подготовки врачей-кардиологов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 207–214. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-207-214>.

Virtual patients as the basis for problem-based learning of cardiologists

**Karas S.I.^{1,2}, Arzhanik M.B.^{1,2}, Kara-Sal E.E.¹, Grakova E.V.¹, Vasil'tseva O.Y.¹, Ussov W.Y.¹,
Vaizov V.Kh.¹, Zavadovsky K.V.¹, Gulyaev V.M.¹, Baev A.E.¹, Kolganov S.O.³,
Kochetkov S.B.³, Datsuk V.V.³, Korneeva T.B.⁴, Nozdrin G.K.⁵**

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

² Siberian State Medical University
2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ National Research Tomsk Polytechnic University
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁴ Elecard-Med Ltd.
3/539, Razvitia Av., Tomsk, 634055, Russian Federation

⁵ Contek-Soft Ltd.
3, Razvitia Av., Tomsk, 634055, Russian Federation

ABSTRACT

Implementation of virtual patients allows avoiding risks for patient safety, using the standardized clinical situations repeatedly, and providing remote access to information. In order to create virtual patients, the project team comprised of specialists competent in the diverse subject areas. Every virtual patient is a structural model for a diagnostic and treatment process of a real patient augmented with textual and multimedia information. A sample comprising of 50 archival clinical charts of patients with typical cardiovascular diseases and rare pathology variants was formed. Textual information from medical records is supplemented with the multimedia results of instrumental and laboratory studies. Created data and knowledge base of virtual patients was designated for a demonstration of complete cardiovascular cases to the trainees in linear trajectory with an option of Web-access. The virtual patient repository will become a factual basis for problem-based distance learning of medical students and physicians.

Key words: virtual patients, case-based technologies, case study, distance learning, standardization, multimedia, Web-service, gamification, repository, database, knowledge base.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-013-00231).

For citation: Karas S.I., Arzhanik M.B., Kara-Sal E.E., Grakova E.V., Vasil'tseva O.Y., Ussov W.Y., Vaizov V.Kh., Zavadovsky K.V., Gulyaev V.M., Baev A.E., Kolganov S.O., Kochetkov S.B., Datsuk V.V., Korneeva T.B., Nozdrin G.K. Virtual patients as the basis for problem-based learning of cardiologists. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 207–214. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-207-214>.

ВВЕДЕНИЕ

Проблемно ориентированное обучение рассматривается в качестве одного из основных подходов в медицинском образовании, направленном на формирование навыков клинично-диагностических решений [1]. Эти профессиональные компетенции формируются именно в ходе решения разнообразных проблем, связанных с уровнем здоровья пациентов.

Для развития навыков принятия решений обучающийся должен непосредственно участвовать в лечении пациента, что может не совпадать с желанием больного, а также иметь определенные ограничения в условиях страховой медицины. Риски проблемно ориентированного обучения в медицинском вузе можно минимизировать использованием описания завершённых ранее случаев заболевания и симуля-

ционных методик, позволяющих избегать непосредственного контакта с пациентами.

За рубежом в медицинском образовании в качестве такой методики активно используются виртуальные пациенты (ВП). Термин имеет различные толкования: стандартизованные клинические случаи в исполнении актеров или добровольцев, компьютеризованные роботы, мультимедийные компьютерные модели клинических ситуаций. ВП могут служить базой для обучения, основанного на анализе прецедента и эффективно применяемого в клинических дисциплинах [2–4]. На базе историй болезни могут быть разработаны концепт-карты случаев, а затем созданы виртуальные пациенты для использования online [5].

В данном сообщении рассматривается разработка формата симуляции, используемого с конца XX в. за рубежом для формирования клинического мышления [6–8]. Компьютерные мультимедийные симуляции сценариев диагностики и лечения позволяют избежать риска неправильных или неправомерных действий в отношении реального больного. В систематических обзорах и метаанализах показаны педагогическая эффективность виртуальных пациентов и заинтересованность обучающихся в этой образовательной технологии [9–11]. Интерактивность обучающихся увеличивается, они мотивированы к работе в одной команде с определенной геймификацией клинической подготовки [12].

В дальнейшем под термином «виртуальный пациент» мы будем понимать компьютерные мультимедийные интерактивные симуляции сценариев диагностики и лечения больных [13]. Виртуальный пациент может иметь реальный деперсонализированный прототип, а может быть плодом фантазии разработчика, т.е. полностью виртуальным. Использование реальных сценариев лечебно-диагностического процесса (ЛДП), т.е. реальных прецедентных случаев, – один из подходов к созданию ВП. Включение в эту модель деперсонализированных сведений из истории болезни и мультимедийных результатов диагностических исследований приводит к виртуализации завершенных случаев заболевания и дает возможность обеспечить удаленный доступ к этой информации.

Целью данной работы является описание методики создания виртуальных пациентов как модели лечебно-диагностического процесса больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Команда проекта по созданию ВП состояла из врачей, лучевых и функциональных диагностов,

программистов и аналитиков. Виртуальный пациент является компиляцией текстовой и мультимедийной диагностической и клинической информации. При создании каждого виртуального пациента использовалось описание реального случая заболевания. Аналитическая работа позволила определить общую структуру представления информации о ВП, разработать дизайн пользовательского интерфейса и сценарии предъявления информации обучающимся.

Информационной основой проекта послужили 50 деперсонализированных архивных историй болезни пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и мультимедийные результаты диагностических исследований, хранящиеся в соответствующих базах данных. Кроме текстов завершенных историй болезни, использованы результаты и врачебные заключения относительно электрокардиографии (ЭКГ), Холтеровского мониторирования, эхокардиографии (ЭхоКГ), ультразвукового исследования (УЗИ) сонных, бедренных и почечных артерий, плевральной полости и перикарда, мультиспиральной компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии (МРТ) и ангиографии, рентгеновских исследований и лабораторной диагностики, а также лечебной тактики.

Полнота и непротиворечивость деперсонализированной информации о каждом случае заболевания оценены опытными преподавателями-клиницистами. После экспертной оценки информация передана аналитикам в виде текстовых согласованных шаблонов и файловых папок, именованных по определенной системе, для размещения в таблицах базы данных, реализованной в системе управления базами данных (СУБД) PostgreSQL. Мультимедийная модель представления информации о ВП разработана с использованием Web-технологий JavaScript (framework Vue.js) и Twitter bootstrap. База данных размещена на сервере с возможностью удаленного доступа к информации. Успешное выполнение проекта было предопределено наличием у специалистов команды компетенций в совершенно разных предметных областях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе создания виртуальных пациентов команде разработчиков необходимо ответить на ряд существенных вопросов относительно контента:

Откуда получить необходимую информацию?

Какая структура обеспечит создание целостного образа ВП?

Каковы траектории предъявления ВП пользователям?

При формировании выборки архивных историй болезни мы ориентировались на две категории диагнозов. В первую подгруппу вошли типичные случаи сердечно-сосудистых заболеваний, соответствующие наиболее часто встречающимся нозологиям. В рамках каждой нозологической единицы подобраны несколько случаев, отличающихся сопутствующей патологией и особенностями лечения. Часть историй болезни представляет стандартные случаи, они важны для подготовки ординаторов и неопытных врачей; другая часть дает врачу возможность проявить творческий подход и представляет интерес для повышающих свою квалификацию специалистов.

Вторая подгруппа пациентов представляла нечасто наблюдаемые варианты кардиологической патологии, которые, однако, способны привести пациента к серьезным последствиям. Выбраны наиболее интересные случаи с редкой клинической картиной, показать которые обучающимся маловероятно. Все истории болезни, включенные в выборку, были деперсонализированы.

Следующим этапом была проведена селекция большого количества текстовой информации, содержащейся в истории болезни. Безусловно, описание анамнеза жизни, заболевания, фармакологического анамнеза были отредактированы и введены в таблицы базы данных о виртуальном пациенте. Однако в каждой истории болезни есть часть информации, которая не играет существенной роли для принятия врачебных решений. Если результаты диагностических исследований не дают новой информации, влияющей на выбор диагноза или тактики лечения заболевания, они могут не включаться в структуру ВП.

Напротив, если исследование по каким-то причинам пациенту не проводилось, но его результаты потенциально информативны, они могут быть извлечены из записи другого пациента со схожей клинической картиной, анатомическими особенностями и демографическими характеристиками. Таким образом, в результате коллективной работы аналитиков и врачебного персонала были подобраны необходимые мультимедийные изображения и записи (ЭхоКГ, УЗИ, ЭКГ, коронарография, МРТ, ангиография и пр.).

Мы отказались от использования анимации пациентов, существенно геймифицирующей обучение. Для формирования и совершенствования навыков принятия клиничко-диагностических решений необходима, в первую очередь, информационная модель лечебно-диагностического процесса, т.е. совокупность взаимосвязанных сведений о его динамике в текстовом и мультимедийном форматах. Эта сово-

купность и является информационным образом виртуальных пациентов.

Реальный процесс лечения пациента в стационаре включает периодический контакт с медицинским персоналом и параклиническими службами, периодические исследования лабораторными и инструментальными методами, периодическую коррекцию лечения и модификацию планов на будущее. Это предопределило дискретность созданной мультимедийной компьютерной модели ЛДП.

Не все записи в истории болезни одинаково важны для лечащего врача и, соответственно, для формирования врачебных компетенций обучающегося. В связи с этим аналитики приняли решение о дискретном представлении информации в виде отдельных блоков, обозначенных для обучающихся «посещение» и представленных в хронологической последовательности в соответствии с этапами лечебно-диагностического процесса конкретного случая. В качестве примера данного способа представления информации были созданы прототипы двух ВП, после чего структура описания пациентов была уточнена, расширена и одобрена педагогами-клиницистами.

Количество посещений у ВП может различаться, поскольку не все контакты пациента с медицинским персоналом дают полезную для лечебно-диагностического процесса информацию. Для ВП были выбраны медицинские записи, содержащие новые диагностически и клинически значимые сведения, и сформулирован перечень допустимых форматов текстовой, графической, видеоинформации. Результатом этого этапа работы стал шаблон, в котором для всех ВП была подготовлена информация из архивных историй болезни и мультимедийных баз данных. Блоки информации в целом соответствовали традиционным разделам истории болезни и послужили основанием для разработки таблиц реляционной базы данных.

В результате аналитической работы с педагогами-клиницистами созданы прототипы экранных форм, которые прошли экспертизу и после модификации реализованы программно как шаблоны экранов для разных клиничко-диагностических ситуаций виртуальных пациентов. На экранных формах имеются вкладки со всеми информационными компонентами посещения; день госпитализации на вкладке обозначен для оценки обучающимися четкой хронологии событий (рис. 1). Вкладка первого посещения несколько отличается, поскольку отображает информацию в момент поступления (анамнез жизни и заболевания пациента, результаты предыдущих диагностических исследований и физического обследования больно-

го при поступлении, дифференциальном диагнозе, назначенном симптоматическом лечении, плане последующих диагностических процедур).

Структура и порядок размещения блоков информации на вкладках последующих посещений не меняются, но объем информации может отличаться. Анамнез жизни и заболевания доступен на страницах всех посещений ВП, однако сведения о жалобах, назначенных исследованиях, препаратах, дифферен-

циальной диагностике и т. д. актуализируются для конкретного посещения. Количество вкладок (аналогично количеству посещений) непостоянно; обучающийся может перемещаться между вкладками по свободной траектории.

Хронологически последняя вкладка случая соответствует ситуации выписки пациента и обязательно содержит документ с эпикризом пребывания больного в стационаре (рис. 2).

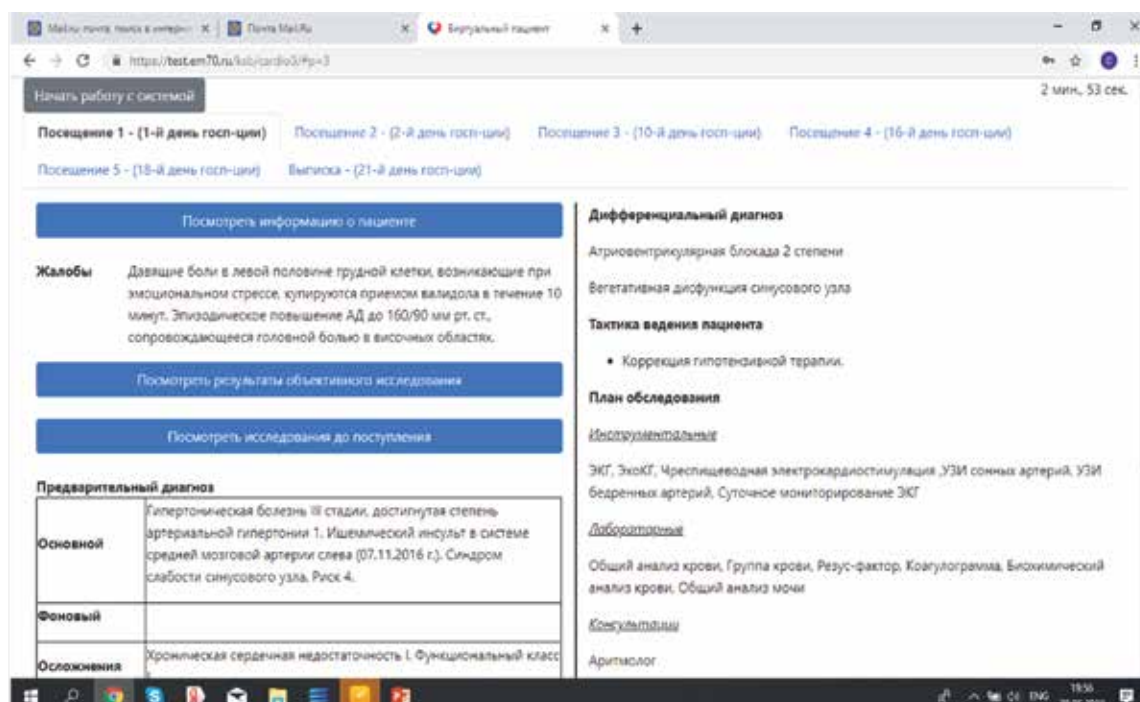


Рис. 1. Организация интерфейса виртуального пациента

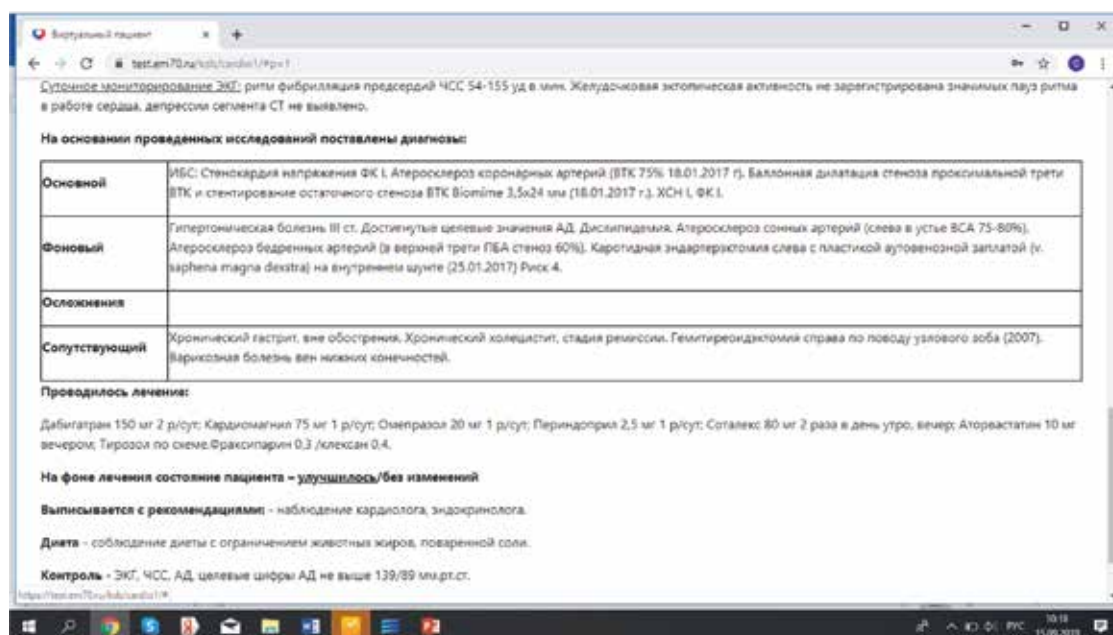




Рис. 3. Представление результатов эхокардиографии виртуального пациента

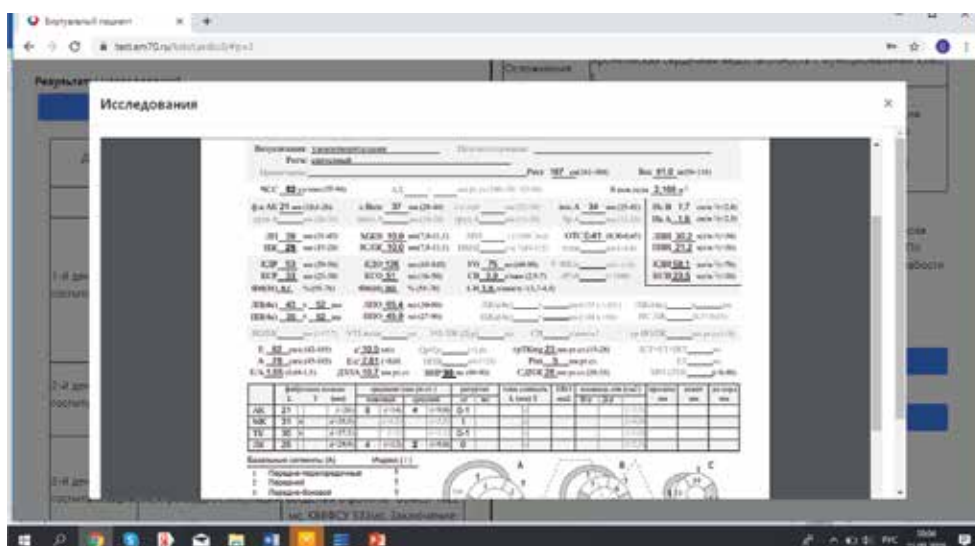


Рис. 4. Представление заключения о результатах исследования

Изображения и видеозаписи диагностических исследований расположены на вкладках посещений, следующих за их назначением. Результаты инструментальных и лабораторных методов инкорпорированы в структуру ВП как сканированные записи ЭКГ, фрагменты роликов эхокардиографии, ангиографии, УЗИ сосудов, изображения томограмм и рентгенограмм с текстовым заключением специалиста (см. рис. 3, 4). На основании действующих рекомендаций European Society of Cardiology и Российского кардиологического общества созданы справочники препаратов с указанием доз и кратности приема для лечения пациента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение виртуальных пациентов является определенной новацией для российского высшего медицинского образования. Эта образовательная тех-

нология имеет как ряд преимуществ перед обучением в контакте с реальными больными или компьютеризированными манекенами, так и определенные недостатки. В этой неоднозначной ситуации можно обсудить оптимальность использования виртуальных пациентов для формирования клинко-диагностических компетенций. В медицинском образовании для образовательной технологии наиболее важными характеристиками можно считать безопасность для пациентов, педагогическую эффективность, стоимость.

Прежде всего, формирование компетенций принятия решений и их проверка на компьютерных симуляциях абсолютно безопасна для реальных больных. Нам не нужно разрешение пациента на участие обучающегося в лечебно-диагностическом процессе, не нужно дожидаться появления в стационаре редкого случая заболевания, не нужно опасаться

санкций страховой компании, если «что-то пойдет не так».

Очень важным аспектом подготовки врача является возможность повторения одной и той же клинической ситуации неограниченное количество раз, что невозможно с реальными пациентами. Стандартизация условий и критериев оценки выполнения заданий является выигрышной характеристикой образовательной технологии ВП, с трудом достижимой в рамках преподавания клинических дисциплин. Наличие комплекса реальных результатов инструментальных исследований в стандартизованных форматах (.dcm, .avi, .jpg и пр.) позволяет использовать их для импорта в компьютерные модели лечебно-диагностического процесса – виртуальных пациентов.

Педагогическая эффективность виртуальных пациентов показана в значительном количестве публикаций. Уже не только разработаны рекомендации по их созданию [14], но и сформулированы конкретные предложения по развитию навыков клинического мышления на основе технологии ВП [15]. Виртуальные случаи по сравнению с традиционными бумажными историями болезни стимулируют взаимодействие между обучающимися, которые активно вовлекаются в процесс. Ветвящаяся траектория делает ВП более реалистичными, но усложняет задачу и увеличивает частоту ошибок обучающихся [16]. Все участники педагогического процесса отмечают перспективность ВП для медицинского образования, а возможности удаленного обучения и проверки навыков принятия решений делают эту технологию уникальной.

Стоимостной аспект разработки образовательной технологии весьма важен. Стоимость разработки одного случая ВП является одним из лимитирующих факторов их широкого использования в высшем образовании и за рубежом составляет не менее 10–20 тыс. долларов США [17]. Средняя себестоимость создания одного виртуального пациента с линейной траекторией демонстрации в нашем проекте составила менее 1 тыс. долларов при сроке реализации 1 год.

К недостаткам использования компьютерных симуляций в клинической подготовке врачей можно отнести отсутствие контакта с пациентами и, как следствие, отсутствие учета их психологических особенностей и слабый учет других персональных характеристик. Даже без использования анимации эта образовательная технология геймифицирует образовательный процесс, что приводит к уменьшению серьезных мотивирующих факторов и снижению уровня ответственности обучающегося за свои решения.

Сопоставляя ожидаемые преимущества и недочеты, можно считать виртуальных пациентов оптимальной образовательной технологией для преподавания

клинических дисциплин студентам в дистанционном и очном электронном форматах образования.

Следующим этапом выполняемого проекта станет разработка клинко-диагностических задач (КДЗ) разветвленной структуры, симулирующих разные варианты лечебно-диагностического процесса с интегрированной рейтинговой системой оценки решений обучающихся. Информационной основой для КДЗ станут материалы виртуальных пациентов. В разветвленных клинко-диагностических задачах будет возможность изменения траектории предъявления информации обучающимся. Интерактивность образовательной технологии существенно увеличится и будет заключаться в принятии обучающимися этапных решений, влияющих на выбор дальнейшей траектории прохождения задачи.

Линейные и разветвленные мультимедийные модели лечебно-диагностического процесса будут включены в репозиторий виртуальных пациентов, доступ пользователей к которому будет реализован в виде Web-сервиса. Этот ресурс станет фактологической основой проблемно ориентированной технологии дистанционного обучения и повышения квалификации врачей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реализованная мультимедийная модель ЛДП предназначена для демонстрации обучающимся завершенных случаев кардиоваскулярных заболеваний в линейной траектории. Интерактивность продукта минимальна и означает свободный выбор посещения блока информации и (или) мультимедийной записи в зависимости от уровня знаний и интереса обучающихся. Программный продукт соответствует техническому заданию, разработанному ранее. Он прошел предварительное тестирование качества контента, достаточности клинко-диагностической информации, удобства представления информации на экранных формах и траектории перемещений по образовательному контенту. Технологически реализован Web-доступ к материалам ВП, что может быть использовано для очного электронного формата образования и дистанционного повышения квалификации врачей.

В результате выполнения проекта в настоящее время созданы 50 виртуальных пациентов для вузовского и последилового этапов медицинского образования. Эта база расположена на сервере <http://virtual.cardio-tomsk.ru> в качестве компонента фактологической основы проблемно ориентированной технологии обучения и повышения квалификации врачей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barrows H.S., Tamblyn R.M. Problem-based learning: An approach to medical education. Springer Publishing Company, 1980: 224.

2. Lee R., Kwan C.Y. The use of problem-based learning in medical education. *J. Med. Education*. 1997; 1: 149–158.
3. Savery J. R. Overview of problem-based learning: definitions and distinctions. *Interdisciplinary Journal of Problem-Based Learning*. 2006; 1 (1). DOI: 10.7771/1541-5015.1002.
4. Berman N., Fall L.H., Smith S., Levine D.A., Maloney C.G., Potts M., Siegel B., Foster-Johnson L. Integration strategies for using virtual patients in clinical clerkships. *Acad. Med.* 2009; 84 (7): 942–949. DOI: 10.1097/ACM.0b013e3181a8c668.
5. Poulton T., Conradi E., Kavia S., Round J., Hilton S.R. The replacement of ‘paper’ cases by interactive online virtual patients in problem – based learning. *Medical Teacher*. 2009; 31 (8): 752–758. DOI: 10.1080/01421590903141082.
6. Harless W., Drennon G., Marxer J., Root J., Miller G. CASE: a computer-aided simulation of the clinical encounter. *J. Med. Educ.* 1971; 46 (5): 443–448.
7. Ellaway R.H., Davies D. Design for learning: deconstructing virtual patient activities. *Med. Teacher*. 2011; 33 (4): 303–310. DOI: 10.3109/0142159X.2011.550969.
8. Posel N., McGee J.B., Fleischer D.M. Twelve tips to support the development of clinical reasoning skills using virtual patient cases. *Medical Teacher*. 2015; 37 (9): 813–818. DOI: 10.3109/0142159X.2014.993951.
9. Cook D., Erwin P., Triola M. Computerized Virtual Patients in Health Professions Education: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Academic Medicine*. 2010; 85 (10): 1589–1602. DOI: 10.1097/ACM.0b013e3181edfe13.
10. Hege I., Kononowicz A., Tolks D., Edelbring S., Kublmeyer K. A qualitative analysis of virtual patient descriptions in healthcare education based on a systematic literature review. *BMC Med Educ*. 2016; 16: 146. DOI: 10.1186/s12909-016-0655-8.
11. Consorti F., Mancuso R., Nocioni M. et al. Efficacy of virtual patients in medical education: A meta-analysis of randomized studies. *Computers & Education*. 2012; 59 (3): 1001–1008. DOI: 10.1016/j.compedu.2012.04.017.
12. Toro-Troconis M., Mellström U., Partridge M.R., Meehan K., Barrett M., Higham J. Designing game-based learning activities for virtual patients in Second Life. *J. Cyber Therapy & Rehabilitation*. 2008; 1 (3): 227–239.
13. Карась С.И. Виртуальные пациенты как формат симуляционного обучения в непрерывном медицинском образовании. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (1): 140–149. DOI: 10.20538/1682-0363-2020-1-140-149.
14. Huwendiek S., Reichert F., Bosse H.-M., DeLeng B.A., Van Der Vlieten C., Haag M., Hoffman G.F., Tönshoff B. Design principles for virtual patients: A focus group study among students. *Med. Educ*. 2009; 43 (6): 580–588. DOI: 10.1111/j.1365-2923.2009.03369.x.
15. Poulton T., Balasubramaniam C. Virtual patients: A year of change. *Med. Teacher*. 2011; 33 (11): 933–937. DOI: 10.3109/0142159X.2011.613501.
16. Huwendiek S., de Leng B.A. Virtual patient design and curricular integration evaluation toolkit. *Med. Educ*. 2010; 44 (5): 519. DOI: 10.1111/j.1365-2923.2010.03665.x.
17. Cendan J., Lok B. The use of virtual patients in medical school curricula. *Adv. Physiol. Educ*. 2012; 36 (1): 48–53. DOI: 10.1152/advan.00054.2011.

Благодарности

Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам компаний «Элекард-Мед» и «Контек-Софт» за эффективную реализацию аналитического и программного аспектов проекта.

Сведения об авторах

Карась Сергей Иосифович, д-р мед. наук, зав. отделом координации научной и образовательной деятельности НИИ кардиологии, Томский НИМЦ; профессор, кафедра медицинской и биологической кибернетики СибГМУ, г. Томск.

Аржаник Марина Борисовна, канд. пед. наук, доцент, кафедра медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск.

Кара-Сал Эрес Эртинеевич, магистрант, НИ ТПУ, г. Томск.

Гракова Елена Викторовна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Васильцева Оксана Ярославовна, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Усов Владимир Юрьевич, д-р мед. наук, зав. отделением, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Ваизов Валерий Харисович, канд. мед. наук, врач, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Завадовский Константин Валерьевич, д-р мед. наук, зав. отделением, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Гуляев Всеволод Мильевич, канд. мед. наук, врач, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Баев Андрей Евгеньевич, канд. мед. наук, зав. отделением, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

Колганов Сергей Олегович, директор ООО «Элекард-Мед», г. Томск.

Кочетков Сергей Борисович, начальник отдела, ООО «Элекард-Мед», г. Томск.

Дацюк Валерий Валентинович, программист, ООО «Элекард-Мед», г. Томск.

Корнеева Татьяна Борисовна, начальник отдела, ООО «Контек-Софт», г. Томск.

Ноздрин Георгий Константинович, программист, ООО «Элекард-Мед», г. Томск.

(✉) Карась Сергей Иосифович, e-mail: ksi@cardio-tomsk.ru.

Поступила в редакцию 30.03.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Экстрацеллюлярный матрикс как информационная клеточная микросреда

Наумова Л.А., Стародумова В.А.

Сургутский государственный университет (СурГУ)

Россия, 628412, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, г. Сургут, ул. Ленина, 1

РЕЗЮМЕ

Рассматриваются современные представления о роли экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и клеточных элементов соединительной ткани (СТ) в тканевом гомеостазе в норме и патологии. Работы последних лет отражают смещение интересов при исследовании многих патологических процессов, в частности опухолевого роста, в область состояния ЭЦМ и клеток СТ, которые рассматриваются как активные компоненты ткани, определяющие процессы пролиферации, дифференцировки клеток, миграции и апоптоза. К важнейшим свойствам ЭЦМ, привлекающим внимание исследователей, относится механотрансдукция, ведущая к активации цитоскелетных механизмов и различных сигнальных клеточных путей; моделирование эффектов цитокинов, факторов роста и гормонов; поддержание ниш стволовых клеток; влияние на возникновение и течение опухолевого процесса, в частности формирование опухолевого поля и преметастатических ниш, а также эпителио-мезенхимальный переход. Важным объектом исследования в настоящее время являются и клетки СТ, в частности фибробласты – основные продуценты компонентов ЭЦМ. Внимание исследователей привлекают, прежде всего, опухоль-ассоциированные фибробласты, фенотип которых формируется в ткани задолго до появления опухоли. Расширение представлений о роли ЭЦМ и клеточных элементов СТ в тканевом гомеостазе определяет новые подходы к лечению многих заболеваний – органических склерозов, опухолей и других.

Ключевые слова: экстрацеллюлярный матрикс, эпителио-стромальные отношения и канцерогенез, фибробласт, опухолевое поле, преметастатические ниши.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Наумова Л.А., Стародумова В.А. Экстрацеллюлярный матрикс как информационная клеточная микросреда. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 215–225. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-215-225>.

Extracellular matrix as a cellular information microenvironment

Naumova L.A., Starodumova V.A.

Surgut State University

1, Lenina Str., Surgut, Khanty-Mansiysk Autonomous Area – Yugra, 628412, Russian Federation

ABSTRACT

The article discusses modern ideas about the role of extracellular matrix (ECM) and cellular elements of connective tissue (CT) in tissue homeostasis in normal and pathological conditions. The works of recent years reflect a shift of interests concerning the study of many pathological processes, particularly carcinogenesis, to the state of the ECM and CT cells, which are considered as active components of the tissue that determine the processes of cellular proliferation, differentiation, migration, and apoptosis. The most important properties of the ECM attracting the

✉ Наумова Людмила Алексеевна, e-mail: naumoval@yandex.ru.

attention of researchers include mechanotransduction, leading to the activation of cytoskeletal mechanisms and various cell signaling pathways; modeling of the effects of various cytokines, growth factors, and hormones; maintenance of the stem cell niches; influence on the emergence and course of the tumor process, in particular, formation of a cancerized field and premetastatic niches; and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Currently, CT cells are also an important object of study, in particular, fibroblasts, which are the main producers of ECM components. The attention of researchers is directed primarily to cancer-associated fibroblasts, the phenotype of which forms in the tissue long before the tumor appears. New knowledge about the role of ECM and CT cells in tissue homeostasis determines new approaches to treatment of many diseases, such as systemic sclerosis, tumors, etc.

Key words: extracellular matrix, epithelial-stromal relations and carcinogenesis, fibroblast, field cancerization, premetastatic niches.

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors received no specific funding for this work.

For citation: Naumova L.A., Starodumova V.A. Extracellular matrix as a cellular information microenvironment. Extracellular matrix as a cellular information microenvironment. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 215–225. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-215-225>.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы значительно изменились представления об экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ), который ранее рассматривался преимущественно как архитектурная поддержка клеток и тканей. Многочисленные исследования подтверждают, что ЭЦМ – физиологически активный компонент живой ткани, ответственный за важнейшие процессы в жизни клетки и ткани. ЭЦМ (волоконистые структуры и основное вещество) наряду с разнообразными клеточными элементами (фибробластами, макрофагами, лимфоцитами, тучными клетками, эндотелием микрососудов) относится к компонентам соединительной ткани (СТ), функционирующей в норме и патологии на основе кооперативного взаимодействия и обратных связей ее клеток между собой, с ЭЦМ, с клетками крови и паренхимы органов (или эпителием слизистых оболочек) [1–3].

Благодаря обратной связи между клеточными элементами и их микросредой, эволюционирующей в процессе развития тканей, формируется уникальный молекулярный состав ЭЦМ, оказывающий мощное влияние на биохимические и биофизические процессы в клетках посредством адгезивных контактов между клеткой и белками ЭЦМ и определяющий клеточно-матриксные (эпителио-стромальные) взаимодействия [4].

К важнейшим свойствам ЭЦМ, привлекающим в настоящее время внимание исследователей, относится механотрансдукция, ведущая к активации цитоскелетных механизмов и различных сигнальных клеточных путей; моделирование эффектов различных сигнальных молекул, позволяющее определять систему СТ как важнейшую информационную среду организма

[2]; поддержание ниш стволовых клеток, влияние на процессы возникновения и течение опухолевого процесса, в частности формирование опухолевого поля и преметастатических ниш, а также эпителио-мезенхимальный переход. Новые знания о роли ЭЦМ и клеточных элементов СТ в сохранении тканевого гомеостаза важны для понимания тактики лечения многих заболеваний, включая опухолевый процесс.

ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ МАТРИКС КАК ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТ ЖИВОЙ ТКАНИ

ЭЦМ – это сложный трехмерный комплекс, представленный волокнистыми структурами или различными типами коллагенов (в настоящее время их известно 28) и разнообразными белками основного вещества (гликопротеинами и протеогликанами), который формирует клеточное микроокружение, обуславливающее межклеточные и клеточно-матриксные адгезионные контакты, и ответствен за полярность клеток, клеточный фенотип, процессы пролиферации, миграции и межклеточной коммуникации [4–6].

Компоненты ЭЦМ создаются и аранжируются резидентными клетками в соответствии с особенностями данной ткани. Так, в интерстициальной строме преобладает коллаген I и V типов, в базальных мембранах – коллаген IV типа. Основными продуцентами компонентов ЭЦМ являются фибробласты – важнейшие клетки СТ [4, 7].

Как сеть белков, с которыми могут связываться различные сигнальные молекулы, ЭЦМ управляет важнейшими процессами в жизни клеток и ткани через моделирование эффектов факторов роста (ФР),

цитокинов (ЦК) и гормонов, при этом сам как высоко динамичная структура постоянно remodelируется матриксными металлопротеиназами (ММП) при участии их тканевых ингибиторов и различных ФР [4, 7, 8].

Большинство посттрансляционных изменений ЭЦМ не кодируются ДНК, а являются следствием физиологических и патологических процессов в тканях. К факторам посттрансляционных изменений ЭЦМ относятся изменения активности ММП (при воспалении, фиброзировании), процессы нитрозилирования и гликозилирования белков ЭЦМ, сшивание и изомеризация, значительно изменяющие вязкость, упругость и жесткость ЭЦМ. Посттрансляционное remodelирование ЭЦМ может быть как следствием патологического процесса, так и звеном его патогенеза, например при развитии фиброза и рака. Так, свойствами сигнальных молекул начинают обладать продукты деградации коллагена II типа, образующиеся при ревматических заболеваниях и попадающие в системный кровоток [4], а образующийся при деградации коллагена XVIII типа эндостатин оказывается самым мощным антиангиогенным фактором [7].

К основным функциональным модификаторам ЭЦМ относятся протеоглики – протеины, содержащие ковалентно с ними связанные гликозаминогликаны. Гликозаминогликаны – длинные отрицательно заряженные дисахаридные повторы, которые представлены гепарин-сульфатом, хондроитин/дерматан-сульфатом, гиалуронатом или кератинсульфатом. Среди протеогликанов выделены трансмембранные (интегрины, синдеканы, дискоидины), перичеллюлярные (перлекан, декорин и др.) и протеоглики внеклеточных пространств (гиалектаны и пять классов протеогликанов, содержащих лейцин, или SLRPs) [4].

Протеоглики играют основную роль в передаче сигналов от ЭЦМ к клетке и являются, по сути, рецепторами клетки к адгезивным молекулам ЭЦМ, отвечают за взаимодействие клетки с микросредой или межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия, участвуют в гидратации тканей, фибриллообразовании коллагена, модулируют эффекты ФР, ЦК, влияют на пролиферацию, адгезию клеток, репаративные процессы и опухолевый рост [4, 7, 8].

К важнейшим гликопротеинам ЭЦМ относятся ламинин и фибронектин. Ламинин – тримерный гликопротеин, состоящий из α -, β - и γ -цепей, которые могут формировать до 60 уникальных ламининов. В настоящее время известно только 16 комбинаций. Благодаря связыванию интегринов, ламинины способны создавать динамическую связь между клеткой и ЭЦМ. Фибронектин как многодоменный белок обеспечивает механочувствительную связь между клеткой и ЭЦМ и формирование фибриллярной сети [4].

Таким образом, белковые молекулы ЭЦМ рассматриваются как паракринные сигнальные молекулы, оказывающие, наряду с ФР, ЦК и гормонами, глубокое влияние на тканевую гомеостаз.

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА

Без ощущения своего механического окружения клетка не может существовать – подвергаться пролиферации и дифференцировке. Жесткость своего микроокружения клетки оценивают с помощью ламеллиподий и универсальных трансмембранных белков ЭЦМ – интегринов и синдеканов. Интегрины, являющиеся основными механосенсорами клетки, с одной стороны, через различные комбинации своих гетеродимеров связываются с фибронектином, ламинином и коллагенами ЭЦМ, с другой – посредством винкулинов, талинов и других белков – с внутриклеточным актиновым цитоскелетом, механически интегрируя внеклеточные и внутриклеточные компартменты. Процесс улавливания клеткой механических свойств окружающей микросреды и ее реакция на биофизические свойства ЭЦМ называется механотрансдукцией [4, 9].

Конформационные изменения цитоплазматических доменов интегринов ведут к активации нескольких сигнальных путей клетки, связанных с активностью киназ и фосфотаз, в частности митоген-активированных протеинкиназ (MAP) и Rho GTPase (гуанозинтрифосфат фосфотазы). Связь синдеканов с фибронектином приводит к синергии действия интегрин и синдекана в отношении активации сигнальных каскадов посредством киназы фокальной адгезии (FAK) и последующей стабилизации фокального адгезивного комплекса. Клетки ткани обладают разнообразными рецепторами для различных компонентов ЭЦМ [4, 6, 10]. Так, CD34 является рецептором для гиалуронана, 67kDa-ламинин-рецептор – для ламинина, дискоидин-домен-рецептор (DDPs) – для коллагена [4, 5, 11].

Механочувствительность адгезионных комплексов, образованных интегрин и синдеканами, является в настоящее время областью активных исследований, но еще очень многое предстоит выяснить о путях, обеспечивающих опосредованные ЭЦМ клеточные ответы [4, 7, 9].

Для передачи внешней информации биохимические и биофизические ретрансляторы работают совместно. Предполагается, что одновременное взаимодействие тысяч рецепторов интегрин с сайтами связывания в сетях анизотропного ЭЦМ позволяет клеткам иметь топологическое описание химических и механических свойств микроо-

кружения, с последующим преобразованием этой информации во внутриклеточные сигналы, генерирующие соответствующие клеточные ответы, например положение, или полярность клеток, дифференцировку, рост, а также такие фундаментальные процессы, как синтез белка и регулирование энергетических процессов [9]. Одним из ярких примеров механочувствительного генетического регулятора является пара транскрипционных коактиваторов – уеs-ассоциированного белка (YAP) и транскрипционного коактиватора, связанного с PDZ-мотивом (TAZ). Та роль, которую YAP/TAZ, являющиеся протоонкогенными регуляторами транскрипции, играют в клеточных процессах, отражает значение механотрансдукции как в норме (регенераторные процессы), так и в патологии, в частности при развитии фиброзов и рака [4, 7, 12].

Установлено, что при культивировании дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток (MSCs) в остециты, миоциты или нейроны зависит от эластичности коллагеновых матриц, т.е. механотрансдукции. При блокировании миозина II – ключевой молекулы механотрансдукционных сигнальных путей, MSCs становятся не чувствительными к эластичности ЭЦМ и ее влиянию на процессы дифференцировки. Состав ЭЦМ, или градиент адгезии (haptotaxis), – координированный процесс между адгезией и антиадгезией, существенно влияет на скорость миграции клеток. Так, выраженная миграция фибробластов наблюдается при культивировании на фибронектине, а ее отсутствие – при культивировании на смеси фибронектин/ламинин или ламинине [4]. По сути, ЭЦМ действует как динамический план развития клетки, что лучше всего отражают феномены ветвления, отпочковывания и образования трубчатых структур в процессе эмбриогенеза [4].

Таким образом, пространственная ориентация клеток и тканевой гомеостаз в целом определяются механотрансдукцией, или биофизическими сигналами из ЭЦМ, преобразующимися в клетке в биохимические регулирующие транскрипцию генов. Дисрегуляция ремоделирования ЭЦМ, в частности при развитии фиброзов, существенно изменяет судьбу клеток и ведет к развитию различных заболеваний – патологии сердечно-сосудистой системы, костно-суставной системы и опухолевому росту [4, 8, 9, 11].

ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ МАТРИКС В ПОДДЕРЖАНИИ НИШ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Важнейшим свойством ЭЦМ является поддержание ниш стволовых клеток [4, 13]. Ниша формируется ансамблем стромальных клеток и производимых ими

компонентов ЭЦМ, характеризуется, прежде всего, пространственной организацией, обеспечивает межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия, необходимые для осуществления соответствующего направления дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, дающих начало различным клеточным линиям, или соматических стволовых клеток, необходимых для восстановления тканей [14].

Поддержание ниш стволовых клеток имеет решающее значение для нормального функционирования, прежде всего, эпителиальных тканей, относящихся к пограничным тканям организма и характеризующихся не только высокой интенсивностью физиологической регенерации, но и высокой частотой повреждений и интенсивной репаративной регенерацией [3, 13, 14]. Вместе с тем и в тканях, клетки которых ранее считались постмитотическими, низкий уровень клеточного обновления поддерживается в течение жизни благодаря нишам стволовых клеток [14].

Ниша представлена самими стволовыми клетками, их потомством и специфическим для ниши ЭЦМ и обеспечивает интеграцию различных получаемых стволовыми клетками сигналов – ауто-, паракринных и системных, а также клеточно-матриксных сигналов через рецепторы адгезии и механотрансдукцию, что позволяет координировать ответы стволовых клеток на изменяющиеся потребности тканей. Стромальные клетки, в частности фибробласты, играют активную роль в поддержании ниш резидентных стволовых клеток посредством активации сигнальных путей Wnt, Notch и BMP [13].

Методология сохранения ниш стволовых клеток доказывает, что для их поддержания недостаточно только адгезии к базальной мембране, пролиферативная способность клеток связана с их пространственным расположением и воздействием механической силы, в частности – вращательной силы для обеспечения ориентации митотического веретена во время конечной фазы клеточного цикла [15]. Функция многих стволовых клеток снижается в течение жизни, что может лежать в основе старения организма [14], а также формирования различных видов патологии. Так, установлено, что со старением ниш стволовых клеток эндометрия во многом связано развитие привычных выкидышей [16].

Прогресс в понимании закономерностей существования ниш стволовых клеток (идентификация нишевых факторов и сигнальных путей) может иметь большое значение для регенеративной медицины и тканевой инженерии [13, 14]. Хотя в настоящее время сформированы некоторые представления о межклеточном и клеточно-матриксном взаимодействии в нишах резидентных стволовых клеток (хорошо, в

частности, изучены ниши стволовых клеток кожи, кишки, волосяного фолликула, молочной железы и нервных стволов), многие компоненты ниш стволовых клеток пока еще не ясны [14]. Так, актуальным остается вопрос клеточной дедифференцировки – возвращения дифференцированных клеток к менее дифференцированному состоянию (стволовой клетке) в пределах своей клеточной линии при потере ниш стволовых клеток в данной ткани (в частности, слизистой оболочке желудка) для осуществления репаративных процессов [13].

ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ МАТРИКС И ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД

К наиболее ярким примерам влияния физико-химических свойств ЭЦМ на фенотип и поведение клеток является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), или феномен трансдифференцировки, когда эпителиальные клетки приобретают подвижный фибробластоидный, или мезенхимальный, фенотип. Программа ЭМП, наряду с аналогичным переходом в эндотелии сосудов, или эндотелиально-мезенхимальным переходом (ЭндМП), выявила общность механизмов, работающих как в эмбриогенезе и при заживлении ран, так и в процессе канцерогенеза, в частности при формировании раковых стволовых клеток и на этапе инвазивного опухолевого роста [8, 17–19].

Активация и экспрессия вызывающих ЭМП-транскрипционных факторов происходит через различные сигнальные пути – Wnt-путь, Sonic Hedgehog (Shh), Notch и другие, которые могут запускаться как разными ФР – трансформирующим фактором роста бета (TGF β), костным морфогенетическим белком (BMP), эпидермальным фактором роста (EGF), фактором роста фибробластов (FGF), инсулиноподобным фактором роста 1 (IGF1), фактором роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарным фактором роста (PDGF), так и сигналами из ЭЦМ, а также действием гипоксии. Клетки могут по-разному интегрировать определенные сигналы или реагировать на внеклеточные молекулы с различной чувствительностью, в зависимости от их состояния и микроокружения [18].

ЭМП ассоциируется с потерей присущей эпителиальным клеткам апико-базальной полярности, плотных межклеточных контактов с участием адгезивных молекул (клаудинов, окклюдина, E-кадгерина), обеспечивающих формирование эпителиального пласта, расположенного на базальной мембране, которая в норме представлена коллагеном IV типа и ламинином, а также утратой экспрессии эпителиальных маркеров – цитокератинов. Вследствие утраты межклеточных контактов и изменения полярности

клетки эпителия приобретают фибробластоидный, или мезенхимальный, фенотип, но параллельно изменяется и состав ЭЦМ, в котором преобладают фибронектин, N-кадгерин, коллагены I и III типов, и уже изменившие фенотип клетки начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры – виментин, фибробластспецифический белок-1 (FSP-1), α -гладкомышечный актин (α -SMA). Приобретенный подвижный мезенхимальный фенотип позволяет клеткам осуществлять инвазию через базальный слой с последующей миграцией вдоль секретируемого фибронектинового матрикса [17, 18].

Не исключается, что ЭМП и обратный мезенхимально-эпителиальный переход существуют как бинарные состояния клетки. Гибкая природа эпителиального/мезенхимального состояния делает этот процесс трудно уловимым для наблюдения [18].

При ЭМП в ЭЦМ резко возрастает количество коллагена I и III типов. Помещение эпителиальных клеток на матрицы из этих типов коллагена может индуцировать ЭМП посредством различных сигнальных путей. Пути передачи сигнала ЭМП индуцируют также экспрессию генов, кодирующих MMP-2 и MMP-9, которые расщепляют коллаген IV типа в базальной пластинке, облегчая инвазию опухоли [8, 18, 19].

По мере изменения состава ЭЦМ увеличивается и количество интегринов на поверхности клетки, что способствует прогрессированию ЭМП. Связывание латентного TGF β с интегринными α V β 6 и α V β 8 индуцирует протеолитическое высвобождение латентного ассоциированного пептида (LAP) и активацию TGF β . В ответ на передачу сигналов TGF β увеличивается синтез коллагена I типа и фибронектина, которые вносят дополнительный вклад в ЭМП, поэтому локальное накопление TGF β ассоциируется с риском инициации опухолевого роста через развитие ЭМП, снижение же экспрессии TGF β ослабляет ЭМП, инвазию и саму опухолевую трансформацию.

Коллаген I типа вызывает, в свою очередь, фосфорилирование I κ B (ингибитор κ B) через интегрин-связанную киназу (ILK), ведущее к увеличению количества локализованного в ядерной области NF- κ B (ядерный фактор транскрипции каппа Би), который стимулирует экспрессию Snail1 и лимфоидный энхансер-связывающий фактор-1 (LEF1) и индуцирует ЭМП. Увеличение количества коллагена I типа активирует также JNK-путь, фармакологическое ингибирование которого отменяет, в частности, коллаген-опосредованную миграцию и метастазирование клеток рака молочной железы. Взаимодействие субъединиц интегрин β 1 с коллагеном I типа в ЭЦМ коррелирует с прямым подавлением E-кадгерина и индукцией N-кадгерина [18, 19].

Ремоделирование ЭЦМ не только изменяет типы матриксных белков, которые взаимодействуют с клеточной мембраной, но и влияет на среду растворимых цитокинов, способствующих ЭМП [18]. ЭМП предшествует появлению у опухолевых клеток свойств стволовых клеток [17, 20], которые представляют собой небольшую часть популяции опухолевых клеток, способных к самообновлению, генерации неоднородности популяции опухолевых клеток, их метастазированию [21–23] и возникновению вторичных опухолей [24].

ЗНАЧЕНИЕ ДИСРЕГУЛЯЦИИ МОЛЕКУЛ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА В РАЗВИТИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА

Современные представления о канцерогенезе активно смещаются в направлении важнейшей роли в этом процессе ЭЦМ, формирующего клеточную микросреду и активно регулирующего клеточную пролиферацию, адгезию, миграцию и апоптоз [4, 18, 25–27]. Влияние ЭЦМ на дифференцировку клеток доказано, в частности, возвращением опухолевыми клетками молочной железы нормального фенотипа при культивировании их на базальной мембране, созданной на основе 3D-субстратов, покрытых антителами, блокирующими β -интегрин [4].

К основным компонентам ЭЦМ, взаимодействующим с опухолевыми клетками, относятся фибронектин, ламинин, коллаген, протеогликаны и гликозаминогликаны, в частности гиалуроновая кислота (ГК). ГК играет решающую роль в определении компрессионных свойств большинства тканей, участвует в постоянном ремоделировании ЭЦМ, в том числе в период эмбриогенеза и при репарации, через взаимодействие с клетками иммунной системы участвует в опухолевом ангиогенезе и является важным модулятором поведения различных клеток в микроокружении опухоли [27]. ГК является как индуктором сигнала для ЭМП, так и субстратом для миграции клеток, поэтому изменение концентрации ГК в некоторых тканях (молочная железа, предстательная железа) рассматривается как предиктор малигнизации [4, 8, 27].

Образование комплекса ГК-СД44 вызывает активацию сигнализации RhoGTP-азы, ведущую к структурным изменениям в сборке актина, реорганизации цитоскелета, активации транскрипции, росту опухолевых клеток, их миграции и инвазии, нарушению эндотелиального барьера. Многие точные механизмы влияния ГК на иммунные клетки пока не известны, но это взаимодействие может как стимулировать опухолевый ангиогенез, так и ингибировать рост опухоли через индукцию активного иммунного ответа. Одним из эффектов ГК-СД44-сигнализации оказыва-

ется вовлечение β -катенина – основного белка Wnt-сигнального пути, который контролирует клеточную полярность, пролиферацию, а также ряд факторов ангиогенеза – VEGF-A97, II-898. На изучении этих механизмов базируется разработка антиангиогенной терапии опухолей, причем последняя оказывается более эффективной в сочетании с α -интерфероном и химическими ингибиторами синтеза ГК [27].

Важнейшую роль в опухоль-стромальных отношениях играют опухоль-ассоциированные фибробласты (CAFs), которые представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, формирующуюся из различных клеток, включая резидентные фибробласты стромы, эндотелиальные, гладкомышечные клетки, адипоциты и сосудистые перicytes [28–30]. Не исключается, что источником CAFs могут быть и эпителиальные клетки, подвергшиеся ЭМП [30]. Важную роль в формировании CAFs отводят костно-мозговым стромальным клеткам, рекрутируемым в микроокружение опухоли под действием выделяемых опухолевыми клетками хемокинов (CCL12, CCL16 и др.) и дающим начало MSCs [28, 29, 31].

Между опухолевыми эпителиоцитами и CAFs формируются перекрестные пути взаимодействия посредством выделяемых клетками в межклеточное пространство экзосом – внеклеточных везикул диаметром от 30 до 100 нм, осуществляющих перенос информации, благодаря содержанию в них различных биомолекул – белков, фрагментов ДНК, липидов, различных ФР и микроРНК, протеолитических ферментов [8, 17, 30, 32]. Обмен экзосомами определяет изменение спектра экспрессируемых фибробластами генов – активируется VCAM-1 интегрин α -4-сигнальный путь, увеличивается уровень фибронектина в ЭЦМ, усиливается экспрессия VCAM-1-рецепторов в эндотелиоцитах [17]. CAFs начинают выделять различные ЦК (TGF β , CCL-10, CCL-5 и др.), моделирующие поведение как иммунных клеток (макрофагов, лимфоцитов), так и опухоли [17, 30, 33]. Так, позитивные по CD9 экзосомы фибробластов при скирозном типе рака желудка стимулируют миграцию и инвазию опухолевых клеток, ассоциирующуюся с увеличением экспрессии ММП-2 [32].

Таким образом, CAFs начинают играть активную роль в опухолевой прогрессии и метастазировании, обуславливая потерю экспрессии Е-кадгерина и развитие ЭМП [34]. В процессах ангиогенеза, формировании иммунного статуса микроокружения опухоли и развитии лекарственной устойчивости они становятся основными клетками опухолевой стромы и могут быть одной из важных терапевтических мишеней [29–31, 33].

Более того, в последние годы показано, что изменения стромы и появление CAFs-подобного фе-

нотипа фибробластов могут предшествовать образованию опухоли или появлению злокачественных эпителиальных клеток, так как секретируемые CAFs факторы увеличивают пролиферативную активность и мутагенез в эпителиальных клетках, активируют ангиогенез, нарушают межклеточные адгезионные контакты и подавляют апоптоз, инициируя злокачественный фенотип в морфологически и генотипически нормальных эпителиальных клетках [30].

Установлено, что CAFs-подобные фибробласты характеризуются снижением экспрессии CD36 (гликопротеин, экспрессируемый на поверхности большинства клеток), ассоциирующей с высокой продукцией коллагенов и фибронектина [30]. Такие CAFs-подобные фибробласты были получены, в частности, от здоровых женщин с высокой маммографической плотностью, в сравнении с фибробластами, полученными от женщин с низкой плотностью маммограмм, их отличала выраженная способность к десмоплазии [35]. При предопухолевых изменениях стромы в различных ее клетках (адипоцитах, фибробластах, эндотелиоцитах, иммунных клетках) наблюдается снижение экспрессии CD36 с нарушением их функционального состояния. Так, супрессия CD36 в эндотелиоцитах сопровождается нарастанием ангиогенеза, в преадипоцитах – нарушением их дифференцировки в адипоциты, в иммунных клетках – увеличением популяции макрофагов M2-фенотипа [30].

Репрессию CD36 связывают с эпигеномными изменениями – метилированием ДНК, модификацией гистонов и структуры нуклеосом или изменениями в экспрессии микроРНК, ведущими к изменению экспрессии генов, характерных для состояния CAFs [30, 36]. Фенотип CAFs ассоциируется с дисрегуляцией различных сигнальных путей – TGF β , BMP, Wnt, Sonic hedgehog (Shh), PDGF и ряда других [30].

В качестве одного из механизмов, способствующих росту и метастазированию опухоли, рассматривается иммунная модуляция и развитие воспаления, обусловленные CAFs. Иммуносупрессивное действие CAFs в микроокружении опухоли опосредуется через активацию в них гликопротеина Chitinase 3Like1 (Chi3l1), который определяет способность фибробластов управлять поведением опухоли, ее провоспалительным и иммунным окружением, в частности способствует росту опухоли и сдвигу баланса иммунной системы ко 2-му типу иммунитета [33].

CAFs могут представлять собой основной клеточный компонент стромы опухоли и являться основным источником соединительнотканых компонентов ЭЦМ и различных классов протеолитических ферментов. Так, при раке молочной железы, раке поджелудочной железы CAFs могут составлять до

80% опухолевой массы, обуславливая выраженный десмопластический процесс [8, 30].

При увеличении массы опухолевых клеток их тканевое микроокружение начинает испытывать «твердый стресс», обуславливающий сжатие кровеносных и лимфатических сосудов микроциркуляторного русла, деформацию здоровой ткани и увеличение ее ответного сопротивления, которое, в свою очередь, вызывает «твердый стресс» в опухолевых клетках, что ведет к изменению экспрессии генов, увеличению скорости пролиферации и миграции опухолевых клеток. Формирующаяся в зоне опухоли компрессия микроциркуляторного русла обуславливает также снижение эффективности химио- и иммунотерапии [4, 8].

Выраженная десмоплазия при раке поджелудочной железы связана с активацией звездчатых миофибробластоподобных клеток, поддерживающейся увеличением механической плотности микросреды, что отражает формирование положительной обратной связи. Секретируемая опухолевыми клетками лизилоксидаза (LOX) отвечает за сшивание коллагена и эластина и увеличение жесткости ЭЦМ, что ведет к активации интегринов и нарастанию Rho-генерируемому напряжению клетки и ее облегченному движению по уплотненному и выровненному коллагену.

Инактивация способности звездчатых клеток ремоделировать ЭЦМ предотвращает механическое высвобождение TGF β из его латентной формы, сохраняющаяся же ригидность опухоли индуцирует высокую экспрессию TGF β и ЭМП, а «твердый стресс» усиливает гипоксию опухолевых клеток, их пролиферативную активность и устойчивость к химиотерапии. Инактивация механосенсорной и ремоделирующей способности звездчатых клеток может быть одним из направлений лечебной стратегии. Так, трансретиноевая кислота подавляет механочувствительность звездчатых клеток путем снижения сократительной способности актомиозина (MLC-2), что отключает обратную положительную связь повышенной жесткости ЭЦМ и активации звездчатых клеток, в результате чего снижается фиброзирование и инвазивность опухолевых клеток [4].

Модулирующее влияние на опухолевую микросреду оказывают различные компоненты ЭЦМ и клетки стромы (макрофаги, дендритные клетки, различные популяции лимфоцитов). Так, увеличение в опухолевом микроокружении количества опухоль-ассоциированных макрофагов ведет к увеличению синтеза фибробластами коллагена I, VI и XIV типов и через моделирование активности ММП сопровождается осаждением, сшиванием и выпрямлением коллагеновых волокон, что облегчает процессы инвазии опухолевых клеток [37]. Тучные клетки также влияют

на ремоделирование ЭЦМ, процессы инвазии и метастазирования опухолевых клеток, ангиогенез посредством выделяемых ими нейтральных протеаз (химазы, триптазы), изменяющих активность ММП, выделение гистамина, гепарина и различных факторов роста – VEGF, FGF, TGF β , фактора некроза опухоли альфа и отдельных интерлейкинов (IL-1, IL-6, IL-8) [38].

Таким образом, опухолевые клетки изменяют микроокружение, в котором они растут, взаимодействуя с клетками СТ и ЭЦМ и наоборот, что может обуславливать как благоприятные условия для роста опухоли, инвазии и метастазирования, так и неблагоприятные, в частности через активацию иммунной системы. Результаты исследований последних лет резко контрастируют с исторически сложившимися представлениями об инициации опухолевого роста в эпителиальных клетках вследствие возникающих в них мутаций. При некоторых видах рака строма выходит за рамки роли посредника опухолевого процесса. Изменения в сигнальной и транскрипционной программе стромальных клеток могут предшествовать (или действовать независимо) от изменений в эпителиальных клетках и фактически выступать в качестве драйвера опухолевого процесса [25, 27, 30, 35], что резко меняет терапевтическую стратегию с направленностью ее на возвращение исходного фенотипа элементам стромы. Такая терапия может быть направлена на удаление САFs через вмешательство в их выживаемость или нормализацию их фенотипа через управление протуморогенными сигналами [20, 30].

ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ МАТРИКС И ОПУХОЛЕВОЕ ПОЛЕ

Именно с системой СТ (ее клеточным составом, характером ЭЦМ, спектром сигнальных молекул, активностью ММП и их ингибиторов) тесно связана концепция опухолевого поля, сформулированная Р. Виллисом еще в 1953 г. и активно разрабатываемая в настоящее время [39–43]. Основные положения концепции – неодномоментность трансформации; мозаичность гистологической картины; рост опухоли как за счет трансформации клеток, попавших в зону поля, так и за счет опухолевой пролиферации; рецидивы, обусловленные не столько радикальностью лечения, сколько сохранением данного поля или формированием нового с возникновением опухоли по тем же законам, хорошо подтверждаются на практике [39, 44].

Как первые признаки формирования опухолевого поля рассматриваются зоны дисплазии и возникновения сосудов, при этом размеры поля могут составлять часть или распространяться на весь орган. В представлениях одних авторов, поле ассоциируется с генетическими и эпигенетическими повреждениями эпителия,

граничащего с зоной опухолевого роста [45–47], других – характером экспрессии протеаз и их ингибиторов, воспалительных медиаторов и иммунных сигнальных молекул, в частности, большое значение придается присутствующей линии макрофагов, накоплению Tregs-лимфоцитов [40–43], а также метаболическому и гормональному статусу перитуморозной зоны [48].

Теория опухолевого поля постоянно пересматривается и обновляется, базируясь в целом на сложном взаимодействии между стромальными и опухолевыми клетками посредством меняющих микросреду опухоли различных сигнальных молекул (ФР, ЦК, хемокинов), среди которых в последнее время большое значение придается нарушению регуляторной роли микроРНК, участвующих в посттранскрипционной регуляции генов [34, 43]. Так, при раке желудка отмечается увеличение активности ряда микроРНК (hsa-miR-10a, hsa-miR-483; hsa-miR-664a), регулирующих гены онкосупрессоры – APC, RUNX1, PTEN, TP53 и других, что, в свою очередь, является следствием развивающегося в перитуморозной зоне хронического воспаления [47].

Проявлением опухолевого поля становится эволюция соматических клеток, в результате которой клетки приобретают отдельные фенотипические характеристики (очаговая гиперплазия, метаплазия, дисплазия), пока не полностью отвечающие опухолевому фенотипу. В основе этой эволюции оказываются проонкогенные мутации, обуславливающие формирование «мутантного клона», растущего с образованием полей клеток, предрасположенных к прогрессированию изменений до опухолевых клеток, при этом важнейшее значение имеет клеточная микросреда [43, 46]. В этом контексте предопухолевые заболевания, характеризующиеся повышенным риском развития опухолевого процесса, представляют собой пример опухолевого поля [43, 46]. Наилучшим образом это документируют такие предопухолевые заболевания, как пищевод Барретта, простатическая интраэпителиальная неоплазия, в молочной железе – протоковая карцинома *in situ*, отражающие рост мутантных клеточных линий, эволюционирующих по пути к раку [43].

Косвенным показателем эволюции поля, или высокого риска опухолевой трансформации, является генетическое, или клональное, разнообразие клеток в пределах поля. Существование опухолевого поля ставит ряд практически важных вопросов. Возможна ли медикаментозная модификация опухолевого поля, например использование нестероидных противовоспалительных препаратов, снижающих частоту мутаций при пищевом Барретта, или аспирина и 5-аминосалицилатов при воспалительных заболеваниях кишечника для профилактики колоректального рака? Так,

эффективность лечения в пределах опухолевого поля при предопухолевых заболеваниях доказана в отношении плоскоклеточного рака кожи [46]. Нужно ли одновременно с опухолью удалять опухолевое поле, обуславливающее риск метастатических опухолей? Также стоит вопрос о методах визуализации поля (диспластических поражений) во время операции [43].

ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ МАТРИКС В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕМЕТАСТАТИЧЕСКИХ НИШ

В последние годы значительно эволюционизировали представления о взаимодействии между опухолью и ЭЦМ в процессе ее прогрессии и метастазирования. Показано, что первичные опухоли обладают способностью индуцировать на расстоянии такую микросреду, которая будет поддерживать рост попавших туда опухолевых клеток. Эта вновь сформированная на удалении от первичного опухолевого очага микросреда получила название преметастатической ниши (PMN) [4, 49, 50]. Попавшие в кровоток из первичного очага опухолевые клетки погибают в огромном количестве, и только часть из них способна выживать и прогрессировать, оказываясь в PMN [8, 49].

Секретируемые факторы опухолевого происхождения (tumor-derived secreted factors – TDSFs) и опухолевые экзосомы, а также привлекаемые с их помощью стромальные, иммунные клетки и клетки костно-мозгового происхождения через установление сложной межклеточной коммуникации определяют развитие в PMN таких процессов, как ремоделирование ЭЦМ, ангиогенез, иммуносупрессия, органотропизм и характер экспрессируемых клетками ниш биомаркеров [4, 49].

Предполагается, что ремоделирование ЭЦМ (накопление фибронектина, сшивка коллагена с помощью LOX) в PMN происходит до миграции в них опухолевых клеток из первичного очага, а затем попавшие в сосуды опухолевые клетки накапливаются именно в PMN, отличающихся большей жесткостью ткани (этот процесс известен как *durotaxis*) [4, 49]. Важная роль в модификации ЭЦМ принадлежит также ферменту пролил-4-гидроксилазе (P4HA), экспрессия которого нарастает под действием гипоксии и (или) TGF β и который обуславливает отложение коллагена высокой стабильности.

Фибронектин и гиалуронат ЭЦМ определяют направленную миграцию и увеличение метаболической активности опухолевых клеток. Фибронектин способствует также рекрутированию из костного мозга моноцитов, трансформирующихся в экспрессирующие VEGFR1 макрофаги. Появляющиеся в PMN благодаря лейкотриеновой сигнализации ней-

трофилы (в частности, в PMN легких) также участвуют в формировании иммуносупрессивной среды путем ингибирования CD8+ Т-лимфоцитов [49].

Многие механизмы формирования PMN пока остаются не ясными, в частности механизм тропизма метастазирования к определенным органам, хотя недавние исследования показали, что опухолевые экзосомы имеют специфические паттерны экспрессии интегринов, определяющие органотропизм. Экзосомная протеомика выявила, что экзосомные интегрины $\alpha\beta 4$ и $\alpha\beta 1$ тесно связаны с метастазированием в легкие, а экзосомный интегрин $\alpha\nu\beta 5$ – с метастазированием в печень. Прицельное удаление этих интегринов снижает поглощение экзосом резидентными клетками ткани и метастазирование в легкие и печень [4].

Предполагается, что лечение рака может стать более эффективным при направленности его в том числе на различные механизмы метастазирования, в частности экзосомный механизм. Экзосомы, вероятно, могут использоваться и как средство доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки, но многие функции и механизмы обмена экзосом еще предстоит изучить [4, 49, 50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, работы последних лет отражают смещение интересов при исследовании многих патологических процессов, в частности опухолевого роста, в область состояния ЭЦМ и клеточных элементов СТ. Экстрацеллюлярный матрикс и клетки СТ, прежде всего фибробласты, рассматриваются как активные компоненты ткани, определяющие процессы пролиферации, дифференцировки клеток, миграции, апоптоза, а также не только прогрессирования и метастазирования опухолей, но и инициации опухолевого роста.

В работах последних лет ткань (как и составляющие ее элементы) рассматривается как эмерджентная структура, которая больше, чем простая сумма, составляющих ее частей. Уникальные свойства ткани возникают из коллективного поведения составляющих ее компонентов, а архитектурные (структурные), временные и динамические аспекты существования ткани интегрируются через петли обратной связи, что, например, наглядно отражается в формировании опухолевого поля [30]. Такое понимание ткани, в частности клеточно-матриксных взаимодействий, определяет совершенно новую тактику в лечении многих заболеваний и, прежде всего, опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шехтер А.Б., Серов В.В. Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерации (анализ межклеточных взаимодействий). *Архив патологии*. 1991; 7: 7–14.

2. Казначеев В.П., Субботин М.Я. Этюды к теории общей патологии. 2-е изд. Новосибирск, 2006: 256.
3. Наумова Л.А. Общепатологические аспекты атрофического поражения слизистой оболочки желудка: особенности клинических и структурно-функциональных проявлений различных морфогенетических вариантов атрофического процесса. URL: https://surgumed.elpub.ru/jour/article/view/176?locale=ru_RU.
4. Walker C., Mojares E., Hernández A Del Río. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19103028.
5. Kaushik S., Pickup M.W., Weaver V.M. From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35 (4): 655–667. DOI: 10.1007/s10555-016-9650-0.
6. Sun Zhiqi, Guo Shengzhen S., Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *JBC.* 2016; 215 (4): 445–456. DOI: 10.1083/jcb.201609037.
7. Karsdal M.A., Nielsen M.J., Sand J.M., Henriksen K., Genovese F., Bay-Jensen A.C., Smith V., Adamkewicz J.I., Christiansen C., Leeming D.J. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay Drug Dev. Technol.* 2013; 11 (2): 70–92. DOI: 10.1089/adt.2012.474.
8. Houg D.S., Bijlsma M.F. The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer.* 2018; 17 (1): 95. DOI: 10.1186/s12943-018-0842-9.
9. Humphries J.D., Chastney M.R., Askari J.A., Humphries M.J. Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Cur. Opin. Cell Biol.* 2019; 56: 14–21. DOI: 10.1016/j.ceb.2018.08.004.
10. Сандбо Н., Смолянинова Л.В., Орлов С.Н., Дулин Н.О. Регуляция дифференцировки и функционирования миофибробластов сигнальной системой цитоскелета. *Ученые биологической химии.* 2016; 56 (13): 259–282.
11. Kechagia J.Z., Ivaska J., Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20 (8): 457–473. DOI: 10.1038/s41580-019-0134-2.
12. Habbig S., Bartram M.P., Müller R.U., Schwarz R., Andriopoulos N., Chen S., Sägmüller J.G., Hoehne M., Burst V., Liebau M.C., Reinhardt H.C., Benzing T., Schermer B. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *JBC.* 2011; 193 (4): 633–642. DOI: 10.1083/jcb.201009069.
13. Chacón-Martínez C.A., Koester J., Wickström S.A. Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *The Company of Biologists.* 2018; 145 (15). DOI: 10.1242/dev.165399.
14. Pennings S., Liu K.J., Qian H. The stem cell niche: interactions between stem cells and their environment. *Stem Cells Int.* 2018; 1–2: 1–2. DOI: 10.1155/2018/4879379.
15. Miller C., Crampin E., Osborne J. Maintaining the stem cell niche in multicellular models of epithelia. *arXiv:1811.10781v1 [q-bio.TO]* 27. 2018. <https://arxiv.org/pdf/1811.10781>.
16. Lucas B., Pérez L.M., Gálvez B.G. Importance and regulation of adult stem cell migration. *J. Cell Mol. Med.* 2018; 22 (2): 746–754. DOI: 10.1111/jcmm.13422.
17. Semba S., Kodama Y., Ohnuma K., Mizuuchi E., Masuda R., Yashiro M., Hirakawa K., Yokozaki H. Direct cancer-stromal interaction increases fibroblast proliferation and enhances invasive properties of scirrhous-type gastric carcinoma cells. *Br. J. Cancer.* 2009; 101 (8): 1365–1373. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605309.
18. Gonzalez D.M., Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling.* 2014; 7 (344): re8. DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
19. Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2015; 25 (11): 675–686. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.012.
20. Li H., Xu F., Li S., Zhong A., Meng X., Lai M. The tumor microenvironment: an irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal transition-mediated cancer metastasis. *Cell Adh. Migr.* 2016; 10 (4): 434–446. DOI: 10.1080/19336918.2015.1129481.
21. Chen C., Zimmermann M., Tinhofer I., Kaufmann A.M., Albers A.E. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2013; 338 (1): 47–56. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.06.013.
22. Hao J., Zhang Y., Deng M., Ye R., Zhao S., Wang Y., Li J., Zhao Z. MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells. *Int. J. Cancer.* 2014; 135 (5): 1019–1027. DOI: 10.1002/ijc.28761.
23. Liu X., Fan D. The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Current Pharmaceutical Design.* 2015; 21 (10): 1279–1291. DOI: 10.2174/138161282166614121115611.
24. Hollier B.G., Evans K., Mani S.A. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2009; 14 (1): 29–43. DOI: 10.1007/s10911-009-9110-3.
25. Förster S., Gretscher S., Jöns T., Yashiro M., Kemmer W. THBS4, a novel stromal molecule of diffuse-type gastric adenocarcinomas, identified by transcriptome-wide expression profiling. *Mod. Pathol.* 2011; 24 (10): 1390–1403. DOI: 10.1038/modpathol.2011.99.
26. West J., Bianconi G., Severini S., Teschendorff A.E. Differential network entropy reveals cancer system hallmarks. *Scientific Reports.* 2012; 802. DOI: 10.1038/srep00802.
27. Spinelli F.M., Vitale D.L., Demarchi G., Cristina C., Alaniz L. The immunological effect of hyaluronan in tumor angiogenesis. *Clin. Transl. Immunology.* 2015; 4 (12): 1–9. DOI: 10.1038/cti.2015.35.
28. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* 2014; 4: 62. DOI: 10.3389/fonc.2014.00062.
29. Kasashima H., Yashiro M., Nakamae H., Masuda G., Kinoshita H., Morisaki T., Fukuoka T., Hasegawa T., Sakurai K., Toyokawa T., Kubo N., Tanaka H., Muguruma K., Ohira M., Nakane T., Hino M., Hirakawa K. Bone marrow-derived stromal cells are associated with gastric cancer progression. *Br. J. Cancer.* 2015; 113 (3): 443–452. DOI: 10.1038/bjc.2015.236.

30. Gascard Ph., Tlsty Th.D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 2016; 30 (9): 1002–1019. DOI: 10.1101/gad.279737.116.
31. Shi Y., Du L., Wang Y. Tumor-associated mesenchymal stem/stromal cell: emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017; 16: 35–52. DOI: 10.1038/nrd.2016.193.
32. Miki D., Zhu P., Zhang W., Mao Y., Feng Zh., Huang H., Zhang H., Li Y., Liu R., Zhang H., Qi Y., Zhu J.-K. Efficient generation of diRNAs requires components in the posttranscriptional gene-silencing pathway. *Scientific Reports.* 2017; 7: 301. DOI: 10.1038/s41598-017-00374-7.
33. Cohen N., Shani O., Raz Y., Sharon Y., Hoffman D., Abramovitz L., Erez N. Fibroblast drive an immunosuppressive and growth-promoting microenvironment in breast cancer via secretion of chitinase 3-like 1. *Oncogene.* 2017; 36 (31): 4457–4468. DOI: 10.1038/onc.2017.65.
34. Dhanota N., Arora S.K. Cancer stem cells: a cause or a consequence of field cancerization. *International Journal of Translational Research.* 2018; 1 (1): 14–16.
35. De Filippis R.A., Fordyce C., Patten K., Chang H., Zhao J., Fontenay G.V., Kerlikowske K., Parvin B., Tlsty Th. D. stress signaling from human mammary epithelial cells contributes to phenotypes of mammographic density. *Cancer Res.* 2014; 74 (18): 5032–5044. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3390.
36. Kang N., Shah V.H., Urrutia R. Membrane-to-nucleus signals and epigenetic mechanisms for myofibroblastic activation and desmoplastic stroma: potential therapeutic targets for liver metastasis? *Mol. Cancer Res.* 2015; 13 (4): 604–612. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0542.
37. Afik R., Zigmund E., Vugman M., Klepfish M., Shimshoni E., Pasmanik-Chor M., Shenoy A., Bassat E., Halpern Z., Geiger T., Sagi I., Varol C. Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J. Exp. Med.* 2016; 213 (11): 2315–2331. DOI: 10.1084/jem.20151193.
38. Лазарев А.Ф., Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Брюханов В.М., Авдалян А.М., Лубенников В.А., Гервальд В.Я. Тучные клетки и опухолевый рост. *Сибирский онкологический журнал.* 2011; 4 (46): 59–63.
39. Рыков В.А. Опухолевое поле. *Архив патологии.* 1981; 10: 67–69.
40. Stearman R., Dwyer-Nield L., Grady M.C., Malkinson A.M., Yeraci M.W. A macrophage gene expression signature defines a field effect in the lung tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2008; 68 (1): 34–43. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0988.
41. Curtius K., Wright N.A., Graham T.A. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat. Rev. Cancer.* 2017; 18 (1): 19–32. DOI: 10.1038/nrc.2017.102.
42. Braakhuis B.J.M., Brakenhoff R.H., Leemans C.R. Second field tumor: a new opportunity for cancer preventing? *The Oncologist.* 2005; 10 (7): 493–500. DOI: 10.1634/theoncologist.10-7-493 theoncologist.alphamedpress.org/content/10/7/493.
43. Redente E.F., Orlicky D.J., Bouchard R.J. Tumour signaling to the bone marrow changes to the phenotype of monocytes and pulmonary macrophages during urethane-induced primary lung tumorigenesis in A/J mice. *Am. J. Pathol.* 2007; 170 (2): 693–708. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060566.
44. Франк Г.А. Рецидив злокачественной опухоли: понятие, сущность, терминология. *Архив патологии.* 2006; 3: 23–26.
45. Tabor M.P., Brakenhoff R.H., Ruijter-Schippers H.J., van der Wal J.E. et al. Multiple head and neck tumor frequently original from a single preneoplastic lesion. *Am. J. Pathol.* 2002; 161: 105–106. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64266-6.
46. Christensen S.R. Recent advances in field cancerization and management of multiple cutaneous squamous cell carcinomas. *Journal List. F1000Research.* 2018; 7: 690. DOI: 10.12688/f1000research.12837.1.
47. Pereira A.L., Magalhães L., Moreira F.C., Reis-das-Mercês L., Vidal A.F., Ribeiro-Dos-Santos A.M., Demachki S., Anaissi A.K.M., Burbano R.M.R., Albuquerque P., Dos Santos S.E.B., de Assumpção P.P., Ribeiro-Dos-Santos Â.K.C. Epigenetic field cancerization in gastric cancer: microRNAs as promising biomarkers. *Journal of Cancer.* 2019; 10 (6): 1560–1569. DOI: 10.7150/jca.27457.
48. Кит О.И., Франциянц Е.М., Геворкян Ю.А., Комарова Е.Ф., Сальникова М.М., Малейко М.Л. Состояние стероидного гомеостаза опухолевой ткани различных морфологических форм рака желудка. *Паллиативная медицина и реабилитация.* 2011; 4: 35–38.
49. Doglioni G., Parik S., Fendt S.M. Interactions in the (pre)metastatic niche support metastasis formation. *Frontiers in Oncology.* 2019; 9: 219. DOI: 10.3389/fonc.2019.00219.
50. Guo Ya., Ji X., Liu J., Fan D., Zhou Q., Chen Ch., Wang W., Wang G., Wang H., Yuan W., Ji Zh., Sun Zh. Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors. *Mol. Cancer.* 2019; 18 (39): 39. DOI: 10.1186/s12943-019-0995-1.

Сведения об авторах

Наумова Людмила Алексеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии и общей патологии, МИ, СурГУ, г. Сургут. ORCID 0000-0003-1145-3710.

Стародумова Валентина Анатольевна, аспирант, кафедра патофизиологии и общей патологии, МИ, СурГУ, г. Сургут. ORCID 0000-0001-8362-0608.

(✉) **Наумова Людмила Алексеевна**, e-mail: naumovala@yandex.ru.

Поступила в редакцию 07.11.2019

Подписана в печать 30.04.2020

Пищевод Барретта и аденокарцинома пищевода: биомаркеры пролиферации, апоптоза, аутофагии и ангиогенеза (обзор литературы)

Петенёва Е.С.¹, Салмина А.Б.², Бердников С.И.¹, Салмин В.В.², Абрамов В.Г.¹,
Медведева Н.Н.², Семичев Е.В.¹

¹ Федеральный Сибирский научно-клинический центр (ФСНКЦ)
Россия, 660037, г. Красноярск, ул. Коломенская, 26

² Красноярский государственный медицинский университет (КрасГМУ) имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

РЕЗЮМЕ

Цель: анализ известных маркеров пролиферации, апоптоза, аутофагии и ангиогенеза в патогенезе пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода для улучшения качества диагностики и лечения.

Материалы и методы. Анализ доступной литературы российских и зарубежных авторов.

Заключение. Структурированы данные по известным маркерам, которые в дальнейшем планируется внедрить в клиническую практику при диагностике и лечении пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода на разных стадиях развития заболеваний.

Ключевые слова: пищевод Барретта, аденокарцинома пищевода, пролиферация, апоптоз, аутофагия, ангиогенез, маркеры.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Петенёва Е.С., Салмина А.Б., Бердников С.И., Салмин В.В., Абрамов В.Г., Медведева Н.Н., Семичев Е.В. Пищевод Барретта и аденокарцинома пищевода: биомаркеры пролиферации, апоптоза, аутофагии и ангиогенеза (обзор литературы). *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 226–234. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-226-234>.

Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: biomarkers of proliferation, apoptosis, autophagy and angiogenesis

Petenyova E.S.¹, Salmina A.B.², Berdnikov S.I.¹, Salmin V.V.², Abramov V.G.¹,
Medvedeva N.N.², Semichev E.V.¹

¹ Federal Siberian Research Clinical Center
26, Kolomenskaya Str., Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky
1, Partizana Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

ABSTRACT

Aim: analysis of all known markers of proliferation, apoptosis, autophagy and angiogenesis in the pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma with the purpose of improvement of diagnostics and treatment quality.

Materials and methods. Analysis of the available scientific sources by Russian and foreign authors.

Results. Data on all the known markers has been structured and is supposed to be integrated into clinical practice in the diagnosis and treatment of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma at various stages of disease development

Key words: Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma, proliferation, apoptosis, autophagy, angiogenesis, markers.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors received no specific funding for this work.

For citation: Petenyova E.S., Salmina A.B., Berdnikov S.I., Salmin V.V., Abramov V.G., Medvedeva N.N., Semichev E.V. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: biomarkers of proliferation, apoptosis, autophagy and angiogenesis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 226–234. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-226-234>.

ВВЕДЕНИЕ

Пищевод Барретта (ПБ) – это патологическое состояние, при котором под воздействием рефлюксата (содержимое желудка: соляная кислота, пищеварительные ферменты, желчные кислоты) происходит замещение неороговевающего плоского эпителия дистального отдела пищевода специализированным цилиндрическим эпителием с бокаловидными клетками, с формированием участков метаплазии и дисплазии эпителия. По данным разных авторов, частота ПБ в популяции составляет 2,4–4% и представляет собой предраковое заболевание, поэтому крайне важна проблема диагностики, ранней выявляемости и мониторинга этих больных в связи с высоким риском малигнизации. В свою очередь, рак пищевода в структуре всех злокачественных заболеваний составляет 3% и занимает 6-е место, среди опухолей желудочно-кишечного тракта – 3-е место (после рака желудка и прямой кишки) [1].

ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ПИЩЕВОДА БАРРЕТА И АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПИЩЕВОДА

Неопластическая прогрессия ПБ выражается появлением участков метаплазии и далее нарастанием степени дисплазии эпителия (дисплазия низкой степени – дисплазия высокой степени) [2–4]. При продолжающемся воздействии рефлюксата на слизистую пищевода при отсутствии лечения развивается аденокарцинома пищевода (АКП), которая редко

выявляется на начальных стадиях заболевания из-за позднего появления клинических симптомов. Среди них – болевой синдром (который в клинической практике часто воспринимается как проявление других патологических состояний и заболеваний сердечно-сосудистой, бронхолегочной систем), дисфагия, респираторные маски в виде приступообразного сухого кашля, усиливающегося после еды и в положении лежа. В связи с этим возможность проведения оперативного лечения на момент установления диагноза обычно не превышает 50% [4]. Частота развития АКП на фоне ПБ неуклонно нарастает, составляя до 5% пациентов с ПБ в год, при этом пятилетняя выживаемость пациентов с АКП крайне низка и, по различным данным, составляет не более 15% [1, 2, 4]. Прогнозирование малигнизации, четкое определение маркеров даст возможность отслеживать течение ПБ, переход в АКП, и, соответственно, способствовать раннему выявлению и своевременному лечению данной патологии.

Поиск соответствующих маркеров для диагностики ПБ неотделим от патогенеза заболевания. Патогенез ПБ изучен недостаточно. Метаплазия считается следствием длительно существующей гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ), при которой происходит постоянный контакт агрессивных факторов рефлюксата с многослойным плоским эпителием пищевода. Факторы риска: мужской пол, возраст старше 50 лет, клинические симптомы ГЭРБ (основные); европеоидный тип, грыжа пищеводного отверстия диафрагмы, ожирение (абдоминальный

тип), курение, семейный анамнез и генетическая предрасположенность (дополнительные).

Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что ПБ является стадией развития АКП. Причины, запускающие развитие метаплазии и дисплазии, а также молекулярные механизмы патогенеза этих состояний до сих пор остаются недостаточно изученными. Существует несколько теорий образования ПБ, и продолжают дискуссии относительно механизмов патогенеза данной патологии. Известно, что при наличии кислотного рефлюкса происходит замещение плоского неороговевающего эпителия в поврежденной слизистой оболочке пищевода метапластическим цилиндрическим эпителием [2] (рис. 1–4).

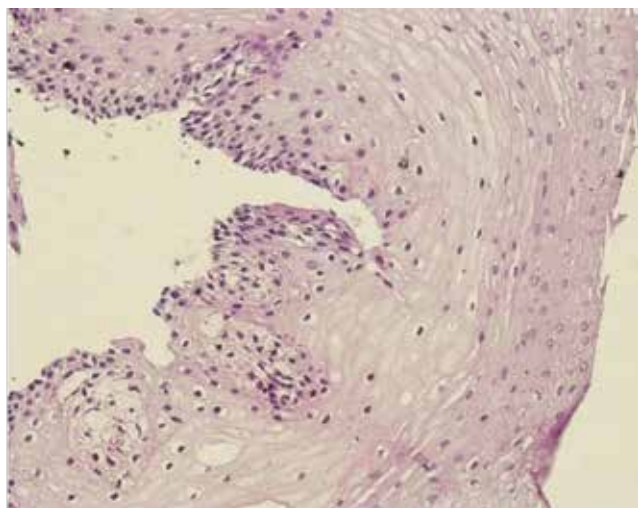


Рис. 1. Пищевод здорового человека: окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

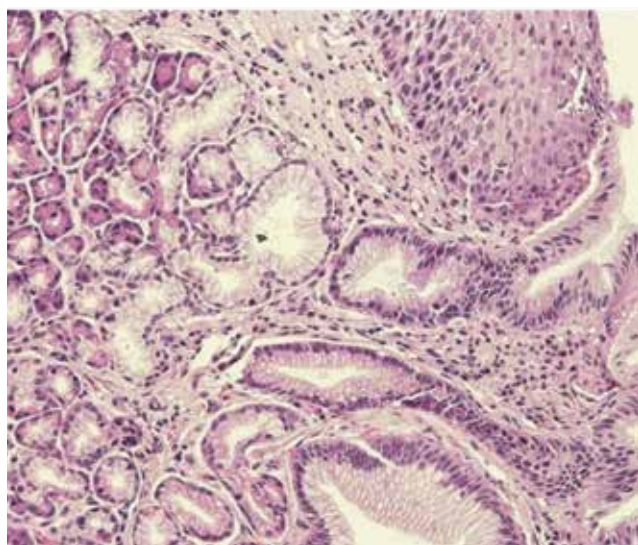


Рис. 2. Область перехода пищевода в желудок у здорового человека: окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

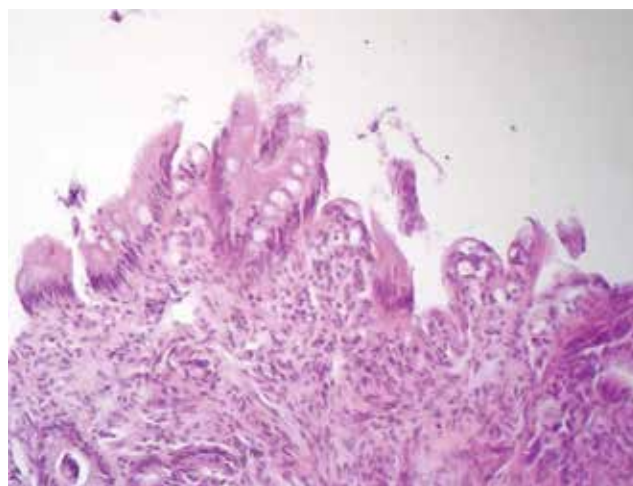


Рис. 3. Слизистая дистального отдела пищевода пациента с диагнозом пищевода Барретта: метаплазированный тип слизистой оболочки, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

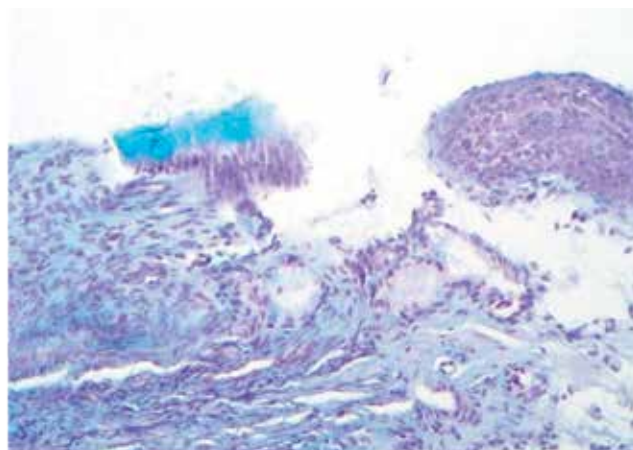


Рис. 4. Слизистая дистального отдела пищевода пациента с диагнозом пищевода Барретта: метаплазированный тип слизистой оболочки, окраска по Крейбергу на муцин, $\times 200$

Однако суточное внутрипищеводное мониторирование pH и билирубина выявило, что у до 90% пациентов с ПБ преобладает смешанный кислотно-билиарный рефлюкс, который вызывает более сильное повреждение мембран и межклеточных контактов из-за синергизма воздействия соляной кислоты, ферментов желудочного сока и конъюгатов желчных кислот [4]. Конъюгированные липофильные желчные кислоты увеличивают проницаемость апикальных клеточных мембран, тем самым способствуя диффузии протонов водорода внутрь ткани, что в итоге оказывает основное повреждающее действие. Повреждение клеток поверхностного слоя эпителия стимулирует регенерацию и компенсаторное утолщение эпителиального слоя под воздействием эпидермального фактора роста, что приводит к увеличению протяженности зоны пролиферации,

формированию и удлинению сосочков собственной пластины слизистой оболочки пищевода [5–7]. В это время стволовые клетки базального слоя на высоте сосочков подвержены воздействию кислоты, ферментов и желчных кислот. В связи с этим базальная эпителиальная клетка-предшественница, являясь полипотентной, может дифференцироваться не в плоский, а в более устойчивый к влиянию компонентов рефлюксата цилиндрический эпителий («защитный механизм» от воздействия агрессивных факторов рефлюксата).

Существуют и другие теории механизма образования метаплазии Барретта. Одна из первых гипотез развития ПБ, заключающаяся в восходящей миграции эпителиальных клеток желудка из пищеодно-желудочного перехода в качестве репаративного механизма для замещения поврежденной кислотой и другими компонентами рефлюксата слизистой оболочки пищевода, к настоящему времени уступила точке зрения о том, что ПБ развивается *de novo* из клеток, присущих пищеводу, а не мигрирующих из желудка [4].

По современным представлениям, к факторам формирования злокачественного новообразования относят способность канцерогенных агентов вызывать повреждение генома клетки. Для злокачественной прогрессии любой локализации характерно увеличение пролиферации и уменьшение апоптоза [8]. Пищевод в этом плане не является исключением. Неопластическая прогрессия происходит у больных с приобретенной генетической нестабильностью, при которой появляются патологические клоны клеток, в которых определяется анеуплоидия, что позволяет рассматривать анеуплоидию при ПБ в качестве маркера высокого риска злокачественной прогрессии [9].

Прогрессия ПБ также затрагивает барьерную функцию эпителия пищевода. Нарушение регуляции комплекса молекул Е-кадгерина и β -катенина, отвечающих за клеточную адгезию, и снижение их экспрессии на клеточной мембране происходят на поздних стадиях развития дисплазии. В пищеводе Барретта наблюдается снижение экспрессии Е-кадгерина и β -катенина при нарастании дисплазии [10]. При этом чем больше снижена экспрессия этих белков, тем хуже прогноз при АКП. При повышении экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) уменьшается клеточная адгезия, увеличиваются ангиогенез и пролиферация, снижается апоптоз [11].

Другой потенциальной точкой изучения прогрессии ПБ в АКП является экспрессия такого маркера, как маспин. Исследования в этой области показали, что поражения каждой патологической степени могут быть разделены на подтипы, которые демон-

стрируют различные схемы субклеточного распределения маспина, включая только ядерное (Nuc), комбинированное ядерное и цитоплазматическое (Nuc + Cyt), только цитоплазматическое (Cyt) и в целом незначительное (Neg). Таким образом, подтип Cyt паттерна экспрессии маспина может служить молекулярным маркером ранней АКП [12].

Согласно литературным данным, проводятся исследования дифференциально экспрессируемых генов (DEG) в качестве потенциальных маркеров перехода пищевода Барретта в аденокарциному пищевода. Учитывая результаты некоторых исследований, можно предположить, что панель дифференциально экспрессируемых генов может встречаться в случаях высокой чувствительности к воздействию «факторов риска» при формировании АКП, а также при прогрессировании данного патологического состояния.

Известны данные об исследовании маркеров p504s и CD133, которые могут выступать маркерами пролиферации и в перспективе будут использованы для дифференциальной диагностики доброкачественной метаплазии и АКП [2].

Фосфорилированный гистон H3 является потенциальным маркером, с помощью которого станет возможно дифференцировать дисплазию низкой и высокой степени и АКП. Согласно литературным данным, аденокарцинома имела более высокие показатели митозов (по уровню фосфорилированного гистона H3), чем дисплазия высокой степени [13].

Определенное значение в патогенезе ПБ имеет аутофагия. Аутофагия – это высококонсервативный механизм, который активируется во время клеточного стресса. Предположительно, аутофагия может быть вызвана кислотным рефлюксом, который вызывает повреждение и воспаление и, следовательно, способствует развитию ПБ и АКП. В настоящее время роль аутофагии при ПБ и АКП плохо изучена. Согласно данным различных исследователей, аутофагия функционирует для улучшения выживаемости клеток после повреждения рефлюксатом. Таким образом, аутофагия может играть решающую роль в патогенезе и прогрессировании ПБ, что требует дальнейшего изучения [14, 15].

Другим важным и активно изучаемым направлением является механизм эпигенетического дрейфа – постепенное изменение профиля метилирования ДНК с возрастом организма [16]. Предположительно, это является следствием нарушения регуляции работы молекулярного аппарата, поддерживающего нормальный профиль метилирования, которое заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца [16–18].

Метилирование в промоторной зоне гена, как правило, приводит к супрессии транскрипции соответствующего гена. Метилированный цитозин, в свою очередь, может затем окисляться особыми ферментами, что приводит к его деметилированию обратно в цитозин. Зная, что АКП является, как правило, следствием ПБ, где нормальный плоскоклеточный эпителий заменяется кишечным в ответ на хронический гастроэзофагеальный кислотно-билиарный рефлюкс и оба этих состояния характеризуются потерей гетерозиготности, анеуплоидии, специфическими генетическими мутациями и клональным разнообразием, геномный и эпигеномный анализы могут улучшить точность стратификации риска [17]. Тесты для выявления молекулярных изменений, связанных с прогрессированием опухоли, могут быть использованы для улучшения патологической оценки ПБ и АКП, отбора пациентов с высоким риском развития данных патологий для более интенсивного наблюдения.

Также следует учитывать, что формирование ПБ и в дальнейшем АКП связано с определенными демографическими и поведенческими факторами, включая пол, ожирение, повышенный индекс массы тела и курение [17–19].

Таким образом, патогенез ПБ в настоящее время до конца не ясен, он, вероятно, является мультифакторным. Из-за сильной взаимосвязи между АКП и ПБ, ПБ и ГЭРБ факторы, вовлеченные в развитие ГЭРБ, в последние годы были в центре внимания при попытке объяснить наблюдающийся рост распространенности АКП. В патогенезе ПБ и его прогрессии в АКП важную роль играют процессы увеличения пролиферации и угнетения апоптоза, повреждение факторов барьерной функции эпителия.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ, АНГИОГЕНЕЗ, АПОПТОЗ, АУТОФАГИЯ ПРИ ПИЩЕВОДЕ БАРРЕТА И АДЕНОКАРЦИНОМЕ ПИЩЕВОДА

Согласно проанализированным нами данным, наиболее часто используемыми для диагностики и оценки прогноза при ПБ и АКП являются следующие маркеры: экспрессия белка Ki 67, мутация гена p53, анеуплоидия (при ПБ), повышение экспрессии ЦОГ-2 (низкая специфичность, активно изучается как маркер, участвующий в патогенезе ПБ), VEGFR (маркер ангиогенеза). В таблице представлены краткие характеристики некоторых молекулярных маркеров.

Таблица

Маркеры при заболеваниях пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода	
Пищевод Барретта	Аденокарцинома пищевода
<i>Пролиферация</i>	
MUC-1 – «кишечный» муцин. Диагностическая чувствительность – 95%, в том числе в 55% отмечен в бокаловидных клетках. При выраженной дисплазии экспрессия усиливается [20]	Ki-67 – классический маркер клеточной пролиферации. Его экспрессия позволяет выделить клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла на всем его протяжении (G1-, S-, G2- и M-фазы), отсутствует только в G0-периоде. При Ki-67 менее 15% опухоль считается менее агрессивной, при показателе более 30% – высокоагрессивной [21–23]
TFF1, TFF2 – факторы трилистника, отмечены в секрете бокаловидных клеток, клеток Панета, обеспечивают регуляцию пролиферации, дифференцировки и апоптоза [24]	Рецепторы холецистокинина-2 (CCK2R) сверхэкспрессируются при различных злокачественных заболеваниях; потенциальные маркеры для изучения прогрессии пищевода Барретта в АКП [24]
TGFα , воздействуя на метаплазированные клетки ПБ, стимулируют секрецию VEGF [31]	SATB1 влияет на экспрессию сотен генов, участвующих в патогенезе рака человека; может быть вовлеченным в канцерогенез; перспективен в качестве прогностического биомаркера и новой терапевтической мишени на основе его уровня экспрессии в солидных опухолях [25–27]
Рецептор erbB-2/Her2 амплифицируется приблизительно в 10–50% АКП с сопутствующей повышенной экспрессией мРНК или белка. Предположительно, это повреждение является поздней стадией в канцерогенезе ПБ [31]	Mcm2 участвует во всех этапах клеточного цикла; представленность – у не прогрессирующих форм 3,4%, при аденокарциноме до 28,4% [28]
ЦОГ-2 является ключевым ферментом в пути синтеза простагландинов, способствует канцерогенезу при ПБ. Повышенная экспрессия обнаруживается при прогрессировании от ПБ до АКП и связана с пролиферацией и снижением выживаемости [30, 31]	P53 . При наличии мутаций происходит его накопление, в том числе в ядре клеток. Представленность маркера меняется: 5% (отсутствие дисплазии); 10–20% (дисплазия низкого уровня), свыше 60% (дисплазия высокого уровня) и свыше 70% (наличие аденокарциномы) [29, 30]
	Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) – это ядерный негистоновый белок, необходимый для синтеза ДНК. Является вспомогательным белком для ДНК-полимеразы α , которая повышается во время фазы G1/S клеточного цикла. Экспрессия PCNA может использоваться в качестве маркера, так как клетки пролиферируют в течение более длительного времени в фазе G1/S клеточного цикла. Играет важную роль в метаболизме нуклеиновых кислот как компонент механизма репликации и репарации ДНК [10, 47]

Продолжение табл.

Пищевод Баррета	Аденокарцинома пищевода
	P27 ингибирует комплекс E/Cdk2, что препятствует началу стадии S клеточного цикла. Основные виды повреждения – гиперметилование, снижение гетерозиготности [28]
	EGFR является онкогеном, который кодирует трансмембранный рецептор тирозинкиназы. Его неправильная регуляция связана с несколькими видами рака человека [31]
	TGFβ занимает центральное место в эпителиальном гомеостазе, регулируя пролиферацию и дифференцировку. В нормальных клетках одной из функций TGFβ является индуцируемая остановка клеточного цикла, и многие эпителиальные опухоли устойчивы к этому ответу. TGFβ участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе в опухолевых клетках, особенно на инвазивных краях, это изменение фенотипа способствует инвазии и метастазированию. Экспрессия TGFβ повышена в АКП по сравнению с нормальным пищеводом и ПБ [31]
	МикроРНК (miRNAs, microRNA) – класс эндогенной и одноцепочечной РНК, является подсемейством небольшой некодирующей регуляторной РНК размером 18–22 нуклеотида, участвует в различных физиологических и патологических процессах, играет важную роль в онкогенезе посредством прямой или косвенной регуляции экспрессии различных онкогенов или опухолевых супрессоров [32]
	CYFRA 21-1 – один из структурных элементов клеток эпителия, формирующий их каркас (цитоскелет) и многочисленные белки-цитокератины (их разновидностей около 25); используется для диагностики некоторых раковых опухолей [33]
	Фибронектин 1 (FN1) является членом семейства гликопротеинов, расположенных на хромосоме 2q35. Сообщалось, что FN1 активируется во многих опухолях, и его экспрессия отрицательно связана с прогнозом и выживаемостью раковых пациентов [34]
	Лептин. Показано, что экспрессия лептина и его рецептора присутствует в культурах клеток некоторых видов рака пищевода, а добавление рекомбинантного лептина к данным клеточным линиям приводит к значимому дозозависимому повышению пролиферации клеток и подавлению апоптоза [35]
	Белок p21. Точная роль p21 в канцерогенезе до конца пока не установлена. Но при некоторых типах опухолей потеря p21 является признаком плохих шансов на выживание. Однако иногда его повышенная концентрация положительно коррелирует с агрессивностью опухоли и ее способностью к метастазированию. Это особенно относится к тем случаям, когда p21 накапливается в цитоплазме, а не в ядре клетки [22, 31]
	CDX2 – ген, который кодирует специфический транскрипционный фактор, его белок экспрессируется на ранних стадиях развития тонкого кишечника и может иметь значение в регулировании пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток тонкого кишечника. Он экспрессируется в ядрах эпителиальных клеток кишечника от двенадцатиперстной кишки до прямой кишки; в первичных и метастатических опухолях толстого кишечника, а также выявляется при кишечной метаплазии желудка и кишечном типе рака желудка; в нормальных эпителиальных клетках желудка он не встречается [28, 36]
<i>Ангиогенез</i>	
	VEGF (VEGFR) обеспечивает неореваскуляризацию метаплазированных тканей – одно из ранних событий, поддерживающих опухолевую прогрессию ПБ [37]
	VEGFR -1, -2. VEGFR-1 регулирует ангиогенез с помощью механизмов, которые включают захват лигандов, гомо- и гетеродимеризацию рецепторов. Его функция в ангиогенезе может включать в себя его связывающую лиганд внеклеточную область, действующую в качестве ловушки VEGF для модуляции функции VEGFR-2 (который, в свою очередь, является рецептором сосудистого эндотелиального роста). Исследование этих маркеров играет важную роль в создании соединений, нацеленных на подавление сосудистого роста в опухолях [37]
<i>Апоптоз</i>	
	P16. Основные виды повреждения: гиперметилование, снижение гетерозиготности, мутации, метилирование промотора. Снижение гетерозиготности отмечается у 75% пациентов с аденокарциномой [31]

Окончание табл.

Пищевод Барретта	Аденокарцинома пищевода
	Ядерный фактор каппа В (NF-κB) активируется при различных типах рака, является медиатором канцерогенеза, заставляя злокачественные опухолевые клетки избегать апоптоза с контрольной точки клеточного цикла. Показано, miRNAs и NF- κ B играют важную роль в развитии и прогрессировании опухоли [34]
Аутофагия	
Комплекс mTORC1 регулирует сигнальный путь, приводящий к активации аутофагии путем фосфорилирования и ингибирования киназной активности Unc-51-подобной киназы 1 (ULK1)). После лишения питательных веществ репрессия mTORC1 ослабляется, и активный ULK1 образует комплекс с mAtg13, FIP200 (или RB1CC1) и Atg101, что приводит к активации аутофагии [38]	UVRAG – ген, связанный с устойчивостью к ультрафиолетовому излучению, является опухолевым супрессором, участвующим в аутофагии. UVRAG первоначально идентифицирован как BECN1-связывающий белок макроаутофагии и аутофагии, управляет клеточными процессами для поддержания гомеостаза и генетической стабильности, включая транспорт ER-Golgi, эндосомальную деградацию, репарацию ДНК и целостность centrosom. Следовательно, опухолевые клетки могут стремиться инактивировать UVRAG в некоторых контекстах, чтобы устранить важное препятствие для развития рака [15, 39, 45, 46]
ATG8 – ген, связанный с аутофагией. Белок ATG8 участвует в формировании аутофагосом, распознавании груза и рекрутировании в аутофагосомы. В клетках человека экспрессируются не менее семи гомологов ATG8 (ATG8 млекопитающих, mATG8). Они обычно делятся на два подсемейства белков GABARAP (белка, ассоциированного с рецептором гамма-аминомасляной кислоты типа A), включая GABARAP/L1/L2, а также LC3, который содержит LC3A (a, b)/B/C [14, 41–43]	
ULK1 рекрутируется в комплекс Beclin-1-ATG14L-VPS34 через взаимодействие с ATG14L. Беклин-1 активируется фосфорилированием ULK1, активность PI3 киназы VPS34 стимулирует продукцию PtdIns P, необходимую для образования и (или) созревания аутофагосом [37, 38, 40]	
Липидкиназа VPS34 является важным медиатором многих аспектов внутриклеточного транспорта посредством образования фосфоинозитид-3-фосфата на мембранах [40, 44]	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализа литературы показал, что исследования в области этиологии, патогенеза ПБ и АКП, а также верификации данных патологических состояний, прогноза и выбора методов лечения остаются незавершенными. Прослеживается ситуация несвоевременной выявляемости и, соответственно, позднего начала лечения ПБ, в связи с чем повышается риск развития АКП. Отмечен довольно высокий риск развития АКП на фоне ПБ, что открывает перед нами новые возможности в диагностике и лечении данных патологических состояний. С нашей точки зрения, наиболее актуальными остаются вопросы детального изучения маркеров пролиферации, апоптоза, аутофагии и ангиогенеза, выбор наиболее значимых из них с целью ранней диагностики патологии пищевода и использование маркеров в качестве возможной иммунобиологической терапии пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода. Следовательно, изучение данной проблемы не теряет своей актуальности и требует проведения дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вахлюева О.Г. Клинико-диагностические критерии пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода. *Бюлле-*

тень медицинских интернет-конференций. 2013; 3 (3): 517–519.

- Ahmad J., Arthur K., Maxwell P., Kennedy A., Johnston B.T., Murray L., McManus D.T. A cross sectional study of p504s, CD133, and Twist expression in the esophageal metaplasia dysplasia adenocarcinoma sequence. *Dis. Esophagus*. 2015; 28 (3): 276–282. DOI: 10.1111/dote.12181.
- Пирогов С.С., Карселадзе А.И. Молекулярно-генетические исследования в диагностике и оценке неопластической прогрессии пищевода Барретта (обзор). *Сибирский онкологический журнал*. 2008; 1: 85–94.
- Тер-Ованесов М.Д. Пищевод Барретта: этиология, патогенез, современные подходы к лечению (обзор). *Медицинский альманах*. 2011; 5: 41–48.
- Zali M.R., Zadeh-Esmaeel M.M., Rezaei-Tavirani M., Tabatabaei S.E., Ahmadi A.N. Barrett's esophagus transits to a cancer condition via potential biomarkers. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench*. 2018; 11 (Suppl. 1): S80–S84.
- Коломацкая П.Б. Пищевод Барретта. Эпидемиология, экология, патогенез, морфологическая характеристика, возможности эндоскопической диагностики. Литературный обзор. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России*. 2011; 11 (4): 212–229.
- Wu J., Ding J., Yang J., Guo X., Zheng Y. MicroRNA roles in the nuclear factor kappa B signaling pathway in cancer. *Front. Immunol*. 2018; 9: 546. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00546.
- Reid B.J., Li X., Galipeau P.C., Vaughan T.L. Barrett's

- oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 10 (2): 87–101. DOI: 10.1038/nrc2773.
9. Götzel K., Chemnitzer O., Maurer L., Dietrich A., Eichfeld U., Lyros O., Moulla Y., Niebisch S., Mehdorn M., Jansen-Winkel B., Vieth M., Hoffmeister A., Gockel I., Thieme R. In-depth characterization of the Wnt-signaling/ β -catenin pathway in an in vitro model of Barrett's sequence. *BMC Gastroenterol*. 2019; 19 (1): 38. DOI: 10.1186/s12876-019-0957-5.
 10. Hashimoto N. Expression of COX2 and p53 in rat esophageal cancer induced by reflux of duodenal contents. *ISRN Gastroenterol*. 2012; 2012: 914824. DOI: 10.5402/2012/914824.
 11. Dzinic S.H., Mahdi Z., Bernardo M.M., Vranic S., Beydoun H., Nahra N., Alijagic A., Harajli D., Pang A., Saliganan D.M., Rahman A.M., Skenderi F., Hasanbegovic B., Dyson G., Beydoun R., Sheng S. Maspin differential expression patterns as a potential marker for targeted screening of esophageal adenocarcinoma/gastroesophageal junction adenocarcinoma. *PLoS One*. 2019; 14 (4): e0215089. DOI: 10.1371/journal.pone.0215089.
 12. Zhou Z., Lu H., Zhu S., Goma A., Chen Z., Yan J., Washington K., El-Rifai W., Dang C., Peng D. Activation of EGFR-DNA-PKcs pathway by IGFBP2 protects esophageal adenocarcinoma cells from acidic bile salts-induced DNA damage. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2019; 38 (1): 13. DOI: 10.1186/s13046-018-1021-y.
 13. Goodarzi M., Correa A.M., Ajani J.A., Swisher S.G., Hofstetter W.L., Guha S., Deavers M.T., Rashid A., Maru D.M. Anti-phosphorylated histone H3 expression in Barrett's esophagus, low-grade dysplasia, high-grade dysplasia, and adenocarcinoma. *Mod. Pathol*. 2009; 22 (12): 1612–1621. DOI: 10.1038/modpathol.2009.133.
 14. Gan W., Zhang C., Siu K.Y., Satoh A., Tanner J.A., Yu S. ULK1 phosphorylates Sec23A and mediates autophagy-induced inhibition of ER-to-Golgi traffic. *BMC Cell Biol*. 2017; 18 (1): 22. DOI: 10.1186/s12860-017-0138-8.
 15. Keown J.R., Black M.M., Ferron A., Yap M., Barnett M.J., Pearce F.G., Stoye J.P., Goldstone D.C. A helical LC3-interacting region mediates the interaction between the retroviral restriction factor Trim5 α and mammalian autophagy-related ATG8 proteins. *J. Biol. Chem*. 2018; 293 (47): 18378–18386. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004202.
 16. Li S., Jang G.B., Quach C., Liang C. Darkening with UVRAG. *Autophagy*. 2019; 15 (2): 366–367. DOI: 10.1080/15548627.2018.1522911.
 17. Agarwal A., Polineni R., Hussein Z., Vigoda I., Bhagat T.D., Bhattacharyya S., Maitra A., Verma A. Role of epigenetic alterations in the pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2012; 5 (5): 382–396.
 18. Kaz A.M., Grady W.M., Stachler M.D., Bass A.J. Genetic and epigenetic alterations in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol. Clin. North Am*. 2015; 44 (2): 473–489. DOI: 10.1016/j.gtc.2015.02.015.
 19. Luebeck E.G., Curtius K., Hazelton W.D., Maden S., Yu M., Thota P.N., Patil D.T., Chak A., Willis J.E., Grady W.M. Identification of a key role of widespread epigenetic drift in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clin. Epigenetics*. 2017; 9 (1): 113. DOI: 10.1186/s13148-017-0409-4.
 20. Nieto T., Tomlinson C.L., Dretzke J., Bayliss S., Price M.J., Dilworth M., Beggs A.D., Tucker O. A systematic review of epigenetic biomarkers in progression from non-dysplastic Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *BMJ Open*. 2018; 8 (6): e020427. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020427.
 21. Butt M.A., Pye H., Haidry R.J., Oukrif D., Khan S.U., Puccio I., Gandy M., Reinert H.W., Bloom E., Rashid M., Yahioğlu G., Deonarain M.P., Hamoudi R., Rodriguez-Justo M., Novelli M.R., Lovat L.B. Upregulation of mucin glycoprotein MUC1 in the progression to esophageal adenocarcinoma and therapeutic potential with a targeted photoactive antibody-drug conjugate. *Oncotarget*. 2017; 8 (15): 25080–25096. DOI: 10.18632/oncotarget.15340.
 22. Sobiecki M., Mrouj K., Camasses A., Parisi N., Nicolas E., Llères D., Gerbe F., Prieto S., Krasinska L., David A., Eguren M., Birling M.C., Urbach S., Hem S., Déjardin J., Malumbres M., Jay P., Dulic V., Lafontaine D.L.J., Feil R., Fisher D. The cell proliferation antigen Ki-67 organizes heterochromatin. *Elife*. 2016; 5: e13722. DOI: 10.7554/eLife.13722.
 23. Sun X., Bizhanova A., Matheson T.D., Yu J., Zhu L.J., Kaufman P.D. Ki-67 contributes to normal cell cycle progression and inactive X heterochromatin in p21 checkpoint-proficient human cells. *Mol. Cell. Biol*. 2017; 37 (17): e00569-16. DOI: 10.1128/MCB.00569-16.
 24. Roy J., Putt K.S., Coppola D., Leon M.E., Khalil F.K., Centeno B.A., Clark N., Stark V.E., Morse D.L., Low P.S. Assessment of cholecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue. *Oncotarget*. 2016; 7 (12): 14605–14615. DOI: 10.18632/oncotarget.7522.
 25. Jin E.H., Lee S.I., Kim J., Seo E.Y., Lee S.Y., Hur G.M., Shin S., Hong J.H. Association between promoter polymorphisms of TFF1, TFF2, and TFF3 and the risk of gastric and diffuse gastric cancers in a Korean population. *J. Korean Med. Sci*. 2015; 30 (8): 1035–1041. DOI: 10.3346/jkms.2015.30.8.1035.
 26. Grzanka D., Kowalczyk A.E., Izdebska M., Klimaszewska-Wisniewska A., Gagat M. The interactions between SATB1 and F-actin are important for mechanisms of active cell death. *Folia Histochem. Cytobiol*. 2015; 53 (2): 152–161. DOI: 10.5603/fhc.a2015.0018.
 27. Sunkara K.P., Gupta G., Hansbro P.M., Dua K., Bebawy M. Functional relevance of SATB1 in immune regulation and tumorigenesis. *Biomed. Pharmacother*. 2018; 104: 87–93. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.045.
 28. Wang S., Zeng J., Xiao R., Xu G., Liu G., Xiong D., Ye Y., Chen B., Wang H., Luo Q., Huang Z. Poor prognosis and SATB1 overexpression in solid tumors: a meta-analysis. *Cancer Manag Res*. 2018; 10: 1471–1478. DOI: 10.2147/CMAR.S165497.
 29. Grady W.M., Yu M. Molecular evolution of metaplasia to adenocarcinoma in the esophagus. *Dig. Dis. Sci*. 2018; 63 (8): 2059–2069. DOI: 10.1007/s10620-018-5090-8.
 30. Duits L.C., Lao-Sirieix P., Wolf W.A., O'Donovan M., Galeano-Dalmau N., Meijer S.L., Offerhaus G.J.A., Redman J., Crawte J., Zeki S., Pouw R.E., Chak A., Shaheen N.J., Bergman J.J.G.H.M., Fitzgerald R.C. A biomarker panel predicts progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Dis. Esophagus*. 2018; 32 (1): 102. DOI: 10.1093/dote/doy102.

31. Hashimoto N. Expression of COX2 and p53 in rat esophageal cancer induced by reflux of duodenal contents. *ISRN Gastroenterol.* 2012; 2012: 914824. DOI: 10.5402/2012/914824.
32. Clemons N.J., Phillips W.A., Lord R.V. Signaling pathways in the molecular pathogenesis of adenocarcinomas of the esophagus and gastroesophageal junction. *Cancer Biol. Ther.* 2013; 14 (9): 782–795. DOI: 10.4161/cbt.25362.
33. Wu J., Ding J., Yang J., Guo X., Zheng Y. MicroRNA roles in the nuclear factor kappa B signaling pathway in cancer. *Front. Immunol.* 2018; 9: 546. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00546.
34. Gauthé M., Richard-Molard M., Rigault E., Buecher B., Mariani P., Bellet D., Cacheux W., Lièvre A. Prognostic value of serum CYFRA 21-1 in patients with anal canal squamous cell carcinoma treated with radio (chemo) therapy. *BMC Cancer.* 2018; 18 (1): 417. DOI: 10.1186/s12885-018-4335-4.
35. Wang J., Deng L., Huang J., Cai R., Zhu X., Liu F., Wang Q., Zhang J., Zheng Y. High expression of Fibronectin 1 suppresses apoptosis through the NF- κ B pathway and is associated with migration in nasopharyngeal carcinoma. *Am. J. Transl. Res.* 2017; 9 (10): 4502–4511.
36. Howard J.M., Pidgeon G.P., Reynolds J.V. Лептин и злокачественные опухоли желудочно-кишечного тракта. *Ожирение и метаболизм.* 2011; 8 (2): 69–70.
37. Johnson D.R., Abdelbaqui M., Tahmasbi M., Mayer Z., Lee H.W., Malafa M.P., Coppola D. CDX2 protein expression compared to alcian blue staining in the evaluation of esophageal intestinal metaplasia. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21 (9): 2770–2776. DOI: 10.3748/wjg.v21.i9.2770.
38. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front. Biosci.* 2006; 11: 818–829. DOI: 10.2741/1839.
39. Nieto T., Tomlinson C.L., Dretzke J., Bayliss S., Price M.J., Dilworth M., Beggs A.D., Tucker O. A systematic review of epigenetic biomarkers in progression from non-dysplastic Barrett's oesophagus to oesophageal adenocarcinoma. *BMJ Open.* 2018; 8 (6): e020427. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020427.
40. Yang Y., He S., Wang Q., Li F., Kwak M.J., Chen S., O'Connell D., Zhang T., Pirooz S.D., Jeon Y.H., Chimge N.O., Frenkel B., Choi Y., Aldrovandi G.M., Oh B.H., Yuan Z., Liang C. Autophagic UVIRAG promotes UV-induced photolesion repair by activation of the CRL4DDB2 E3 ligase. *Mol. Cell.* 2016; 62 (4): 507–519. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.04.014.
41. Gan W., Zhang C., Siu K.Y., Satoh A., Tanner J.A., Yu S. ULK1 phosphorylates Sec23A and mediates autophagy-induced inhibition of ER-to-Golgi traffic. *BMC Cell Biol.* 2017; 18 (1): 22. DOI: 10.1186/s12860-017-0138-8.
42. Jeon P., Park J.H., Jun Y.W., Lee Y.K., Jang D.J., Lee J.A. Development of GABARAP family protein-sensitive LIR-based probes for neuronal autophagy. *Mol. Brain.* 2019; 12 (1): 33. DOI: 10.1186/s13041-019-0458-z.
43. Kauffman K.J., Yu S., Jin J., Mugo B., Nguyen N., O'Brien A., Nag S., Lystad A.H., Melia T.J. Delipidation of mammalian Atg8-family proteins by each of the four ATG4 proteases. *Autophagy.* 2018; 14 (6): 992–1010. DOI: 10.1080/15548627.2018.1437341.
44. Simons I.M., Mohrlüder J., Feederle R., Kremmer E., Zobel T., Dobner J., Bleffert N., Hoffmann S., Willbold D. The highly GABARAP specific rat monoclonal antibody 8H5 visualizes GABARAP in immunofluorescence imaging at endogenous levels. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 526. DOI: 10.1038/s41598-018-36717-1.
45. Pyo K.E., Kim C.R., Lee M., Kim J.S., Kim K.I., Baek S.H. ULK1 O-GlcNAcylation is crucial for activating VPS34 via ATG14L during autophagy initiation. *Cell Rep.* 2018; 25 (10): 2878–2890. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.042.
46. He S., Liang C. Frameshift mutation of UVIRAG: Switching a tumor suppressor to an oncogene in colorectal cancer. *Autophagy.* 2015; 11 (10): 1939–1940. DOI: 10.1080/15548627.2015.1086523.
47. Kimos M.C., Wang S., Borkowski A., Yang G.Y., Yang C.S., Perry K., Olaru A., Deacu E., Sterian A., Cottrell J., Papadimitriou J., Sisodia L., Selaru F.M., Mori Y., Xu Y., Yin J., Abraham J.M., Meltzer S.J. Esophagin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) are biomarkers of human esophageal neoplastic progression. *Int. J. Cancer.* 2004; 111 (3): 415–417. DOI: 10.1002/ijc.20267.

Сведения об авторах

Петенёва Елена Сергеевна, врач-терапевт, пульмонолог, ФСНКЦ, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-1103-7848.

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-4012-6348.

Бердников Сергей Иванович, врач-эндоскопист, ФСНКЦ, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-9196-589X.

Салмин Владимир Валерьевич, д-р физ.-мат. наук, зав. кафедрой медицинской и биологической физики, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-4441-9025.

Абрамов Владислав Геннадьевич, врач-невролог, зав. отделом организации клинических исследований, разработки и внедрения инновационных неврологических технологий, ФСНКЦ, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-4902-589X.

Медведева Надежда Николаевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анатомии и гистологии человека, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-7757-6628.

Семичев Евгений Васильевич, д-р мед. наук, рук. научного отдела, врач-эндоскопист, ФСНКЦ, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-2386-5798.

(✉) **Петенёва Елена Сергеевна**, e-mail: lenchik-dok@mail.ru.

Поступила в редакцию 25.10.2019

Подписана в печать 30.04.2020

УДК 616.858-039:616.851-056.7]-055.2:575.113.2
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-235-240>

Атипичное течение болезни Паркинсона с клиническими проявлениями болезни Гентингтона у пациентки с аллелем 27 CAG-повторов в гене HTT

Никитина М.А.¹, Брагина Е.Ю.², Гомбоева Д.Е.², Назаренко М.С.^{1,2}, Жукова Н.Г.¹,
 Нуржанова К.Ф.¹, Центр Н.В.¹, Алифирова В.М.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
 Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
 Россия, 634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

РЕЗЮМЕ

Болезнь Гентингтона (БГ) – аутосомно-доминантное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, молекулярной причиной которого является динамическая мутация, связанная с экспансией тринуклеотидных CAG (цитозин-аденин-гуанин) повторов в гене гентингтина (HTT). Аллели с 36–39 CAG-повторами приводят к неполной пенетрантности и более позднему началу заболевания, тогда как клинические симптомы заболевания обязательно развиваются при количестве повторов 40 и более. В последнее время появляется все больше доказательств о связи CAG-повторов в диапазоне от 27 до 35 (промежуточные аллели) с отдельными клиническими проявлениями, характерными для БГ.

Нами описан клинический случай пациентки с фенотипом болезни Паркинсона (БП), отягощенный семейным анамнезом по данной патологии и промежуточным аллелем с 27 CAG-повторами. Особенностью было раннее развитие в дебюте болезни таких немоторных проявлений, как когнитивные и психотические расстройства; ранняя дистония в кисти и камптокормия, а также слабый ответ на леводопу. Предполагается, что промежуточный аллель гена HTT модифицирует клинический фенотип БП у этой пациентки.

Ключевые слова: паркинсонизм, болезнь Паркинсона, двигательные расстройства, болезнь Гентингтона, экспансия CAG-повторов, HTT, нейродегенеративные заболевания, генетика.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Совета по грантам президента Российской Федерации (грант «Клинико-эпидемиологические особенности нейродегенеративных заболеваний Томской области» № МК-813.2019.7).

Для цитирования: Никитина М.А., Брагина Е.Ю., Гомбоева Д.Е., Назаренко М.С., Жукова Н.Г., Нуржанова К.Ф., Центр Н.В., Алифирова В.М. Атипичное течение болезни Паркинсона с клиническими проявлениями болезни Гентингтона у пациентки с аллелем 27 CAG-повторов в гене HTT. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 235–240. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-235-240>.

✉ Никитина Мария Анатольевна, e-mail: nikitina_ma@mail.ru.

Atypical course of Parkinson's disease with clinical manifestations of Huntington's disease in a patient with an allele of 27 CAG repeats in the *HTT* gene

Nikitina M.A.¹, Bragina E.Yu.², Nazarenko M.S.^{1,2}, Zhukova N.G.¹, Gomboeva D.E.², Nurzhanova K.F.¹, Tsentri N.V.¹, Alifirova V.M.¹

¹ Siberian State Medical University
2, Moscow trakt, 634050, Tomsk, Russian Federation

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
10, Nab. Ushaiki Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant progressive neurodegenerative disease. Its molecular cause is a cytosine-adenine-guanine (CAG) trinucleotide repeat dynamic expansion in the huntingtin (*HTT*) gene. Alleles with 36–39 CAG-repeats are incompletely penetrant, as individuals might develop symptoms but typically with a later age of onset. When repeats are equal or greater than 40, the symptoms of the disease occur. It is considered that CAG-repeats in the “intermediate” alleles (27–35 repeats) also cause the symptoms of the HD.

We present here the case of a patient who has clinical phenotype and family history of Parkinson's disease (PD), but 27 CAG-repeats. The feature of this patient is early development of non-motor manifestations such as cognitive impairment, psychotic disorders, early dystonia in a hand, camptocormia and poor response to levodopa. It is believed that the intermediate allele of *HTT* gene might modify the clinical phenotype of PD in this patient.

Key words: parkinsonism, Parkinson's disease, motor disorders, Huntington's disease, differential diagnosis, expansion of CAG-repeats, *HTT*, neurodegenerative diseases; genetics.

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

Source of financing. The study was performed with the support of Council for Grants of the President of the Russian Federation (“Clinical and epidemiological features of neurodegenerative diseases of the Tomsk Region”, grant No. MK-813.2019.7).

For citation: Nikitina M.A., Bragina E.Yu., Nazarenko M.S., Zhukova N.G., Gomboeva D.E., Nurzhanova K.F., Tsentri N.V., Alifirova V.M. Atypical course of Parkinson's disease with clinical manifestations of Huntington's disease in a patient with an allele of 27 CAG repeats in the *HTT* gene. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 235–240. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-235-240>.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Гентингтона (БГ) — аутосомно-доминантное заболевание, развивающееся вследствие мутации, связанной с патологическим увеличением числа CAG-повторов в первом экзоне гена гентингтина (*HTT*), картированного в локусе 4p16.3. На основе мутантного гена *HTT* синтезируется одноименный крупный белок, имеющий в своем составе удлиненную цепочку из глутаминовых остатков, в результате чего происходит формирование патологических связей между мутантным гентингтином и другими белками, способствующих цитотоксичности и селективной гибели нейронов полосатого тела, характерной для заболевания [1, 2]. БГ является наи-

более распространенным моногенным нейродегенеративным расстройством в популяциях европейского происхождения [1].

Число копий CAG-повторов у здоровых индивидов варьирует от 10 до 35, а наличие, по меньшей мере, одного аллеля с числом 36 CAG-повторов в гене *HTT* приводит к развитию БГ. Носители аллелей в пределах 36–39 CAG-повторов характеризуются неполной пенетрантностью заболевания, а экспансия 40 и более числа CAG-повторов приводит к развитию полной клинической картины БГ. Выраженность симптоматики и ранний дебют заболевания пропорционально коррелируют с увеличением числа CAG-повторов [3].

Носительство так называемых промежуточных аллелей (intermediate alleles, IAs), ранжированных в пределах 27–35 CAG-повторов, характерно для фенотипически здоровых индивидов. Однако в последнее время появляются работы, отмечающие в некоторых случаях корреляцию промежуточных аллелей с едва заметным (субклиническим), а иногда явным фенотипическим проявлением БГ [3, 4]. Типичное двигательное расстройство при БГ характеризуется как гипер-, так и гипокинезией, причем гиперкинезия более выражена на ранних стадиях заболевания. Тем не менее при первичной акинетико-ригидной форме БГ (вариант Вестфаля), манифестирующей, чаще всего, в первые два десятилетия жизни и характеризующейся неблагоприятным исходом, гипокинезия преобладает с самого начала [5].

Аллели с 36–39 CAG-повторами, которые связаны с неполной пенетрантностью БГ, встречаются с достаточно высокой частотой среди населения в целом. Так, согласно исследованию С. Кау и соавт., среди 7 315 индивидов европейского происхождения из США, Шотландии и Канады на каждые 400 человек приходится один носитель мутации БГ (это соответствует распространенности 250 на 100 тыс. населения) [6, 7]. Чаще всего в исследуемых когортах встречались индивиды с числом CAG-повторов 36–37 (36 – 0,096%; 37 – 0,082%; 38 – 0,027%; 39 – 0,000%; ≥ 40 – 0,041%). Полученные данные говорят о недооценке истинной распространенности БГ [8]. К сожалению, аналогичные оценки распространенности носительства экспансии CAG-повторов у жителей разных регионов России ограничены, что обуславливает необходимость проведения Всероссийского эпидемиологического исследования.

Относительно промежуточных аллелей гена *HTT* установлено, что один носитель IAs (27–35 CAG-повторов) приходится на 16 обследованных лиц. Это особо актуально, так как именно носители IAs являются источником возникновения мутации БГ *de novo* (спорадических случаев заболевания) в последующих поколениях, что достигает 5–14% от общего числа пациентов с БГ [9]. Согласно данным эпидемиологического исследования, частота аллелей в промежуточном диапазоне у жителей России составляет 2,6% [10]. Достаточно высокая частота «промежуточных» аллелей регистрируется и среди больных с другими неврологическими заболеваниями: до 3,5% у пациентов с болезнью Паркинсона, достигая максимальной частоты 6,0% у пациентов с болезнью Альцгеймера [11, 12].

В данной статье представлен клинический случай пациентки с фенотипом, в значительной степени совместимым с акинетико-ригидной формой болезни

Паркинсона, но с особенностями, позволяющими предположить, что промежуточные аллели гена *HTT* (27 CAG-повторов) модифицировали классический фенотип БП.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациентка К. в возрасте 54 лет отметила появившуюся общую слабость, быструю утомляемость, замедленность движений, что связывала с перенесенным стрессом, поэтому за медицинской помощью не обращалась. В течение следующих 2 лет (к 56 годам) присоединилась плохая управляемость левой рукой, мешающая при движении и выполнении каких-либо целенаправленных действий, непроизвольным сгибанием пальцев. Также наблюдался тремор головы и век, усилилась гипокинезия при всех видах деятельности, наблюдались ухудшение почерка, усиление запоров (констипация), возросло нарушение обоняния вплоть до аносмии, беспокоил постоянно сниженный фон настроения.

При осмотре присутствовали гипокинезия и гипомимия, а также обращал на себя внимание легкий наклон туловища вперед (камптокормия) и немного вправо (симптом Пизанской башни), походка мелкими, шаркающими шажками, нарушение контроля баланса (редкие падения до 1 раза в 3–6 мес) и неуклюжесть в тонкой моторике. Симптомы заболевания преобладали с левой стороны тела и в левых конечностях.

Пациентке было проведено обследование. Магнитно-резонансная томография головного мозга: признаки микроангиопатии с расширением базальных цистерн, умеренная атрофия коры лобных и теменных долей, риносинусит. Электроэнцефалография (ЭЭГ): из-за высокой двигательной активности на ЭЭГ идет наложение миограммы. На гипервентиляцию зарегистрированы отдельные элементы эпилептиформной активности в виде острых потенциалов, комплексов «острая – медленная волна» в левой центрально-височной области; признаки ирритации подкорковых и стволовых структур головного мозга. Уровень в крови следующих показателей: антитела к рецептору тиреотропного гормона 2,3 мкМЕ/л; свободный тироксин Т4 12,7 нМоль/л; антитела к тиреопероксидазе 3,3 МЕ/мл (лабораторные анализы). Определение антигена вируса гепатита В и вируса С в крови: отрицательно. При проведении общего и биохимического анализа крови патологии не выявлено. Ультразвуковое исследование щитовидной железы и паращитовидных желез: диффузные изменения щитовидной железы. Дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий с цветным доплеровским картированием кровотока:

признаки атеросклероза сонных артерий без значимого стенозирования; извитость сонных артерий с обеих сторон с компрессией яремных вен; признаки экстравазального динамического воздействия на позвоночные артерии. Комплексное ультразвуковое исследование органов брюшной полости: умеренные диффузные изменения печени; признаки хронического холецистита. Рентгенография кистей: деформирующий остеопороз 1-й степени. Консультация офтальмолога: гипертензивный ангиосклероз; начальная катаракта обоих глаз; деструкция стекловидного тела обоих глаз. Консультация терапевта: гипертоническая болезнь, 2-я стадия; хроническая сердечная недостаточность, 0 стадия, риск 2; гипертоническая болезнь с преимущественным поражением сердца без застойной сердечной недостаточности. Осмотр врача-хирурга: констипация; сколиоз грудного, поясничного отдела позвоночника.

На основании проведенного осмотра и объективного исследования был установлен диагноз болезни Паркинсона (БП), так как симптомы соответствовали основным диагностическим критериям заболевания: наличие выраженной гипомимии, гипокинезия, ригидность и чувство неловкости с преобладанием симптомов в левой половине тела и левых конечностях, а также нарушение походки по типу паркинсонической, наличие постуральной неустойчивости. У пациентки детей нет. Со слов больной, у брата мамы также была БП в возрасте около 65 лет. Однако история болезни родственника пациентки недоступна. Пациентке были назначены препараты агонистов дофаминовых рецепторов и амантадины (прамипексол 4,5 мг/сут, амантадин 150 мг/сут).

Через полгода (в 57 лет) на фоне принимаемой терапии женщина отметила значительное ухудшение в виде усилившегося насильственного наклона туловища вправо и вперед. Во время осмотра наблюдался легкий постуральный и кинетический тремор верхних конечностей без тремора покоя, невыраженный тремор головы и век. Наблюдалась ригидность с преобладанием в левых конечностях. Брадикинезия была умеренно выраженной, но очевидной, сохранялась шаркающая походка. Постуральные рефлексы были нарушены (появились падения), однако сохранялась возможность ходить без посторонней помощи. Согласно валидизированным клиническим инструментам: по Унифицированной рейтинговой шкале оценки двигательных проявлений болезни Паркинсона MDS-UPDRS III – 39 баллов, по Унифицированной рейтинговой шкале оценки двигательных проявлений болезни Гентингтона UHDRS III – 24 балла.

В связи с ухудшением состояния (усилились скованность и гипокинезия) к схеме противопаркинсо-

нической терапии был добавлен препарат леводопа (карбидопа, энтакапон) в дозе 300 мг/сут, рекомендована лечебная физкультура. Такой фармакологический подход дал незначительное улучшение состояния: уменьшились ригидность, камптокормия и улучшилась походка. После инъекций ботулинического токсина типа А с целью коррекции камптокормии не последовало клинически значимого положительного результата.

Несмотря на наличие основных симптомов, соответствующих БП (брадикинезия, ригидность и постуральная неустойчивость), через 4 года после появления первых двигательных симптомов пациентка имела ряд несоответствующих классической картине БП немоторных проявлений. Среди них выраженные когнитивные нарушения (13 баллов по MoCA-тесту и 18 баллов по MMSE, что соответствует умеренно выраженной деменции), выраженные тревожно-депрессивные нарушения (согласно HADS, по субшкале «тревога» – 12 баллов, субшкале «депрессия» – 13). Наличие суицидальных мыслей, без суицидального поведения, согласно опроснику C-CSSR, галлюцинаций не было. Также обращает на себя внимание молодой возраст дебюта, считается, что средний возраст дебюта БП составляет 65 лет, и только в 10–15% случаев заболевание дебютирует раньше [13]. Среди моторных нарушений не вписываются в клиническую картину болезни такие двигательные симптомы, как развившаяся в течение 3 лет с дебюта заболевания камптокормия, имеющийся тремор головы, наличие непроизвольных стибательных движений в пальцах левой руки до начала противопаркинсонической терапии.

С целью дифференциального диагноза БП с другими двигательными расстройствами, проявляющимися паркинсонизмом, был проведен ряд неврологических тестов. Отмечалось небольшое замедление инициирования и гипометрия саккад, но движения глаз были в полном объеме в отличие от прогрессирующего надъядерного паралича, при котором также наблюдается постуральная неустойчивость. Пациентка могла удерживать высунутым язык в течение 10 с без приложения особых усилий (в отличие от болезни Вильсона – Коновалова). Отмечались только легкие вегетативные симптомы (диффузный гипергидроз, гиперсаливация, умеренно выраженная сухость во рту, запоры в отличие от мультисистемной атрофии). Для дифференциальной диагностики между БГ и БП был протестирован глабеллярный рефлекс Вартенберга, проявляющийся выраженным смыканием век при ударе молоточком по глабелле (переносице) и считающийся облигатным признаком

БП. Глабеллярный рефлекс у пациентки показал быстрое привыкание и отсутствие выраженного смыкания век при ударе по надпереносью.

Из-за отсутствия драматического ответа на препараты леводопы, хотя очень высокие дозы не испытывались, и наличия клинических проявлений, нехарактерных для пациентов с БП, а более характерных для проявлений БГ, выполнен молекулярно-генетический анализ гена *HTT*. В результате его выполнения у пациентки идентифицированы аллели, связанные с 27-м и 20-м CAG-повторами. Молекулярно-генетическое исследование числа CAG-повторов гена *HTT* проводили с помощью полимеразной цепной реакции с флуоресцентно-мечеными праймерами согласно протоколу M. Bastepe, W. Xin [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фенотип пациентки К. в основном соответствовал болезни Паркинсона. Согласно клиническим диагностическим критериям Международного общества болезни Паркинсона и других двигательных расстройств (The International Parkinson and Movement Disorder Society для БП), были выявлены гипокинезия, асимметричная мышечная ригидность и постуральная неустойчивость, три из основных характеристик БП. Однако был обнаружен в ходе обследования один из критериев исключения (красный флажок) – рано развившаяся деменция с нарушениями памяти и речи. При клиническом исследовании симптомы заболевания более полно оценивались с помощью шкалы UPDRS, чем по шкале UHDRS. Также клиническая картина соответствовала поддерживающим критериям, и поэтому был верифицирован диагноз клинически установленной БП.

Принимая во внимание тот факт, что промежуточные аллели гена *HTT* оказывают заметное влияние на ухудшение моторных и когнитивных функций [1], представляется вероятным, что наличие IAs в генотипе этой пациентки модифицирует классический фенотип. В соответствии с этим результаты глабеллярного рефлекса пациентки показали быстрое привыкание, как и у пациентов с БГ, тогда как при БП привыкания не наблюдается [2, 4]. Более того, несмотря на то что клинический фенотип пациентки в основном соответствовал БП, отмечена ранняя дистония, когда еще пациентка не получала дофаминергические противопаркинсонические препараты.

Таким образом, принимая во внимание раннюю дистонию, плохую реакцию моторных симптомов на леводопу и результаты нейропсихологического тестирования, свидетельствующие о наличии присутствующих БГ признаков, а также клинические критерии, можно сделать вывод, что носительство IAs гена

HTT модифицирует фенотип БП у данной пациентки. В мировой практике описано несколько подобных случаев, что, безусловно, вызывает интерес с точки зрения необходимости медико-генетического консультирования как для дифференциальной диагностики заболевания, так и оценки риска у членов семьи пациента. Однако на данном этапе важно накопление данных об особенностях клинических проявлений носителей промежуточных аллелей гена гентингтина для более полной характеристики субфенотипов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cubo E., Ramos-Arroyo M.A., Martinez-Horta S., Martínez-Descalls A., Calvo S., Gil-Polo C. Clinical manifestations of intermediate allele carriers in Huntington disease. *Neurology*. 2016; 87 (6): 571–578. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002944.
2. Иллариошкин С.Н., Ключников С.А., Селивёрстов Ю.А. Болезнь Гентингтона. М.: Атмосфера, 2018: 472. DOI: 10.12731/978-5-902123-69-9.
3. Apolinário T.A., Paiva C.L., Agostinho L.A. Intermediate alleles of Huntington's disease *HTT* gene in different populations worldwide: A Systematic Review. *Genet. Mol. Res.* 2017; 16 (2). DOI: 10.4238/gmr16029648.
4. Savitt, D., Jankovic J. Clinical phenotype in carriers of intermediate alleles in the huntingtin gene. *J. Neurol. Sci.* 2019; 402: 57–61. DOI: 10.1016/j.jns.2019.05.010.
5. Reuter I., Hu M.T., Andrews T.C., Brooks D.J., Clough C., Chaudhuri K.R. Late onset levodopa responsive Huntington's disease with minimal chorea masquerading as Parkinson plus syndrome. *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry*. 2000; 68 (2): 238–241. DOI: 10.1136/jnnp.68.2.238.
6. Ha A.D., Jankovic J. Exploring the correlates of intermediate CAG repeats in Huntington disease. *Postgrad. Med.* 2011; 123 (5): 116–121. DOI: 10.3810/pgm.2011.09.2466.
7. Kay C., Collins J.A., Miedzybrodzka Z. et al. Huntington disease reduced penetrance alleles occur at high frequency in the general population. *Neurology*. 2016; 87 (3): 282–288. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002858.
8. Kay C., Collins J.A., Wright G.E., Baine F., Miedzybrodzka Z., Aminkeng F., Semaka A.J., McDonald C., Davidson M., Madsen S.J. The molecular epidemiology of Huntington disease is related to intermediate allele frequency and haplotype in the general population. *Am. J. Med. Genet. Part B. Neuropsychiatr Genet.* 2018; 177 (3): 346–357. DOI: 10.1002/ajmg.b.32618.
9. Semaka A., Collins J.A., Hayden M.R. Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27–35 CAG repeats (intermediate alleles). *Am. J. Med. Genet. Part B. Neuropsychiatr Genet.* 2010; 153B (1): 314–320. DOI: 10.1002/ajmg.b.30970.
10. Селивёрстов Ю.А., Драницына М.А., Кравченко С.А., Ключников М.А., Иллариошкин С.Н. Эпидемиология болезни Гентингтона в Российской Федерации. В кн.: Болезнь Паркинсона и расстройства движений: руководство для врачей по материалам IV Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений; под ред.

- С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. М.: Лакшери-Принт, 2017: 244–246.
11. Menéndez-González M., Clarimón J., Allende I.R., Blázquez M., Martín E.S., Fernández C.G., Lleó A., Dols-Icardo O., Illán-Gala I., Morís G. et al. *HTT* gene intermediate alleles in neurodegeneration: Evidence for association with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2019; 76: 215.e9–215.e14. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.11.014.
12. Ha A.D., Jankovic J. Exploring the Correlates of Intermediate CAG Repeats in Huntington Disease. *Postgraduate Medicine*. 2011; 123 (5): 116–121. DOI: 10.3810/pgm.2011.09.2466.
13. Левин О.С., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона; 5-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2016: 384.
14. Bastepe M., Xin W. Huntington disease: molecular diagnostics approach. *Current protocols in human genetics*. 2015; 87: 9.26.1–9.26.23. DOI: 10.1002/0471142905.hg0926s87.

Сведения об авторах

Никитина Мария Анатольевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-2614-207X.

Брагина Елена Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1103-3073.

Назаренко Мария Сергеевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0673-4094.

Жукова Наталья Григорьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-6547-6622.

Гомбоева Дэнсэма Евгеньевна, аспирант, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7882-2093.

Нуржанова Ксения Фаридовна, студентка 5-го курса, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-4222-9765.

Центр Никита Вячеславович, студент 5-го курса, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7344-1726.

Алифинова Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-4140-3223.

(✉) **Никитина Мария Анатольевна**, e-mail: nikitina_ma@mail.ru.

Поступила в редакцию 14.03.2020

Подписана в печать 29.09.2020

Случай метастазирования рака мочевого пузыря в миокард

Шатов Д.В., Григорьев П.Е., Шаланин В.В.

*Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского
Россия, 295007, Республика Крым, г. Симферополь, пр. Вернадского, 4*

РЕЗЮМЕ

Представленный клинический случай метастатического поражения сердца у пациента проявился клиникой острого инфаркта миокарда при уротелиальной карциноме мочевого пузыря. Пациент 69 лет поступил с клиникой острого инфаркта миокарда из неврологического отделения, где находился по поводу объемного образования правого полушария головного мозга, манифестировавшего судорожным эпизодом с развитием левостороннего спастического гемипареза.

После проведения коронарографии было выполнено чрескожное коронарное вмешательство по поводу поражений передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии. Несмотря на проведенный комплекс лечебных мероприятий, пациент скончался. При патологоанатомическом исследовании обнаружена уротелиальная карцинома мочевого пузыря с отдаленными метастазами в головной мозг и миокард. Клинический случай демонстрирует ситуацию прижизненной диагностики метастатических поражений миокарда, которая требует определения лечебного подхода у описанной категории пациентов.

Ключевые слова: уротелиальный рак мочевого пузыря, метастазы, метастазирование в сердце, метастазирование в головной мозг, инфаркт миокарда, поражение сердца.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Шатов Д.В., Григорьев П.Е., Шаланин В.В. Случай метастазирования рака мочевого пузыря в миокард. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 241–246. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-241-246>.

A case of myocardial metastasis of bladder cancer

Shatov D.V., Grigoriev P.E., Shalanin V.V.

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University
4, Vernadsky Av., Simferopol, 295007, Russian Federation*

ABSTRACT

The case of metastatic heart damage manifesting by a clinical picture of acute myocardial infarction in a patient with urothelial carcinoma of the urinary bladder is described. A 69-year old patient was admitted with the symptoms of acute myocardial infarction from the neurological department, where he was hospitalized due to a space-occupying lesion of the right hemisphere of the brain, which manifested in a convulsive episode with the development of left-sided spastic hemiparesis. After coronary angiography, percutaneous coronary intervention was performed for the lesions of the anterior interventricular branch of the left coronary artery. Despite the complex of the therapeutic

measures, the patient died. A pathological study revealed urothelial carcinoma of the bladder with distant metastases to the brain and myocardium. This clinical case demonstrates the situation of intravital diagnosis of metastatic myocardial lesions, which requires a determination of the treatment approach in the described category of patients.

Key words: urothelial carcinoma of the bladder, metastases, metastatic heart damage, metastatic brain damage, myocardial infarction, heart lesion.

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

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

For citation: Shatov D.V., Grigoriev P.E., Shalanin V.V. A case of myocardial metastasis of bladder cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 241–246. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-241-246>.

ВВЕДЕНИЕ

Метастазирование уротелиального рака мочевого пузыря (УРМП) в сердце относится к редким и опасным случаям в клинической практике. К настоящему времени обнаружено лишь пять описаний метастазирования в сердце УРМП [1–5], и еще девять случаев в работе N. Ueda и соавт. [6], где приводится таблица опубликованных на тот момент описаний метастазирования урогенитального рака (УР) в сердце, при этом девять из них имели локализацию первичной опухоли в мочевом пузыре (МП). Клинические проявления состояли в нарушении проводимости, прогрессировании сердечной недостаточности за счет обструкции выходного тракта правого желудочка, выпотного перикардита с явлениями тампонады перикарда, эмболии в легочную артерию.

В большинстве описанных случаев пациенты проживали за редким исключением не более 1 мес с момента верификации, получая медикаментозное лечение, хотя в ряде случаев выполнялись перикардиоцентез, циторедуктивная операция, имплантация искусственного водителя ритма. Описанные в литературе случаи имели, как правило, и другие отдаленные метастазы, однако среди них не было пациентов с метастазом в головной мозг, что определяет актуальность и значимость такого рода описания клинического случая.

Цель работы – описать клинический случай метастазирования рака мочевого пузыря в миокард с учетом манифестации заболевания с неврологической симптоматикой, которая ранее не описывалась.

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР

Пациент 69 лет был госпитализирован в кардиологическое отделение с палатами реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ Республики Крым «Республиканская клиническая больница имени Н.А. Семашко» с жалобами на интенсивные жгучие,

пекущие боли за грудиной, остро возникшие около 3 ч назад, одышку, общую слабость, потливость.

До этого находился на стационарном лечении в другом лечебном учреждении с диагнозом «объемное образование правого полушария головного мозга, судорожный эпизод, левосторонний спастический гемипарез». При компьютерной томографии: справа экстрааксиально определяется объемное образование, широкой частью прилежащее к теменной кости, размерами 4,5 × 3,0 × 7,0 см, плотностью 40 × 45 едН, накапливающее контрастное вещество до 80 едН, масс-эффект с деформацией правого желудочка и окружающих структур, перифокально отмечается снижение плотности вещества мозга до 18 едН (рис. 1).

В течение последних 3 сут беспокоили кратковременные эпизоды загрудинной боли, купировавшиеся самостоятельно. В день поступления возник затяжной болевой приступ с развитием элевации сегмента ST в I, II, III, aVL, V₂–V₆. Учитывая противопоказания к проведению тромболитической терапии, направлен в кардиологическое отделение для проведения экстренной коронарографии и определения дальнейшей тактики лечения.

При поступлении в отделение общее состояние расценено как тяжелое. Сознание ясное. Кожный покров бледно-розовый, сухой, теплый. Голени пастозны. Верхушечный толчок – в 5-м межреберье. Границы относительной сердечной тупости расширены влево до среднеключичной линии. Тоны сердца глухие, ритмичные. Артериальное давление 90/60 мм рт. ст., частота сердечных сокращений (ЧСС) 90 в минуту, частота дыхательных движений 18 в минуту. Дыхание при аускультации жесткое, ослаблено в нижних отделах справа, там же выслушивается крепитация. Живот болезненный в нижних отделах. Симптомов раздражения брюшины нет. Нижний край печени у края реберной дуги, безболезненный. При электрокардиографии: элевация сегмента ST в I, II, III, aVL, V₂–V₆ (рис. 2).

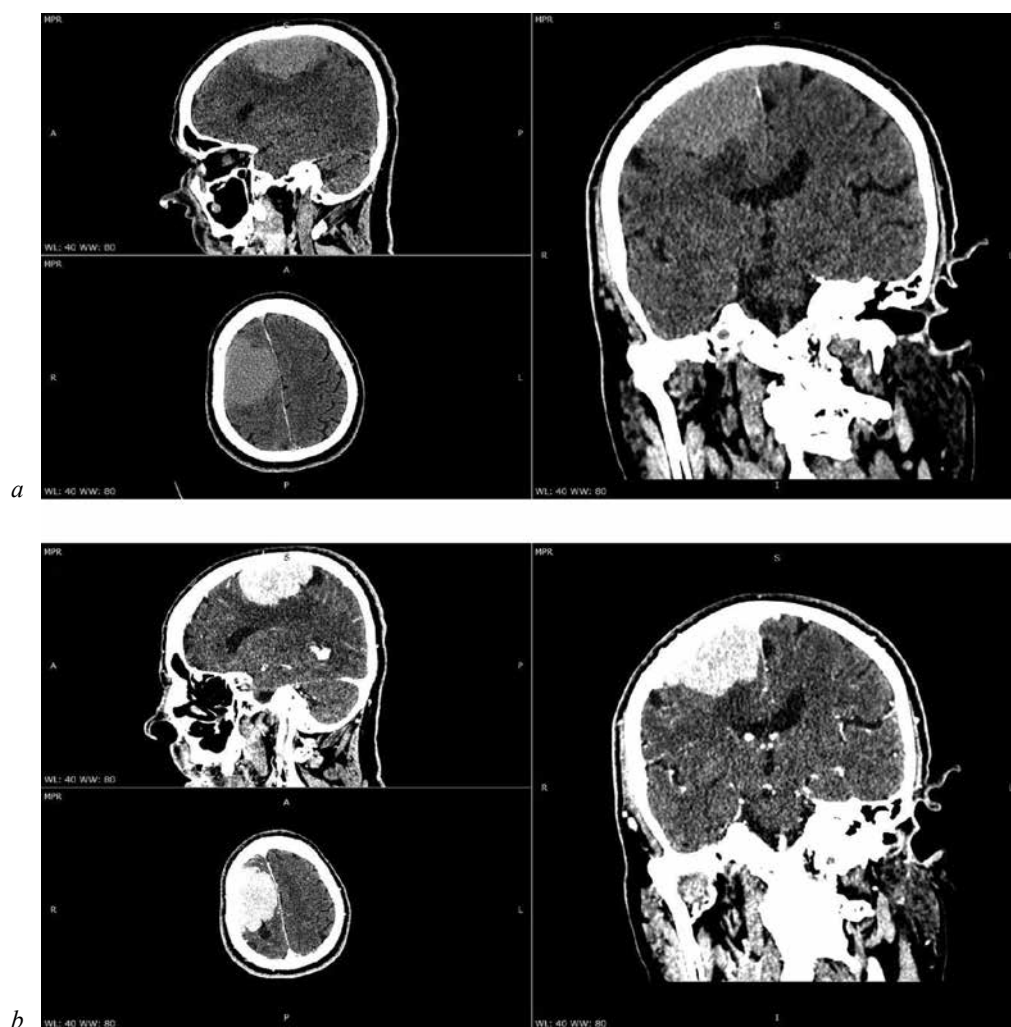


Рис. 1. Компьютерная томография больного: *a* – без контрастирования, *b* – с контрастированием

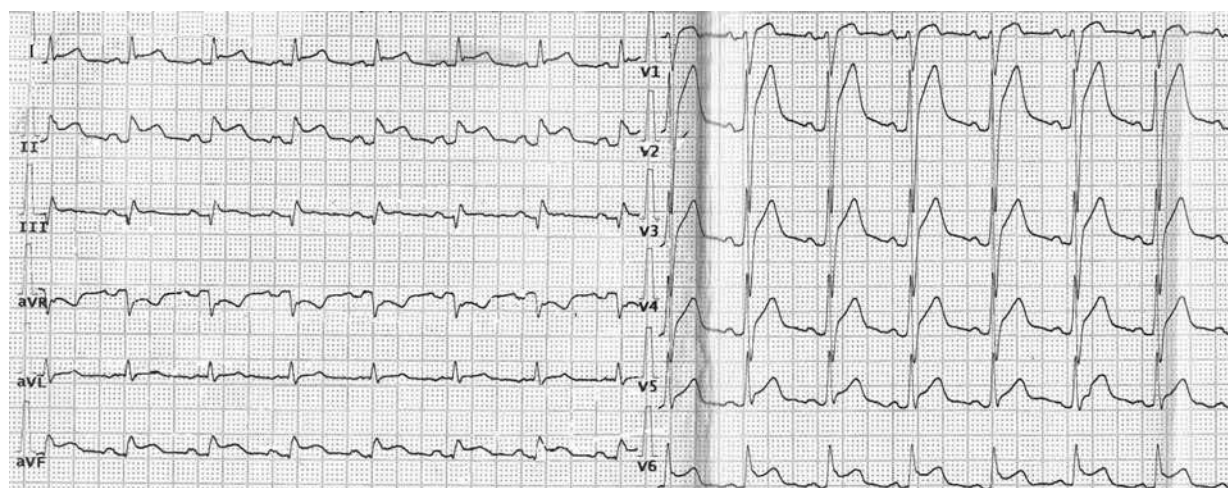


Рис. 2. Электрокардиограмма больного при поступлении: скорость 25 мм/с, вольтаж 10 мм

Выставлен диагноз «ишемическая болезнь сердца: циркулярный инфаркт миокарда с элевацией сегмента ST. Атеросклероз коронарных артерий. Killip II».

Общий анализ крови: гемоконцентрация (гемоглобин 169 г/л, гематокрит 47%), лейкоцитоз до $22,4 \times 10^9/\text{л}$ за счет нейтрофилов (метамиелоциты 3%, палочкоядерные 42%, сегментоядерные 39%,

токсигенная зернистость нейтрофилов 50%). В биохимическом анализе крови: мочевины 17,7 мкмоль/л, креатинин 126 мкмоль/л, общий белок 49 г/л, альбумин 28,9 г/л, калий 3,97 ммоль/л, натрий 124,7 ммоль/л, холестерин 2,71 ммоль/л, триглицериды 2,27 ммоль/л, липопротеиды высокой плотности 0,62 ммоль/л, липопротеиды низкой плотности 1,42 ммоль/л, лактатдегидрогеназа 866 ед/л, креатинкиназа 727 ед/л. Коагулограмма: протромбиновый индекс 69,8%, международное нормализованное отношение 1,44, фибриноген А 4,53 г/л, активированное частичное тромбопластиновое время 31,7 с, тромбиновое время 20,1 с.

Через 30 мин после госпитализации выполнена экстренная коронарография: атеросклероз коронарных артерий, правый тип коронарного кровообращения. Стеноз устья передней межжелудочковой ветви (ПМЖВ) около 50%, стенозы проксимальной трети ПМЖВ более 70% с ангиографическими признаками нестабильности, интрамуральный ход дистальной трети ПМЖВ в систолу более 50%,

стенозы проксимальной и средней трети правой коронарной артерии около 40%. По результатам коронарографии проведены преддилатация, стентирование и постдилатация стеноза проксимальной трети ПМЖВ с хорошим ангиографическим результатом. ЭКГ после вмешательства представлена на рис. 3.

В послеоперационном периоде выполнена обзорная рентгенография органов грудной клетки и эхокардиография: диаметр аорты в восходящем отделе 4,6 см, у корня 3,5 см, открытие створок аортального клапана 1,8 см, камеры не расширены, гипертрофия стенок левого желудочка (задняя стенка 1,3 см, межжелудочковая перегородка 1,4 см), фракция выброса 54%, переднезаднее укорочение 22%, ударный объем 29 мл, митральная и трикуспидальная недостаточность 1-й степени. Нарушений сегментарной сократимости достоверно не выявлено из-за тахикардии (ЧСС 140 в минуту). Сепарация листков перикарда по контуру левого желудочка 12 мм, по контуру правого желудочка 14 мм.

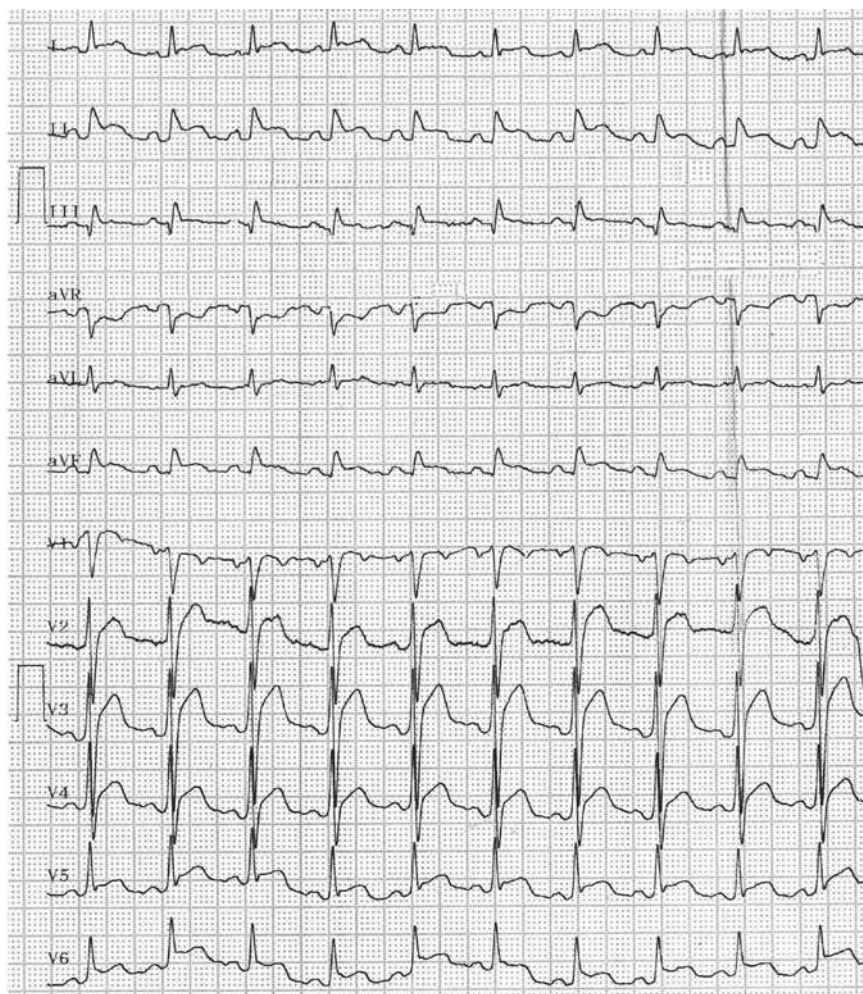


Рис. 3. Электрокардиограмма больного после преддилатации, стентирования и постдилатации стеноза проксимальной трети ПМЖВ: скорость 25 мм/с, вольтаж 10 мм

В послеоперационном периоде явления сердечной недостаточности продолжали прогрессировать, несмотря на проводимую терапию. Через 12 ч после выполнения вмешательства пациент скончался.

При проведении аутопсии обнаружен УР G2 МП ($T_3N_3M_1$) с метастазами в головной мозг, сердце, печень, почки, легкие, парааортальные лимфатические узлы, лимфатические узлы малого таза, канцероматоз перикарда, осложненный фибринозно-гнойным перикардитом. Головной мозг: отек мягких мозговых оболочек, выраженная дистрофия глиальных клеток, поля рарификации, выраженный периваскулярный, перичеллюлярный отек, многочисленные метастазы как в сосуды мягкой мозговой оболочки, так и в ткань мозга, полнокровие сосудов (рис. 4).

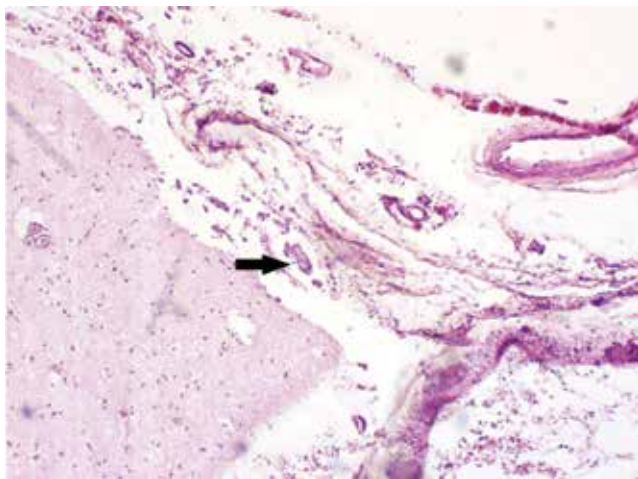


Рис. 4. Метастазирование уротелиального рака мочевого пузыря в головной мозг (стрелка): окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Сердце: эпикард утолщен отечный, с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, наложениями фибрина, периваскулярные метастазы; мышечные волокна умеренно гипертрофированы, имеют извитой ход; дистрофия миокардиоцитов, очаговая фрагментация мышечных волокон; в паренхиме обширные участки метастатического роста; вокруг них отек стромы кардиомиоцитов, явления кариолизиса, кариопикноза; оксифилия цитоплазмы, очаговые набухание и глыбчатый распад мышечных волокон; рыхлая лейкоцитарная межмышечная инфильтрация, спазм части артериол с переориентировкой эндотелия, очаговая резкая гиперемия, особенно в субэндокардиальных сосудах; явления мелкоочагового периваскулярного межмышечного склероза; стенки сосудов сердца неравномерно утолщены, разволокнены, склерозированы, сосуды полнокровны (рис. 5, 6). МП: инфильтрирующий рост УР G2 с прорастанием всех слоев стенки.

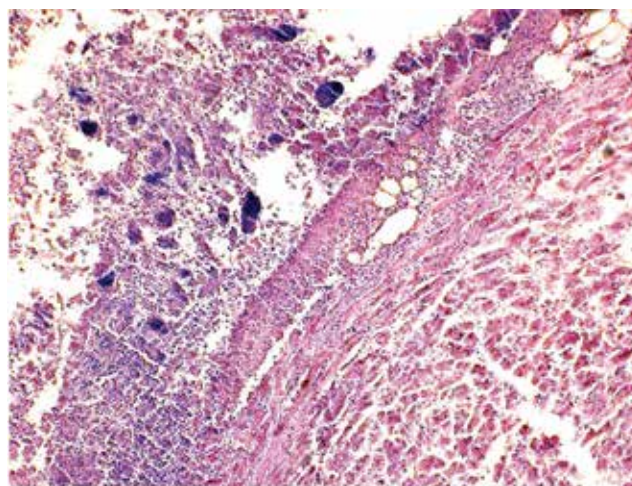


Рис. 5. Фрагмент эпикарда и миокарда больного: окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

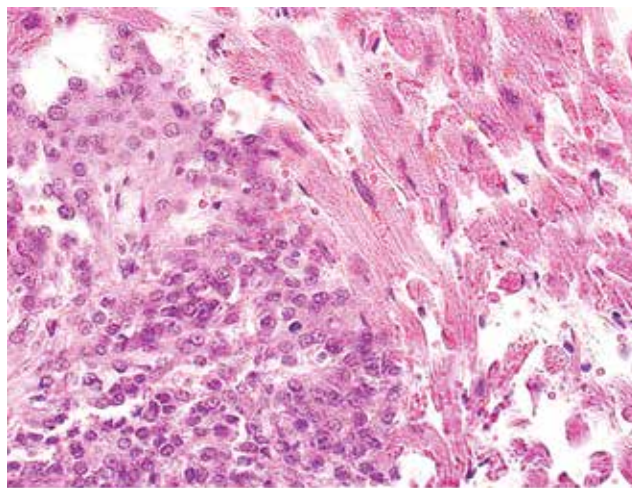


Рис. 6. Метастазирование уротелиального рака мочевого пузыря (слева) в миокард (справа): окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенный клинический случай уникален манифестацией УРМП судорожным припадком, очаговой правополушарной симптоматикой. На фоне прогрессирования заболевания в виде развития выраженной белково-энергетической недостаточности, лейкомоидной реакции у пациента появилась клиника острого циркулярного инфаркта миокарда с элевацией сегмента ST, потребовавшего проведения оперативного вмешательства. Среди обнаруженных случаев в одном случае на фоне зафиксированного метастазирования в миокард была выполнена имплантация двухкамерного стимулятора для ресинхронизирующей терапии, а через 17 мес от манифестации метастазирования на фоне появившихся болей ишемического генеза в процессе

рассмотрения вопроса о паллиативном стентировании ветви, вовлеченной в метастаз, пациент скончался [1].

Приведенный клинический случай поднимает вопрос о рамках инвазивной помощи больным с отдаленными метастазами в сердце, который требует индивидуального подхода, чтобы не подвергать пациентов излишним страданиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arscott W.T., Lal P., Mamtani R., O'Quinn R., Deo R., Jones J. Long-term survival after treating cardiac metastasis with radiation and immune therapy: a case report. *Cureus*. 2018; 10 (5): e2607. DOI: 10.7759/cureus.2607.
2. Schreiner M., Schneider B., Pauls S. Cardiac metastasis of a recurrent urothelial carcinoma of the bladder. *Rofo*. 2015; 187 (12): 1124–1126. DOI: 10.1055/s-0041-104181. German.
3. Yamac A.H., Insanic D., Bockmeyer C. Cardiac metastasis from a urothelial cell carcinoma: a commented case report. *Cardiovasc. Pathol.* 2014; 23 (3): 178–180. DOI: 10.1016/j.carpath.2014.01.005.
4. Благова О.В., Алиева И.Н., Безруков Е.А., Ипполитов Л.И., Полунин Г.В., Коган Е.А., Седов В.П., Мершина Е.А., Сеницын В.Е., Саркисова Н.Д., Недоступ А.В., Фомин В.В. Декомпенсация гипертонического сердца у больного со злокачественной параганглиомой мочевого пузыря: этапы диагностики и лечения. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2018; 14 (3): 370–378. DOI: 10.20996/18196446-2018-14-3-370-378.
5. Кухарчик Г.А., Дикарев К.В., Минкин С.Р., Сорокин Л.А., Коваль И.Н. Редкий случай метастатического поражения сердца при раке мочевого пузыря. *Кардиология*. 2017; 57 (S1): 367–372. DOI: 10.18087/cardio.2394.
6. Ueda N., Kawamura M., Nakazawa S., Hirai T., Kishikawa H., Nishimura K., Morimoto K. Complete atrioventricular block due to cardiac metastasis from bladder cancer: case report. *Hinyokika Kyo*. 2014; 60 (10): 501–506.

Сведения об авторах

Шатов Дмитрий Викторович, канд. мед. наук, доцент, кафедра анестезиологии-реаниматологии и скорой медицинской помощи, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0003-2248-5400.

Григорьев Павел Евгеньевич, д-р биол. наук, доцент, профессор, кафедра физики конденсированных сред, физических методов и информационных технологий в медицине, Физико-технический институт, Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-7390-9109.

Шаланин Валерий Викторович, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-5380-2048.

(✉) **Шатов Дмитрий Викторович**, e-mail: dmitrii_shatov@mail.ru.

Поступила в редакцию 23.02.2020

Подписана в печать 29.09.2020



А

Абакумова Т.В.	4
Абаленихина Ю.В.	4
Абрамов В.Г.	4
Агаева Х.А.	3
Акимов М.Ю.	1
Акимова Е.В.	1
Акиншина Е.И.	4
Алексеева Е.А.	4
Алексеева Л.И.	3
Алексеева Н.П.	2
Алифинова В.М.	4
Андреев С.Л.	2
Аникина А.В.	1
Аношенкова О.Н.	3
Антонеева И.И.	4
Аракчаа К.Д.	4
Аргунова Ю.А.	2
Аржаник А.А.	3
Аржаник М.Б.	4
Ариэль Б.М.	2
Арямкина О.Л.	2
Асанов М.А.	2
Атаманов С.А.	3
Афанасьев С.А.	1
Афанасьева О.Г.	4

Б

Бабадаева Н.М.	3
Бабенко А.Ю.	3
Бабкина А.В.	3
Бабышкина Н.Н.	1
Баев А.Е.	4
Байкенова М.Б.	4
Байков А.Н.	2
Бандовкина В.А.	4
Барбараш Л.С.	2
Барбараш О.Л.	2
Бахтияров К.Р.	1
Бейлерли О.А.	1
Белик Е.В.	3
Белова А.Н.	2
Белокрылова М.Ф.	1
Беляев А.Ю.	3
Беляева С.Н.	1
Бердников С.И.	4

Березикова Е.Н.	4
Березовская К.В.	4
Беспалова И.Д.	1, 3
Бирулина Ю.Г.	1, 4
Богданова И.О.	2
Бодиенкова Г.М.	2
Бойков А.А.	2
Бохан Н.А.	1, 4
Бочкарев Ю.М.	4
Бощенко А.А.	2
Брагина Е.Ю.	4
Бразовский К.С.	2
Брюн Е.А.	4
Буданов П.В.	1
Буйко Е.Е.	2, 4
Букреева Е.Б.	3
Буланова А.А.	3
Быков В.В.	4

В

Ваизов В.Х.	4
Валь Н.С.	4
Васильев В.Н.	1, 4
Васильева О.А.	3
Васильева С.Н.	1
Васильцева О.Я.	4
Васильченко Д.В.	4
Ватазин А.В.	4
Ватутин Н.Т.	4
Вдовин В.М.	1
Венгеровский А.И.	2, 4
Верижникова Л.Н.	2
Виноградов С.А.	4
Виноградова А.Г.	2
Виноградова Д.С.	3
Винокурова М.К.	4
Винс М.В.	3
Винтер Д.А.	1
Виривская Е.В.	1
Воевода М.И.	2
Воловик М.Г.	2
Вторушин С.В.	4

Г

Галкин С.А.	4
Ганюкова Н.Г.	3

Гарасва Л.А.	4
Гарганеева Н.П.	1
Гареев Е.М.	1
Гареев И.Ф.	1
Генинг С.О.	4
Генинг Т.П.	4
Геренг Е.А.	3
Гетте И.Ф.	4
Гильмиярова Ф.Н.	3
Голубчиков П.Н.	4
Гомбоева Д.Е.	4
Гончарова А.А.	3
Гончарук М.С.	4
Горина Я.В.	4
Горошинская И.А.	2, 4
Горощенко С.А.	3
Гракова Е.В.	4
Гренадёр А.С.	3
Гречишникова А.Ю.	1
Григорьев Е.Г.	3
Григорьев И.В.	2
Григорьев П.Е.	1, 4
Григорьев С.Е.	3
Гришина Е.А.	4
Грищенко М.Ю.	3
Груздева О.В.	3
Гуляев В.М.	4
Гуражева А.А.	1, 4
Гурковская Е.П.	4
Гурьянов А.А.	3
Гусакова С.В.	1, 4
Гусякова О.А.	3

Д

Данилов Р.С.	1
Данилова И.Г.	4
Дацюк В.В.	4
Дёмин А.М.	4
Демьянов С.В.	2
Дзюман А.Н.	4
Дмитриева А.И.	3
Дмитриева Е.Г.	3
Добнер С.Ю.	4
Долгова Д.Р.	4
Долгушин И.И.	3
Дронова Т.А.	1
Дружинина О.А.	1
Дубаков А.В.	4
Дылева Ю.А.	3
Дьяков Д.А.	1
Дьякова М.Е.	2
Дягилева Ю.О.	3

Е

Евсюков А.А.	2
Евтушенко А.В.	2
Евтушенко В.В.	2
Егорова А.А.	4
Егунов О.А.	1
Емельянов В.В.	4
Епанчинцева Е.М.	1
Ефремова Е.Н.	4
Ещенко Е.В.	4

Ж

Жданов В.В.	4
Жигалева Н.И.	2
Жиров И.В.	1
Житарева И.В.	1
Жукова Н.Г.	1, 2, 4
Жульков М.О.	3
Журавлева О.А.	2

З

Завадовский К.В.	4
Завьялова М.В.	1, 4
Зайцева О.И.	4
Замбалова Е.А.	1
Заполоцкий Е.Н.	2
Застрожин М.С.	4
Захарьян Е.А.	1
Зима А.П.	2
Зонова Е.В.	3
Зуева Е.П.	4
Зулькарнаев А.Б.	4

И

Ибрагимова М.К.	3
Иванов А.Ю.	3
Иванов В.В.	2, 4
Иванова А.А.	4
Иванова В.В.	3
Иванова Н.Е.	3
Иванова С.А.	4
Игнатенко Г.А.	4
Изможерова Н.В.	4
Иноземцева А.А.	2

К

Кайгородова Е.В.	1
Кайдаш О.А.	2

Калинин Р.Е.	4
Калюжин В.В.	1, 3
Калюжин О.В.	3
Калюжина Е.В.	1, 3
Каплиева И.В.	2, 4
Кара-Сал Э.Э.	4
Карась С.И.	1, 4
Карнаушкина М.А.	1
Карпунина Т.И.	2
Карякин Н.Н.	2
Катанахова Л.Л.	1
Каштанова Е.В.	1
Квашин А.И.	3
Келеменова А.Н.	1
Киселев В.О.	1
Кисель Н.И.	4
Кит О.И.	4
Климов А.В.	3
Климов В.В.	3
Ковширина А.Е.	1
Ковширина Ю.В.	1
Колганов С.О.	4
Колобовникова Ю.В.	3
Колотьева Н.А.	3
Комарова И.С.	1
Комарова М.В.	3
Комина А.В.	1
Комлева Ю.К.	4
Кондратьева Д.С.	1
Кондрашов А.А.	3
Копоров С.Г.	4
Корнеев Д.С.	3
Корнеева Т.Б.	4
Корнетов А.Н.	3
Корнетова Е.Г.	3
Коробейников И.В.	3
Коротаева А.А.	1
Короткова Н.В.	3
Корсунская Л.Л.	3
Косова Е.В.	3
Котиева И.М.	4
Кочетков С.Б.	4
Кошель А.П.	3
Кошельская О.А.	2
Кравцова О.А.	4
Кравченко А.Ф.	4
Краснов В.П.	4
Краснова Н.М.	4
Красюкова В.О.	1
Крахмаль Н.В.	4
Кретов Е.И.	2
Кривошеков Е.В.	1
Кробинец И.И.	2

Кропотина Т.В.	3
Крылова С.Г.	4
Кубышкин А.В.	2, 3
Куделя Л.М.	3
Кузичкин Д.С.	3
Кузьменков А.Ю.	2
Кузьмичева В.И.	3
Кулагина Д.А.	4
Куланова А.А.	2
Куликова С.О.	4
Кульпин П.В.	4
Куприянов С.В.	3
Курчевенко С.И.	2
Кутихин А.Г.	2
Кучер А.Н.	2
Кучеренко А.С.	2

Л

Лаврентьев С.Н.	1
Ларина Н.В.	3
Лебедев Д.А.	3
Лебедев С.М.	4
Лебедева А.И.	1
Лебедева Д.В.	3
Лебедева Е.В.	1
Лейман О.П.	2
Леплина О.Ю.	4
Лесовая Н.С.	2
Лещенко О.Я.	3
Лившиц И.К.	1, 3
Литвяков Н.В.	3
Лобанова Н.Ю.	2
Лопатина К.А.	4
Лопатина О.Л.	4
Лычёва Н.А.	1

М

Максимов В.Н.	1, 4
Максимова С.В.	4
Малаев Д.У.	2
Малиновская Н.А.	4
Малютина С.К.	1, 4
Мариловцева О.В.	1
Маслов А.А.	2, 4
Маслов Л.Н.	4
Матвеева М.В.	2
Матюшечкин С.В.	3
Маянская С.Д.	4
Медведева Д.Е.	2, 4
Медведева Н.Н.	4
Мельник А.В.	3

Миллер С.В.	4
Мильто И.В.	2, 3
Миндзаев Д.Р.	1
Минеева Н.В.	2
Митриченко Д.В.	4
Михайлова А.А.	3
Молчанов С.В.	1
Момот А.П.	1
Моргун А.В.	4
Мосикян А.А.	3
Мусина Н.Н.	2
Муслимов С.А.	1
Мустафина С.В.	1
Мухамадияров Р.А.	2
Мухомедзянов А.В.	4

Н

Назаренко М.С.	4
Нарыжная Н.В.	2, 4
Насонова С.Н.	1
Наумова Л.А.	4
Неклюдова М.В.	3
Немашкалова Л.А.	2, 4
Нескубина И.В.	2, 4
Нестерова Л.Ю.	2
Нестерова Ю.В.	4
Никитин П.В.	3
Никитина В.Б.	1
Никитина М.А.	4
Николаев К.Ю.	2
Николаева И.Г.	4
Николаева О.О.	4
Никулин Д.А.	1
Никулина С.Ю.	1
Новиков П.С.	4
Новицкая Т.А.	2
Новицкий В.В.	2, 3, 4
Ноздрин Г.К.	4
Номеровская А.Ю.	2
Носарев А.В.	1, 4
Носарева О.Л.	2
Нуржанова К.Ф.	4

О

Огородова Л.М.	1
Олейник А.А.	3
Олейник Е.А.	3
Оленников Д.Н.	4
Онищенко С.В.	1
Опонгошева А.Б.	3
Орехов Д.А.	1

Орехова Л.С.	3
Орлов Д.Н.	3
Орлов Д.С.	2
Осипова Е.Д.	4
Останин А.А.	4
Останко В.Л.	1, 3
Очиров М.О.	1

П

Павленко В.Б.	3
Пасман Н.М.	4
Паталяк С.В.	4
Патышева М.Р.	4
Первакова Э.И.	3
Перекуча Н.А.	4
Першина А.Г.	4
Песковец Р.Д.	2
Петенёва Е.С.	4
Петренко В.И.	2, 3
Петров В.А.	1
Петров Д.С.	3
Петрова И.В.	1, 4
Пешковская А.Г.	4
Пинчук А.В.	3
Писарев А.А.	3
Платунова И.М.	1
Плешко Р.И.	3
Поветьева Т.Н.	4
Подоксенов А.Ю.	1
Полетика В.С.	3
Полонская Я.В.	1
Помешкина С.А.	2
Понасенко А.В.	1, 2
Пономарева И.В.	3
Попов О.С.	4
Попов С.В.	1
Поровский Я.В.	4
Прокопенко С.В.	1
Пронина В.А.	1
Просолов А.Б.	4
Прохоренко Т.С.	2
Прохорихин А.А.	2
Пряхин А.С.	3
Пшеничников А.С.	4

Р

Рагино Ю.И.	1, 2
Разуваева Я.Г.	4
Раскина Т.В.	3
Решетов Д.Н.	3
Ржевская О.Н.	3

Роговская Ю.В.	2
Родина И.А.	4
Родионов Е.О.	4
Рощина О.В.	4
Рудых З.А.	4
Рукша Т.Г.	1
Рутковская Н.В.	2
Рыжикова К.А.	4
Рыжова М.В.	3
Рымар О.Д.	1
Рыскина Е.А.	3
Рябов В.В.	2
Рябова Л.М.	3

С

Салмин В.В.	3, 4
Салмина А.Б.	4
Салчак С.М.	4
Самойлова Е.В.	1
Самойлова Ю.Г.	2
Саприна Т.В.	2
Сафонова Е.А.	4
Свиридова В.С.	3
Связов Е.А.	1
Семенова Н.Б.	4
Семичев Е.В.	4
Семке А.В.	3
Серебрякова О.Н.	3
Сибирева О.Ф.	1, 3
Сидоров В.Ю.	2
Сидорова О.Д.	2
Сидорова Т.Н.	2
Симуткин Г.Г.	1
Синицкий А.И.	3
Синицкий М.Ю.	1
Ситникова А.В.	4
Скрябин В.Ю.	4
Слонимская Е.М.	1, 3
Смаглий Л.В.	4
Сметаненко Е.А.	4
Смирнов Д.В.	1
Смолина П.А.	4
Соколова Е.А.	4
Соколова К.В.	4
Соколов Е.Г.	2
Сокоротов Д.А.	4
Соловцов М.А.	3
Сорокина Л.Е.	2
Сорокина М.Г.	3
Стародумова В.А.	4
Степанов В.А.	4
Степанова Е.П.	4

Степová Е.А.	2
Субботкин М.В.	2
Сульгин А.А.	2
Сурикова Е.И.	2, 4
Суслов Н.И.	4
Суханова Г.А.	1
Счастный Е.Д.	1
Сысолятин С.В.	4
Сычев Д.А.	4

Т

Тарадин Г.Г.	4
Таркова А.Р.	2
Таслицкий С.С.	1
Татаринова Т.Е.	4
Татауров И.А.	1
Тепляков А.Т.	1, 3, 4
Терентьева Н.Н.	1, 2, 3
Терещенко С.Н.	1
Терещенко С.Ю.	4
Терпигорев С.А.	3
Тетенева А.В.	3
Тихонов Д.И.	3
Тихонова М.А.	4
Толмачев И.В.	2
Толстокоров И.Г.	1
Тонких О.С.	2
Торопова А.А.	4
Трепитаки Л.К.	2, 4
Третьякова С.С.	1
Трошкин Н.М.	1
Трубачева О.А.	1
Тузиков С.А.	4

У

Уклонская А.А.	3
Уклонская Д.В.	3
Уразова О.И.	3, 4
Усов В.Ю.	4
Уфимцева М.А.	4
Учасова Е.Г.	3

Ф

Фалалеев А.П.	3
Фатова М.А.	1
Федорова О.С.	1
Федосенко С.В.	1
Федотова А.Ю.	4
Федулова Н.В.	1
Филипенко М.Л.	4

Филиппова О.И.	4
Фимушкина Н.Ю.	2
Фомина М.А.	3
Фомочкина И.И.	2, 3
Фохт Э.В.	1
Франциянц Е.М.	2, 4

Х

Халилов С.С.	2
Хамович О.В.	4
Харитонов О.А.	2
Харламова О.С.	2
Харченко В.З.	3
Хлусов И.А.	3, 4
Худякова М.И.	4
Хуторная М.В.	1

Ц

Центр Н.В.	4
Цибульников С.Ю.	4
Цой Е.И.	2
Цыганов М.М.	3

Ч

Чарышкин А.Л.	3
Часовских Н.Ю.	1, 3
Часовских Ю.П.	3
Чердынцева Н.В.	1
Черевко Н.А.	4
Черешнев В.А.	4
Чернов В.Н.	1
Чернова А.А.	1
Черногорюк Г.Э.	1
Черных Е.Р.	4
Чернявский А.М.	3
Чертовских Я.В.	4
Черярина Н.Д.	4

Чечеткин А.В.	2
Чижигов А.В.	1
Чистохин Д.М.	4
Чичерина Е.Н.	2
Чумакова С.П.	3
Чурина Е.Г.	4

Ш

Шаланин В.В.	4
Шаловой А.А.	3
Шатов Д.В.	1, 4
Шахматов И.И.	1
Шахристова Е.В.	2
Шевченко В.О.	1
Шейко Г.Е.	2
Шипулин В.М.	3
Шнайдер О.Л.	1
Шперлинг Л.П.	1
Штарик С.Ю.	2
Шубина М.В.	4
Шульман В.А.	1

Щ

Щаденко С.В.	4
Щепеткин И.А.	2
Щербакова Л.В.	1

Э

Эверт Л.С.	4
Эсмедляева Д.С.	2

Ю

Юдина Н.В.	3
-----------------	---

Я

Янкович К.И.	3
-------------------	---

ПРОФЕССОР СИБГМУ СОЗДАЛ УЧЕБНИК ПО ФАРМАКОЛОГИИ ДЛЯ РОССИЙСКИХ МЕДВУЗОВ



Учебник «Фармакология»
под авторством заведующего кафедрой
фармакологии, доктора медицинских
наук, заслуженного работника высшей
школы РФ, почетного профессора Сибир-
ского государственного медицинского
университета Александра Венгеровского
опубликован в одном из крупнейших
российских медицинских издательств
«ГЭОТАР-Медиа» (Москва).

В учебнике освещаются современные проблемы общей и частной фармакологии, фармакологические свойства современных лекарственных средств, особенности их применения в медицинской практике и клинические подходы к фармакотерапии заболеваний. Действие лекарственных средств представлено в сравнительном плане, приведена информация о новых препаратах.

Издание рекомендовано для обучения студентов специальностей "Лечебное дело" и "Педиатрия", а также может быть использовано студентами медицинских вузов других специальностей. Учебному изданию Александра Исааковича присвоен гриф Министерства науки и высшего образования РФ.

«Фармакология – одна из основополагающих и важнейших дисциплин в профессиональной подготовке медицинских специалистов, которая бурно развивается и имеет широкие перспективы. У Томской школы фармакологов славная история. Выход в свет учебного издания знаменует преемственность ее лучших традиций и развитие их в стенах Сибирского государственного медицинского университета», – подчеркнул Александр Исаакович.

Издание в электронном варианте доступно на сайте издательства «ГЭОТАР-Медиа» и на образовательном ресурсе «Консультант студента». Печатная версия учебника «Фармакология» появится в Научно-медицинской библиотеке СибГМУ в ближайшее время.

Александр Венгеровский является автором 9 монографий, 11 учебников и учебных пособий, более 160 статей, опубликованных в ведущих российских и зарубежных журналах. В 2016 году Александру Исааковичу было присвоено звание «Почетный профессор СибГМУ» за выдающиеся достижения в научно-педагогической деятельности и значительный вклад в развитие науки и образования вуза.



Напомним, в 2012 году 4-е издание учебного пособия Александра Исааковича «Фармакология. Курс лекций» было опубликовано в издательстве «ГЭОТАР-Медиа», отмечено премией в сфере медицинского и фармацевтического образования России по итогам 2012 года как лучшее учебное издание для студентов, обучающихся по специальности «Лечебное дело», в 2016 году по результатам рейтинга Научно-медицинской библиотеки СибГМУ стало самым популярным электронным изданием среди читателей (количество просмотров страниц – 9225).

Кафедра фармакологии СибГМУ создана в 1891 году на медицинском факультете Императорского Томского университета впервые в Сибири. На базе кафедры сформировалась Томская научная школа фармакологии – одна из старейших в России. Основоположником сибирской школы фармакологов является ученик профессора П.В. Буржинского, академик АМН СССР, Заслуженный деятель науки РСФСР, лауреат Государственной (Сталинской) премии СССР Николай Вершинин. Николай Васильевич создал учебник «Фармакология как основа терапии», который выдержал 11 изданий и был обязательным руководством для студентов медицинских вузов СССР и Китайской Народной Республики.

ISSN PRINT: 1682-0363 | ISSN ONLINE: 1819-3684 | Бюллетень сибирской медицины
Bulletin of Siberian Medicine

bulletin
ENG | РУС

Бюллетень сибирской медицины

Расширенный поиск

ГЛАВНАЯ | О ЖУРНАЛЕ | МОЙ КАБИНЕТ | ПОИСК | СВЕЖИЙ НОМЕР | АРХИВ | НОВОСТИ | АРХИВ 2002-2011



Научно-практический рецензируемый журнал
Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Бюллетень сибирской»

медицины/Bulletin of Siberian Medicine» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты научных исследований, ориентированных на разработку передовых медицинских технологий.

С целью объединения научной медицинской общественности, распространения актуальной информации и содействия профессиональному росту специалистов журнал публикует оригинальные научные статьи, представляющие результаты экспериментальных и клинических исследований, лекции, научные обзоры, отражающие результаты исследований в различных областях медицины. Приоритет для публикации предоставляется материалам по перспективным направлениям современной медицинской науки:

- молекулярная медицина,
- регенеративная медицина и бионикерия,
- информационные технологии в биологии и медицине,
- инвазивные медицинские технологии,
- нейронауки и поведенческая медицина,
- фармакология и инновационная фармацевтика,
- ядерная медицина,
- трансляционная медицина.

Журнал выполняет широкий спектр функций, которые в целом дают представление об основных направлениях развития российской медицинской науки и ее достижениях, ее конкурентоспособности и степени интеграции в международное научное сообщество.

Научно-практический рецензируемый журнал «Бюллетень сибирской медицины / Bulletin of Siberian Medicine» издается Сибирским государственным медицинским университетом с 2001 г. при поддержке ТРОО «Академия доказательной доказательной медицины».

Главный редактор — академик РАН В.В. Новицкий.

Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № 77-7366 от 26.05.2001 г.
ISSN 1682-0363

Журнал включен в Перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК, редакция 01.12.2015).

Индексация:

- РИНЦ (RSCI; Science Index)
- КиберЛенинка
- DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS
- WoS (ESCI) с 2016 года
- Scopus с 2018 года.

Продолжая традиция первых медицинских журналов, на

Отправить статью

Правила для авторов

Редакционная коллегия

Рецензирование

Этика публикаций

ПОПУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Содержание мидолатальной зинглы оксид азота в клапане после физических нагрузок различного характера

Том 16, № 2 (2017)



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР
Новицкий В.В.

ОБЛАКО ТЕГОВ

адаптация артериальной гипертензия
бронхиальная астма воспаление дети

OPEN ACCESS

АНРИ

СИБИРЛЕНИНКА

DOA

LIBRARY.RU

Global Es

Google

360

NEICON

NLM Catalog

Open Archives

R

Russian Science Citation Index

nmj.ru

ROAD

Scopus

U.S. PUBLICATIONS

WorldCat

znaniya.com

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)
БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
2020. Т. 19. № 4. 1–252
Подписной индекс 10650