

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

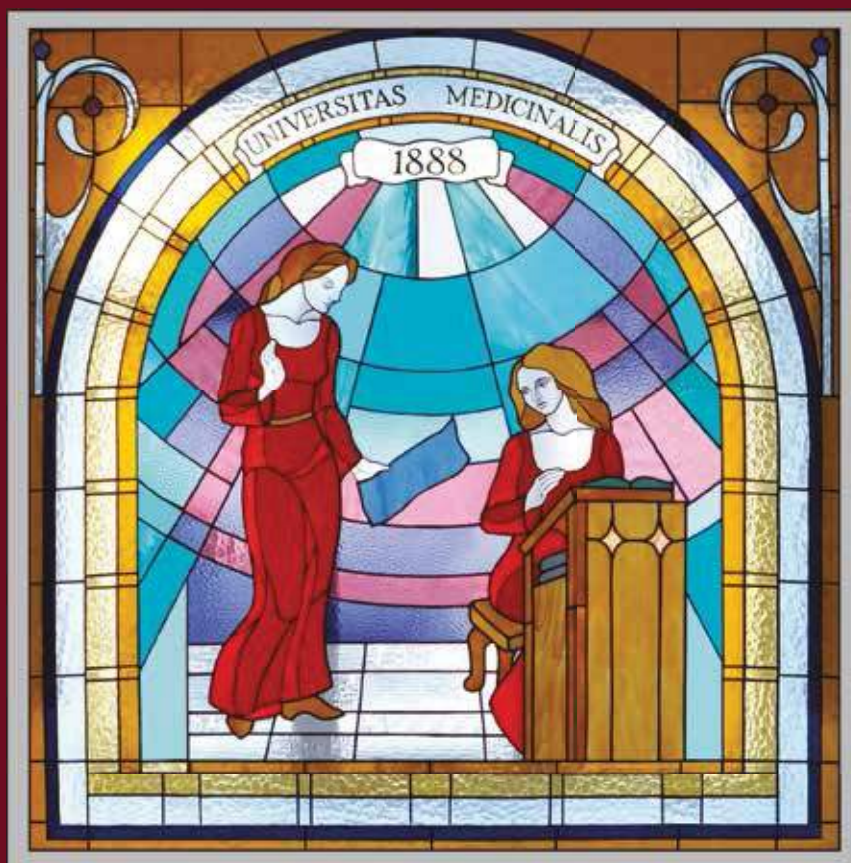
БСМ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

BSM



Том 21

№ 4. 2022

ISSN 1682-0363

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ 1. 2002

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ 3. 2002

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ 4. 2002

ISSN 1682-0363

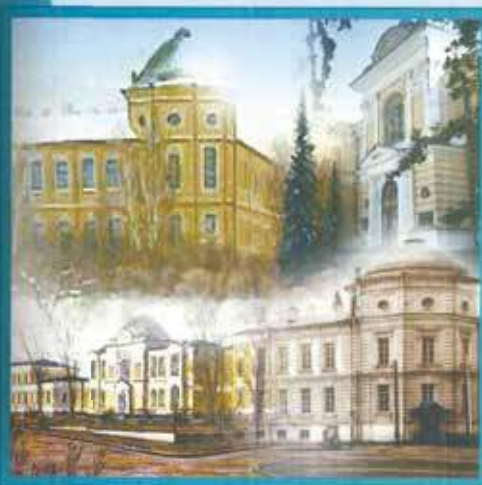
БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ 2. 2004

ISSN 1682-0363

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ 2. 2012

20 ЛЕТ ЖУРНАЛУ «БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ»

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Выходит 4 раза в год

Том 21, № 4, 2022

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.tomsk@mail.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 30.12.2022 г.
Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.
Бумага мелованная. Гарнитура «Times».
Печ. л. 26,75. Усл. печ. л. 26,0.
Тираж 500 экз. Заказ 921.

Цена – свободная.
Дата выхода в свет 30.12.2022.

При перепечатке ссылка на
«Бюллетень сибирской медицины» обязательна.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

О.И. Уразова, *член-корреспондент РАН (Томск)*

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Л.М. Огородова, *член-корреспондент РАН (Томск)*

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

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

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

В.М. Алифорова, *профессор, д-р мед. наук (Томск)*
Л.И. Афтанас, *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)*
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. Epple, *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 21, No. 4, 2022

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

FOUNDER AND PUBLISHER:

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

Registered by the Ministry of Mass Media
and Communications of the Russian Federation
Certificate of registration
No. 77-7366 of 26.03.2001

The journal "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 doctoral and Candidate of Sciences
theses

Bulletin of Siberian Medicine is indexed in:

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

Editorial Board Office:

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

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

Editors: E.E. Stepanova, Yu.P. Gotfrid
Translators: M.E. Orlova, K.Yu. Skvortsova
Electronic makeup, cover design
L.D. Krivtsova

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

Signed to print on 30.12.2022
Format 60 × 84/8. Offset print.
Coated paper. Times font.
P.s. 26,75. C.p.s. 26,0.
500 copies. Order No. 921.

The price – free.
Date of publication 30.12.2022.

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

© Siberian State Medical University, 2022

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF:

L.M. Ogorodova, *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)*
S.V. Logvinov, *Professor (Tomsk)*
A.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	ORIGINAL ARTICLES
Брагина О.Д., Таширева Л.А., Чернов В.И., Деев С.М., Толмачев В.М. Возможности прогнозирования статуса рецептора HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы с применением таргетного радионуклидного препарата « ^{99m} Tc-DARPinG3»	Bragina O.D., Tashireva L.A., Chernov V.I., Deyev S.M., Tolmachev V.M. Possibilities of predicting the status of the HER2 / neu receptor in a primary tumor in breast cancer patients using a targeted radiopharmaceutical « ^{99m} Tc-DARPinG3»
Братишко К.А., Логвинова Л.А., Иванов В.В., Жиркова А.М., Уфандеев А.А., Буйко Е.Е., Зима А.П., Рабцевич Е.С., Кузнецова М.В., Белоусов М.В., Перминова И.В., Зыкова М.В. Оценка влияния железосодержащих субстанций на основе гуминовых веществ на гематологические показатели на модели острой постгеморрагической и алиментарной анемии	Bratishko K.A., Logvinova L.A., Ivanov V.V., Zhirkova A.M., Ufandeew A.A., Buyko E.E., Zima A.P., Rabceovich E.S., Kuznecova M.V., Belousov M.V., Perminova I.V., Zyкова M.V. Assessment of the effect of iron-rich humic substances on hematological parameters in the model of acute posthemorrhagic and iron deficiency anemia
Вдовин В.М., Шахматов И.И., Момот А.П. Сравнительный анализ предрасположенности к тромбообразованию при применении известных системных гемостатических средств и фибрин-мономера в эксперименте	Vdovin V.M., Shakhmatov I.I., Momot A.P. Comparative study of predisposition to thrombosis with administration of known systemic hemostatic agents and fibrin monomer in the experiment
Воронкова О.В., Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Есимова И.Е., Григорьева А.В., Осиков И.А., Чернышов Н.А., Мотлохова Е.А. Особенности цитограммы и цитокинового профиля жидкости бронхоальвеолярного лаважа при экспериментальном метаболическом синдроме	Voronkova O.V., Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Esimova I.E., Grigorieva A.V., Osikhov I.A., Chernyshov N.A., Motlokhova E.A. Features of the cytogram and cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid in experimental metabolic syndrome
Гончарова А.С., Колесников Е.Н., Егоров Г.Ю., Максимов А.Ю., Шевченко А.Н., Непомнящая Е.М., Гвалдин Д.Ю., Курбанова Л.З., Ходакова Д.В., Кит С.О., Каймакчи О.Ю., Снежко А.В. Разработка и характеристика ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с колоректальным раком, для тестирования новых фармакологических субстанций	Goncharova A.S., Kolesnikov E.N., Egorov G.Yu., Maksimov A.Yu., Shevchenko A.N., Nepomnyashchaya E.M., Gvaldin D.Yu., Kurbanova L.Z., Khodakova D.V., Kit S.O., Kaymakchi O.Yu., Snezhko A.V. Development and characterization of patient-derived xenograft models of colorectal cancer for testing new pharmacological substances
Гракова Е.В., Копьева К.В., Шилов С.Н., Березикова Е.Н., Попова А.А., Неупокоева М.Н., Ратушняк Е.Т., Калюжнин В.В., Тепляков А.Т. Фармакогенетика в лечении антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний	Grakova E.V., Kopeva K.V., Shilov S.N., Berezikova E.N., Popova A.A., Neupokoeva M.N., Ratushnyak E.T., Kalyuzhin V.V., Teplyakov A.T. Pharmacogenetics in treatment of anthracycline-induced cardiotoxicity in women without prior cardiovascular diseases
Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Кирюхина Л.Д., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К. Молекулярные механизмы воспаления в патогенезе нарушений внешнего дыхания у больных туберкулезом легких	Dyakova M.Ye., Serebryanaya N.B., Kiryukhina L.D., Esmedlyaeva D.S., Yablonskiy P.K. Molecular mechanisms of inflammation in the pathogenesis of respiratory disorders in patients with pulmonary tuberculosis

Иванова Е.А., Дзюман А.Н., Дворниченко М.В. Местная биосовместимость и биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов при подкожной имплантации полилактидных матриц	63	Ivanova E.A., Dzyuman A.N., Dvornichenko M.V. Local biocompatibility and biochemical profile of hepatic cytolysis in subcutaneous implantation of polylactide matrices
Иванова В.В., Мильто И.В., Серебрякова О.Н., Суходоло И.В. Влияние преждевременного рождения крыс на пролиферацию и гиперплазию кардиомиоцитов	72	Ivanova V.V., Milto I.V., Serebryakova O.N., Sukhodolo I.V. Effect of preterm birth in rats on proliferation and hyperplasia of cardiomyocytes
Исубакова Д.С., Литвяков Н.В., Цымбал О.С., Усова Т.В., Цыпленкова М.Ю., Мильто И.В., Тахауов Р.М. Поиск полиморфных вариантов кандидатных генов индивидуальной радиочувствительности	88	Isubakova D.S., Litviakov N.V., Tsybal O.S., Usova T.V., Tsyplenkova M.Yu., Milto I.V., Takhaouov R.M. Search for polymorphic variants of candidate genes contributing to individual radiosensitivity
Копьева К.В., Мочула А.В., Мальцева А.Н., Гракова Е.В., Шипулин В.В., Гусакова А.М., Завадовский К.В. Сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса: роль микроваскулярной дисфункции	81	Kopeva K.V., Mochula A.V., Maltseva A.N., Grakova E.V., Shipulin V.V., Gusakova A.M., Zavadovsky K.V. Heart failure with preserved ejection fraction: the role of microvascular dysfunction
Логвинов С.В., Мустафина Л.Р., Курбатов Б.К., Нарыжная Н.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В. Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на сетчатку молодых и старых крыс	98	Logvinov S.V., Mustafina L.R., Kurbatov B.K., Naryzhnaya N.V., Varakuta E.Yu., Potapov A.V. Effects of a high-fat, high-carbohydrate diet on the retina of young and old rats
Никитина М.А., Алифиров В.М., Брагина Е.Ю., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е., Назаренко М.С. Средовые и генетические факторы риска болезни Паркинсона	105	Nikitina M.A., Alifirova V.M., Bragina E.Yu., Babushkina N.P., Gomboeva D.E., Nazarenko M.S. Environmental and genetic risk factors for Parkinson's disease
Салмин В.В., Перевертов Т.А., Мурадян Г.А., Гудкова Е.С., Эпова А.С., Кутяков В.А., Лычковская Е.В., Чекишева Т.Н., Семичев Е.В., Малиновская Н.А., Медведева Н.Н., Макаренко Т.А., Салмина А.Б. Эффекты плазменной кислоты на ткани матки крыс <i>in vitro</i>	114	Salmin V.V., Perevertov T.A., Muradyan G.A., Gudkova E.S., Epova A.S., Kutyakov V.A., Lychkovskaya E.V., Chekischeva T.N., Semichev E.V., Malinovskaya N.A., Medvedeva N.N., Makarenko T.A., Salmina A.B. Effects of plasma acid on rat uterine tissue <i>in vitro</i>
Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Стрюкова Е.В., Шрамко В.С., Садовский Е.В., Кургузов А.В., Мурашов И.С., Чернявский А.М., Рагино Ю.И. Изучение ассоциаций белков в крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях методом количественной протеомики	122	Stakhneva E.M., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Striukova E.V., Shramko V.S., Sadovski E.V., Kurguzov A.V., Murashov I.S., Chernyavskii A.M., Ragino Yu.I. Study of associations of blood proteins with development of unstable atherosclerotic plaques in coronary arteries by quantitative proteomics
Тимофеева Т.М., Кобалава Ж.Д., Сафарова А.Ф., Кабель М.Ф.Э., Тигай Ж.Г. Прогностическое значение перипроцедурной динамики фракции выброса левого желудочка у пациентов с первым инфарктом миокарда и чрескожным коронарным вмешательством	130	Timofeeva T.M., Kobalava Zh.D., Safarova A.F., Cabello M.F.E., Tigay Zh.G. Prognostic value of short-term trajectories of left ventricular ejection fraction in patients with first myocardial infarction and percutaneous coronary intervention

Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Колобовникова Ю.В., Чумакова С.П.

Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких

140

Churina E.G., Popova A.V., Urazova O.I., Patysheva M.R., Kolobovnikova Ju.V., Chumakova S.P.

Expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

REVIEWS AND LECTURES

Балабанова А.А., Куражов А.П., Завадовская В.Д.

Ультразвуковая диагностика COVID-19-ассоциированных пневмоний

150

Balabanova A.A., Kurazhov A.P., Zavadovskaya V.D.

Lung ultrasound in the diagnosis of COVID-19-associated pneumonia

Карнаушкина М.А., Свиридов Ф.С., Корчагин В.И., Саламайкина С.А., Васильева И.С., Литвинова М.М., Вацик-Городецкая М.В.

Генетические факторы риска тяжелого течения пневмонии: систематический обзор

160

Karnaushkina M.A., Sviridov P.S., Korchagin V.I., Salamaikina S.A., Vasilyeva I.S., Litvinova M.M., Vatsik-Gorodetskaya M.V.

Genetic factors contributing to a severe course of pneumonia: a systematic review

Першина А.Г., Невская К.В., Морозов К.Р., Литвяков Н.В.

Методы оценки влияния микроРНК на гены стволовой пластичности

170

Pershina A.G., Nevskaya K.V., Morozov K.R., Litviakov N.V.

Methods for assessing the effect of microRNA on stemness genes

Порядин Г.В., Захватов А.Н., Паршина А.Ю.

Патогенетические аспекты взаимосвязи хронического генерализованного пародонтита и псориазического артрита

183

Poryadin G.V., Zakhvatov A.N., Parshina A.Yu.

Pathogenetic aspects of the development of psoriatic arthritis in people with generalized chronic periodontitis

Часовских Н.Ю., Чижик Е.Е.

Биоинформационный анализ биологических путей при ишемической болезни сердца и болезни Альцгеймера

193

Chasovskikh N.Y., Chizhik E.E.

Bioinformatic analysis of biological pathways in coronary heart disease and Alzheimer's disease

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

CLINICAL CASES

Тетенева А.В., Чернявская Г.М., Беспалова И.Д., Скороходова Т.В., Кошавцева Ю.И., Радионов Д.И., Калюжина Е.В., Романов Д.С., Радионова Е.В., Устюжанина Е.А., Степанов И.А., Карманова А.В., Голубятникова Е.В.

Клинические особенности течения муковисцидоза на фоне беременности и родов

205

Teteneva A.V., Chernyavskaya G.M., Bepalova I.D., Skorokhodova T.V., Koshchavtseva Yu.I., Radionov D.I., Kalyuzhina E.V., Romanov D.S., Radionova E.V., Ustyuzhanina E.A., Varfolomeeva I.A., Stepanov I.A., Karmanova A.V., Golubyatnikova E.V.

Clinical features of the course of cystic fibrosis during pregnancy and childbirth

ЮБИЛЕИ

JUBILEES

К 70-летию со дня рождения академика РАН Евгения Лхамцыреновича Чойнзоннова

212

On the 70th birthday of Evgeny L. Choinzonov, the Academician of the Russian Academy of Sciences

УДК 618.19-006.6-021.3:577.171.6]-037:615.849

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-6-12>

Возможности прогнозирования статуса рецептора HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы с применением таргетного радионуклидного препарата «^{99m}Tc-DARPinG3»

Брагина О.Д.^{1,2}, Таширева Л.А.¹, Чернов В.И.^{1,2}, Деев С.М.^{2,3}, Толмачев В.М.^{2,4}

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

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

³ Институт биоорганической химии (ИБХ) им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (РАН)
117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

⁴ Уппсальский университет
75236, Швеция, г. Уппсала, Segerstedthuset, Dag Hammarskjölds väg 7

РЕЗЮМЕ

Цель. Определить информативные прогностические критерии для оценки статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы (РМЖ) с применением радиофармпрепарата «^{99m}Tc-DARPinG3».

Материалы и методы. В работу включены 10 больных РМЖ ($T_{1-4}N_{0-2}M_0$), которым до начала системного лечения выполнялось радионуклидное исследование с применением препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» в дозировке основного вещества 3 000 мкг: у пяти пациентов была выявлена гиперэкспрессия HER2/neu в первичной опухоли молочной железы, у пяти – нет. Во всех случаях проводились морфологическое и иммуногистохимическое исследования и FISH-анализ ткани основного опухолевого узла. Через 4 ч после введения препарата всем больным выполнялась однофотонная компьютерная томография органов грудной клетки.

Результаты. Суммарная активность препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» составила $522,4 \pm 341,8$ МБк. При сравнительном анализе статистически значимым являлось более высокое накопление меченого протеина в HER2-позитивных опухолях молочной железы ($p = 0,0159$, U -критерий Манна – Уитни). Анализ соотношений продемонстрировал значимые различия показателя опухоль/фон у больных в подгруппе с HER2-позитивными опухолями молочной железы ($p < 0,0159$, U -критерий Манна – Уитни). На основании проведенного исследования с применением метода логистической регрессии разработана математическая модель для прогнозирования статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных РМЖ (специфичность и чувствительность 100%; $p = 0,0004$) при использовании препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» в дозировке 3 000 мкг через 4 ч после введения.

Заключение. Результаты данного исследования позволяют рассматривать показатель опухоль/фон через 4 ч после введения препарата «^{99m}Tc-DARPinG3» в качестве дополнительного перспективного параметра для определения статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, радионуклидная диагностика, альтернативные каркасные белки, DARPInG3, HER2/neu

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования по теме «Разработка таргетных молекул на основе каркасных белков для диагностики и терапии злокачественных новообразований: тераностический подход» (соглашение № 075-15-2022-1103).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Для цитирования: Брагина О.Д., Таширева Л.А., Чернов В.И., Деев С.М., Толмачев В.М. Возможности прогнозирования статуса рецептора HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы с применением таргетного радионуклидного препарата «^{99m}Tc-DARPInG3». *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):6–12. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-6-12>.

Possibilities of predicting the HER2 / neu status in a primary tumor in breast cancer patients using ^{99m}Tc-DARPInG3

Bragina O.D.^{1,2}, Tashireva L.A.¹, Chernov V.I.^{1,2}, Deyev S.M.^{2,3}, Tolmachev V.M.^{2,4}

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

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

³ Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences 16/10, Miklukho-Maklaya Str., 117997, Moscow, Russian Federation

⁴ Uppsala University 7, Dag Hammarskjölds väg, Segerstedthuset, 75236, Uppsala, Sweden

ABSTRACT

Aim. To determine informative prognostic criteria for assessing the HER2 / neu status in primary breast cancer using ^{99m}Tc-DARPInG3.

Materials and methods. The study included 10 patients with breast cancer (T₁₋₄N₀₋₂M₀) before systemic therapy, who underwent a radionuclide study using ^{99m}Tc-DARPInG3 at a dose of 3,000 µg. Five patients were characterized by HER2 / neu overexpression in primary breast cancer, whereas 5 patients were HER2-negative. For all patients, morphological and immunohistochemical studies and fluorescence in situ hybridization (FISH) of the primary tumor nodule were carried out. Single-photon emission computed tomography (SPECT) of the chest was performed for all patients 4 hours after the injection of ^{99m}Tc-DARPInG3.

Results. The total activity of ^{99m}Tc-DARPInG3 was 522.4 ± 341.8 MBq. The comparative analysis showed that higher uptake of the labeled protein in HER2-positive breast cancer was significant ($p = 0.0159$, Mann – Whitney U test). The analysis of the ratios showed significant differences in the tumor-to-background ratios in patients with HER2-positive breast cancer ($p < 0.0159$, Mann – Whitney U test). Based on the logistic regression analysis, a mathematical model was developed to predict the status of HER2 / neu in primary breast cancer patients (specificity and sensitivity 100%; $p = 0.0004$) using ^{99m}Tc-DARPInG3 at a dose of 3,000 mcg 4 hours after the injection of the radiopharmaceutical.

Conclusion. The results of the study allow to consider the tumor-to-background ratio 4 hours after the injection of ^{99m}Tc-DARPInG3 as an additional prognostic parameter for determining the HER2 / neu status in primary breast cancer.

Keywords: breast cancer, radionuclide diagnosis, alternative scaffolds, DARPInG3, HER2 / neu

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

Source of financing. The study was supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education, Agreement No. 075-15-2022-1103, on the topic "Development of targeted molecules based on scaffold proteins for the diagnosis and therapy of malignant neoplasms: a theranostic approach".

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Bioethics Committee at Cancer Research Institute, Tomsk NRMС.

For citation: Bragina O.D., Tashireva L.A., Chernov V.I., Deyev S.M., Tolmachev V.M. Possibilities of predicting the status of the HER2 / neu receptor in a primary tumor in breast cancer patients using a targeted radiopharmaceutical «^{99m}Tc-DARPInG3». *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):6–12. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-6-12>.

ВВЕДЕНИЕ

HER2-позитивный рак молочной железы (РМЖ) диагностируется у более чем 20: пациенток с данной патологией, при этом данный подтип опухоли отличается неблагоприятным прогнозом и высоким риском отдаленного метастазирования. Высокая экспрессия рецептора HER2/neu является предиктором чувствительности опухоли к специфической (таргетной) терапии, для проведения которой необходим строгий отбор больных РМЖ [1, 2].

Применяемые на данный момент иммуногистохимическое исследование (ИГХ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-исследование) не обладают оптимальными характеристиками для выявления статуса HER2/neu, в частности, при их использовании исключено одномоментное изучение состояния первичной опухоли, наличие регионарного и отдаленного метастазирования, а также определение молекулярных характеристик выявленных участков опухолевого роста. Данный факт имеет особое значение в аспекте гетерогенности экспрессии HER2/neu в первичной опухоли и метастатических очагах, что, по различным данным, может встречаться до 6–48% случаев. Забор материала для морфологического исследования в данном случае не всегда технически невыполним либо может повлечь за собой серьезные осложнения [3, 4].

Одним из современных направлений определения статуса HER2/neu является изучение возможностей радионуклидной таргетной диагностики с использованием альтернативных каркасных белков (скаффолды) [5–7]. К одним из представителей альтернативных каркасных белков относятся молекулы DARPInG3, которые представляют собой естественные анкириновые повторы пептида [8, 9]. По данным I фазы клинических испытаний препарата «^{99m}Tc-DARPInG3», у больных РМЖ выявлены отсутствие жалоб и токсического воздействия соеди-

нения на организм пациентов за весь период динамического наблюдения, более высокая аккумуляция соединения в опухолях с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu, а также определены оптимальная доза протеина (3 000 мкг) и временной интервал исследования после введения препарата – 4 ч [10].

В качестве продолжения исследования в подгруппе пациентов, получивших дозу протеина DARPInG3 3 000 мкг, нами был проведен дополнительный анализ по выявлению прогностических критериев и порогового значения опухоль/фон (О/Ф) препарата «^{99m}Tc-DARPInG3» для оценки статуса HER2/neu первичной опухоли молочной железы.

В данной работе проводится определение информативных прогностических критериев для оценки статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных РМЖ с использованием соединения «^{99m}Tc-DARPInG3».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование зарегистрировано в ClinicalTrials.gov (Identifier: NCT04277338) и одобрено биоэтическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №... от). В работу включены 10 больных РМЖ (T₁₋₃N₀₋₁M₀), которым на этапе диагностики выполнялось радионуклидное исследование с препаратом «^{99m}Tc-DARPInG3» в дозировке протеина 3 000 мкг через 4 ч после введения: у пяти пациенток отмечалась гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста; у пяти – отрицательная.

У всех больных выполнялось стандартное морфологическое и ИГХ-исследование опухоли молочной железы, верификация метастатических аксиллярных лимфатических узлов проводилась цитологически. ИГХ выполнялось по стандартной методике, для этих целей использовались антитела фирмы Dako к

Таблица 1

Сравнение аккумуляции $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ у больных РМЖ через 4 ч после введения, $Me [Q_1-Q_3]$		
Накопление препарата « $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ »	HER2-негативные опухоли молочной железы (суммарное количество импульсов)	HER2-позитивные опухоли молочной железы (суммарное количество импульсов)
В опухоли	835,0 (654,5–2534,0)	8184,0 (5174,0–13453,0)
	$p = 0,0159$	
В фоновом участке	450,0 (81,0–1206,0)	413,5 (391,5–566,0)
	$p = 0,9048$	
В широчайшей мышце спины	183,0 (58,0–790,5)	390,5 (298,8–588,0)
	$p = 0,7302$	
В печени	1060,0 (690,5–6421,0)	4481,0 (2300,0–5126,0)
	$p = 0,2857$	

Анализ соотношения накопления препарата продемонстрировал значимые различия показателя опухоль/фон у больных в подгруппе с HER2-позитивными опухолями молочной железы ($p < 0,0159$, U -критерий Манна – Уитни) (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2

Показатели О/Ф, О/ШМС и О/П у больных РМЖ через 4 ч после введения « $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ », $Me [Q_1-Q_3]$		
Показатель	HER2-негативные опухоли молочной железы	HER2-позитивные опухоли молочной железы
Опухоль/фон	2,4 (1,8–8,0)	15,3 (12,6–32,0)
	$p = 0,0159$	
Опухоль/ШМС	4,5 (3,2–12,8)	22,5 (9,4–45,1)
	$p = 0,0635$	
Опухоль/печень	0,8 (0,4–1,1)	2,3 (1,0–5,6)
	$p = 0,0635$	

Дополнительно для определения прогностической значимости параметра опухоль/фон в оценке статуса HER2/neu в первичной опухоли нами были построены ROC-кривые на основании ROC-анализа. Площадь под кривой составила 1,000 (95%-й доверительный интервал 1,000–1,000), $p < 0,0143$. Пороговое значение прогностической значимости маркера составило 10,39, чувствительность – 100,0%, специфичность – 100,0% (рис. 3).

На основании проведенного анализа с применением метода логистической регрессии показано, что соотношение опухоль/фон более 10,39 через 4 ч после введения препарата « $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ » в дозировке 3 000 мкг является фактором прогнозирования положительного статуса рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2/neu) в первичной опухоли у больных РМЖ ($\text{Chi-square} = 12,36$, $p = 0,0004$). Чувствительность и специфичность модели – 100%.

онкопротеину c-erbB-2. Экспрессия HER2/neu оценивалась согласно Американскому обществу клинической онкологии (ASCO) от 2018 г. [1].

Препарат готовился в стерильных условиях перед введением в отделении радионуклидной диагностики НИИ онкологии ТНМИЦ с использованием набора CRS Isolink (Center for Radiopharmaceutical Science, Paul Scherrer Institute, Villigen, Швейцария). Очищение соединения « $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ » выполнялось с использованием колонок NAP-5 (GE Healthcare, Швеция). После этапа очищения соединение разбавлялось до 10 мл стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида, фильтровалось и медленно вводилось больному [9].

Через 4 ч после инъекции проводилась однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) органов грудной клетки в положении лежа на спине; запись выполнялась в 32 проекциях. Оценка данных выполнялась с применением пакета программ E. Soft (Siemens, Германия) с определением аккумуляции радиофармпрепарата (РФП) в первичной опухоли молочной железы, симметричном участке противоположной молочной железы, проекции широчайшей мышцы спины и печени путем обведения «зоны интереса» (region of interesting, ROI) на аксиальных срезах с наилучшей визуализацией ($v = 3,53 \text{ см}^3$). Выполнялся расчет количественных показателей О/Ф, опухоль/широкая мышца спины (опухоль/ШМС) и опухоль/печень (О/П).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 for Windows и Prism 9 (GraphPad, США). Проверку нормальности распределения показателей осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Учитывая ненормальное распределение изучаемых количественных признаков, для оценки достоверности различий медиан для сравнения независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1-Q_3)$. Прогностическая значимость изучаемых параметров оценивалась с помощью ROC-анализа. Метод логистической регрессии был использован для оценки риска. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность РФП « $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ » непосредственно перед введением пациенту составила $522,4 \pm 341,8$ МБк. При сравнительном анализе накопления РФП статистическую значимость имела более высокая аккумуляция соединения в первичных опухолях молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu ($p = 0,0159$, U -критерий Манна – Уитни) (табл. 1, рис. 1).

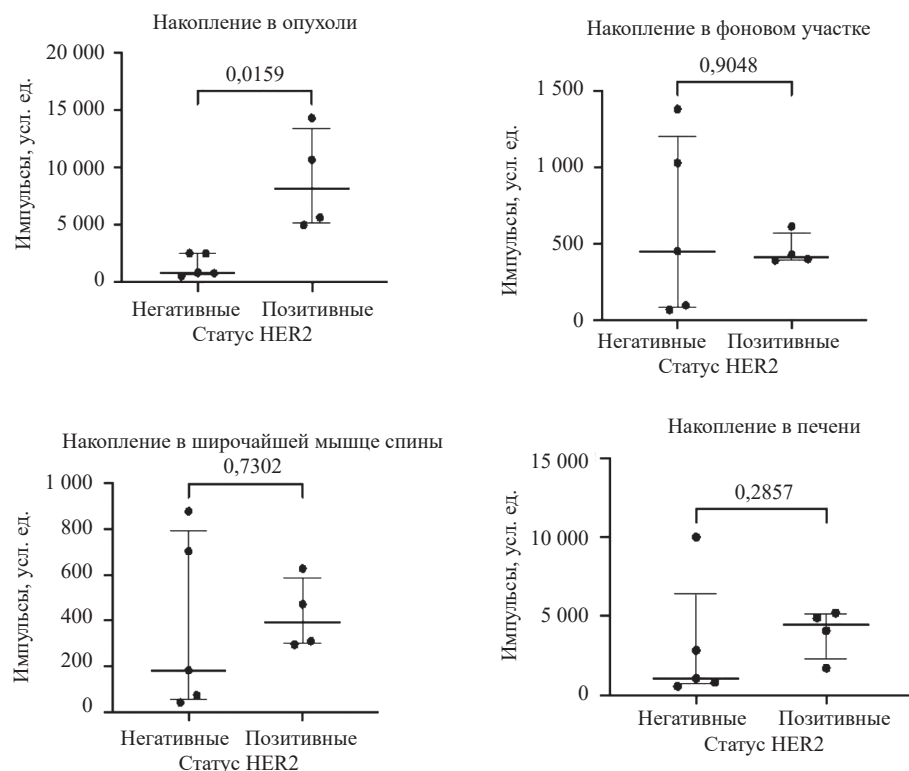


Рис. 1. Показатели накопления ^{99m}Tc -DARPinG3 у больных РМЖ через 4 ч после введения

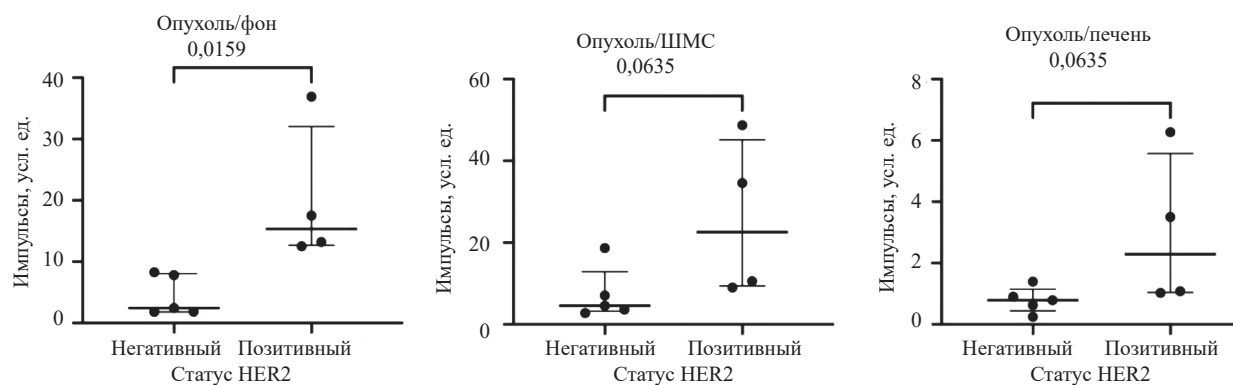


Рис. 2. Показатели О/Ф, О/ШМС и О/П у больных РМЖ через 4 ч после введения ^{99m}Tc -DARPinG3

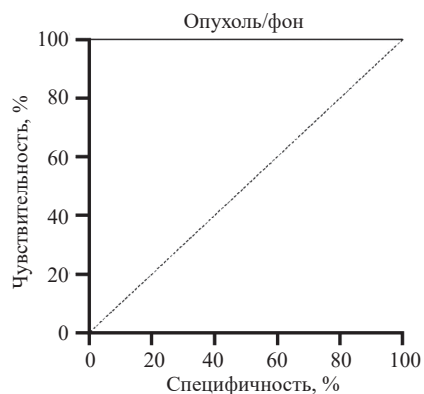


Рис. 3. ROC-кривая показателя О/Ф для оценки статуса HER2/neu первичной опухоли у больных РМЖ через 4 ч после введения ^{99m}Tc -DARPinG3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение статуса HER2/neu является важнейшей составляющей для назначения оптимальной системной терапии у больных РМЖ. К сожалению, несмотря на существование множества диагностических методик, на сегодняшний день они не могут решить проблему одномоментного анализа распространенности опухолевого процесса в организме пациента с оценкой молекулярных характеристик выявленных очагов. Стремительное развитие методов таргетной радионуклидной визуализации и освещение возможностей данного метода исследования на мировых научных и клинических площадках позволили существенно расширить представления об его месте в диагностических алгоритмах обследования больных РМЖ и укрепить перспективность подобного рода работ.

В частности, первым клинически апробированным представителем скаффолдов, являющимся «новейшей» группой синтетических протеинов и обладающим оптимальными свойствами для переноса радионуклида к опухолевой клетке, явилась молекула аффибоди. Меченная ^{111}In и ^{68}Ga (^{111}In – АВУ-025 и ^{68}Ga – АВУ-025), она продемонстрировала свою эффективность в ОФЭКТ/КТ и позитронно-эмиссионной диагностике метастатического РМЖ с гиперэкспрессией HER2/neu [11, 12]. Радионуклидные исследования в отношении диагностической эффективности альтернативных каркасных белков при HER2-позитивном раке молочной железы, выполняемые на базе Томского политехнического университета и Томского НИМЦ, ранее позволили осуществить I фазу клинического исследования меченной техницием-99m синтетической молекулы ADAPT6 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ADAPT6) [13, 14] с демонстрацией хорошей переносимости соединения и высокой диагностической эффективностью в определении экспрессии HER2/neu в основном опухолевом узле молочной железы [15].

Настоящая работа является продолжением изучения другого представителя альтернативных каркасных белков – молекулы DARPInG3, меченной техницием-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DARPInG3) и тропной к HER2/neu. Полученные в ходе недавно выполненной I фазы клинических исследований результаты также продемонстрировали хорошую переносимость препарата, возможность его использования для визуализации опухолевых очагов в молочных железах, аксиллярной области, а также висцеральных органах. Данный фрагмент исследования позволил дополнительно выделить наиболее информативные параметры для разделения опухолей молочных желез в зависимости от статуса HER2/neu.

В частности, учет показателя опухоль/фон в математической модели дает возможность прогнозировать статус HER2/neu в основном опухолевом узле у больных РМЖ с высокими показателями чувствительности и специфичности (100 и 100% соответственно, $p = 0,0004$), что позволяет рассматривать соотношение опухоль/фон через 4 ч после введения препарата « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DARPInG3» в качестве дополнительного перспективного агента для определения статуса Her2/neu у данной категории пациентов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(31):3997–4013. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.9984.
2. Zavyalova M., Vtorushin S., Krakhmal N., Saveliyeva O., Tashireva L., Kaigorodova E. et al. Clinicopathological features of non-specific invasive breast cancer according to its molecular subtypes. *Experimental Oncology.* 2016;38(2):122–127.
3. Bartley A.N., Washington M.K., Ventura C.B., Ismaila N., Colasacco C., Benson 3rd A.B. et al. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 2017;35(4):446–464. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.4836.
4. Furrer D., Sanschagrin F., Jabod S., Diorio C. Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015;144(5):686–703. DOI: 10.1309/AJCPT41TCBUEVDQC.
5. Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларкина М.С. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований. *Бюллетень сибирской медицины.* 2019;18(3):125–133. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-3-125-133.
6. Брагина О.Д., Деев С.М., Чернов В.И., Толмачев В.М. Эволюция таргетной радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы *Acta Naturae.* 2022;14(2):4–15. DOI: 10.32607/actanaturae.11611.
7. Krasniqi A., D'Huyvetter M., Devoogdt N., Frejd F.Y., Sorensen J., Orlova A. et al. Same-day imaging using small proteins: clinical experience and translational prospects in oncology. *Journal of Nuclear Medicine.* 2018;59(6):885–891. DOI: 10.2967/jnumed.117.199901.
8. Shilova O.N., Deyev S.M. DARPins: Promising scaffolds for theranostics. *Acta Nature.* 2019;11(4):42–53. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53.
9. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M. et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled DARPIn G3. *Scientific Reports.* 2019;9(1):9405. DOI: 10.1038/s41598-019-45795-8.

10. Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A. et al. Phase I trial of ^{99m}Tc -(HE)3-G3, a DARPIn-based probe for imaging of HER2 expression in breast cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2022;Apr.;63(4):528–535. DOI: 10.2967/jnumed.121.262542.
11. Sandström M., Lindskog K., Velikyan I., Wennborg A., Feldwisch J., Sandberg D. et al. Biodistribution and radiation dosimetry of the anti-HER2 Affibody molecule ^{68}Ga -ABY-025 in breast cancer patients. *J. Nucl. Med.* 2016;57(6):867–871. DOI: 10.2967/jnumed.115.169342.
12. Sörensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V. et al. Measuring HER2-receptor expression in metastatic breast cancer using [^{68}Ga]ABY-025 affibody PET/CT. *Theranostics*. 2016;6(2):262–271. DOI: 10.7150/thno.13502.
13. Bragina O., Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandström M., Medvedeva A. et al. Phase I study of ^{99m}Tc -ADAPT6, a scaffold protein-based probe for visualization of HER2 expression in breast cancer. *J. Nucl. Med.* 2021;62(4):493–499. DOI: 10.2967/jnumed.120.248799.
14. Брагина О.Д., Чернов В.И., Гарбуков Е.Ю., Дорошенко А.В., Воробьева А.Г., Орлова А.М. и др. Возможности радионуклидной диагностики Her2-позитивного рака молочной железы с использованием меченных технецием-99m таргетных молекул: первый опыт клинического применения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021;20(1):23–30. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-1-23-30.
15. Брагина О.Д., Чернов В.И., Таширева Л.А., Зельчан Р.В., Медведева А.А., Лукина Н.М. и др. Определение наиболее информативных прогностических параметров для оценки статуса рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu у больных раком молочной железы при использовании таргетного радионуклидного препарата « ^{99m}Tc -ADAPT6». *Вопросы онкологии*. 2021;67(3):368–373. DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-3-368-373.

Вклад авторов

Брагина О.Д., Чернов В.И., Деев С.М., Толмачев В.М. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Таширева Л.А. – статистическая обработка материала.

Информация об авторах

Брагина Ольга Дмитриевна – д-р мед. наук, врач-онколог, вед. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; ст. науч. сотрудник, Научно-исследовательский центр «Онкотераностика», НИ ТПУ, г. Томск, bragina_od@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5281-7758>

Таширева Любовь Александровна – д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, tashireva@oncology.tomsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

Чернов Владимир Иванович – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, руководитель отделения радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, chernov@tnimc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5524-9546>

Деев Сергей Михайлович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, руководитель отделения молекулярной иммунологии, ИБХ РАН, г. Москва, deev_sm@tpu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3952-0631>

Толмачев Владимир Максимилианович – профессор, руководитель лаборатории иммунологии, генетики и патологии, Уппсальский университет, г. Уппсала; руководитель, Научно-исследовательский центр «Онкотераностика», НИ ТПУ, г. Томск, Vladimir.tolmachev@igp.uu.se, <https://orcid.org/0000-0002-6122-1734>

(✉) Брагина Ольга Дмитриевна, bragina_od@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.2021;
одобрена после рецензирования 08.02.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 615.273.2:547.992

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-13-19>

Оценка влияния железосодержащих субстанций на основе гуминовых веществ на гематологические показатели на модели острой постгеморрагической и алиментарной анемии

Братишко К.А.¹, Логвинова Л.А.¹, Иванов В.В.¹, Жиркова А.М.², Уфандеев А.А.¹, Буйко Е.Е.¹, Зима А.П.¹, Рабцевич Е.С.^{1,3}, Кузнецова М.В.¹, Белоусов М.В.¹, Перминова И.В.², Зыкова М.В.¹

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

² Московский государственный университет (МГУ) им. М.В. Ломоносова
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить степень влияния железосодержащих субстанций на основе гуминовых веществ на гематологические показатели при острой постгеморрагической и алиментарной анемии.

Материалы и методы. Образцы железосодержащих активных фармацевтических субстанций на основе гуминовых веществ (комплексы гидроксида Fe(III) с гуминовыми веществами и полимальтозатом): ГК-Fe³⁺, ГК-ПМ-Fe³⁺, ФК-Fe³⁺ и ФК-ПМ-Fe³⁺. Противоанемическая активность субстанций исследована на 53 самках крыс линии Вистар конвенциональной категории на модели острой постгеморрагической и алиментарной анемии. Противоанемическая активность оценена по показателям: уровень гемоглобина, содержание эритроцитов, гематокрит и уровень сывороточного железа.

Результаты. Исследуемые вещества ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺ являются наиболее эффективными в коррекции последствий как экспериментальной острой постгеморрагической анемии, так и алиментарной анемии. Их эффект сопоставим с препаратом положительного контроля «Феррум Лек».

Заключение. Комплексы гидроксида Fe(III), стабилизированные гуминовыми кислотами и фульвокислотами, проявляют антианемическую активность.

Ключевые слова: острая постгеморрагическая анемия, железодефицитная анемия, гуминовые вещества, лиганды, комплексы гидроксида Fe(III)

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства здравоохранения РФ (№ 056-00071-22-02).

Соответствие принципам этики. Эксперименты на животных соответствуют этическим нормам и принципам биомедицинских исследований и одобрены этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8461/1 от 05.11.2020).

Для цитирования: Братишко К.А., Логвинова Л.А., Иванов В.В., Жиркова А.М., Уфандеев А.А., Буйко Е.Е., Зима А.П., Рабцевич Е.С., Кузнецова М.В., Белоусов М.В., Перминова И.В., Зыкова М.В. Оценка

ка влияния железосодержащих субстанций на основе гуминовых веществ на гематологические показатели на модели острой постгеморрагической и алиментарной анемии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):13–19. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-13-19>.

Assessment of the effect of iron-rich humic substances on hematological parameters in the model of acute posthemorrhagic and iron deficiency anemia

Bratishko K.A.¹, Logvinova L.A.¹, Ivanov V.V.¹, Zhirkova A.M.², Ufandeew A.A.¹, Buyko E.E.¹, Zima A.P.¹, Rabceovich E.S.^{1,3}, Kuznecova M.V.¹, Belousov M.V.¹, Perminova I.V.², Zykova M.V.¹

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University

1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

³ National Research Tomsk State University

36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To assess the effect of iron-rich humic substances on hematological parameters in acute post-hemorrhagic and iron deficiency anemia.

Materials and methods. Materials for the study were samples of iron-rich active pharmaceutical ingredients based on humic substances (Fe(III) hydroxide complexes with humic substances and polymaltose): HA-Fe³⁺, HA-PM-Fe³⁺, FA-Fe³⁺, and FA-PM-Fe³⁺. The anti-anemic activity of the substances was studied on 53 female Wistar rats of the conventional rat line in the model of acute posthemorrhagic and iron deficiency anemia. Anti-anemic activity was assessed by the hemoglobin level, erythrocyte count, hematocrit, and serum iron level.

Results. The studied substances HA-Fe³⁺ and FA-Fe³⁺ are the most effective in correcting the consequences of both experimental acute posthemorrhagic anemia and iron deficiency anemia. Their effect is comparable to that of the positive control drug Ferrum Lek.

Conclusion. Fe(III) hydroxide complexes stabilized by humic and fulvic acids exhibit anti-anemic activity.

Keywords: acute posthemorrhagic anemia, iron deficiency anemia, humic substances, ligands, Fe(III) hydroxide complexes

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 carried out within the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (No. 056-00071-22-02).

Conformity with the principles of ethics. The protocol of animal experiments complies with the ethical standards and principles of biomedical research and was approved by the Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 8461/1 of 05.11.2020).

For citation: Bratishko K.A., Logvinova L.A., Ivanov V.V., Zhirkova A.M., Ufandeew A.A., Buyko E.E., Zima A.P., Rabceovich E.S., Kuznecova M.V., Belousov M.V., Perminova I.V., Zykova M.V. Assessment of the effect of iron-rich humic substances on hematological parameters in the model of acute posthemorrhagic and iron deficiency anemia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):13–19. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-13-19>.

ВВЕДЕНИЕ

Большая распространенность железа в природе в целом и в организме живых существ в частности (кофактор более чем 70 металлоэнзимов и порфиринов), электронодонорные и электроноакцепторные свойства ионов, участие в сложных метаболических путях (гемопоз, гликолиз, клеточное дыхание, детоксикация и т.д.) – свидетельство высокой биологической ценности и значимости данного переходного металла и его соединений [1–3]. Снижение уровня «функционального железа» (главным образом, в составе гемоглобина), а также железа макрофагов и гепатоцитов способствует возникновению такого патологического состояния, как железодефицитная анемия (ЖДА), которое, по данным Всемирной организации здравоохранения, диагностируется практически у каждого десятого жителя земного шара [4–7].

Клиническая значимость ЖДА связана не только с «пандемической» распространенностью, но и с неблагоприятным влиянием на состояние наиболее уязвимых к данному заболеванию возрастных групп – детей, женщин репродуктивного возраста, беременных, пожилых [3–15]. В анамнезе у них регистрируются отставание в росте, гидропсия, преждевременные и осложненные роды, воспалительные процессы, снижение физической активности и трудоспособности, нарушение когнитивных процессов, интеллектуальной деятельности и т.д. [6, 7, 10].

Одним из основополагающих принципов терапии сидеропении, сформулированным еще в 1980-х гг. Л.И. Идельсоном [3], отраженным также в национальных «Клинических рекомендациях. Железодефицитная анемия» 2020 г., является проведение длительной терапии пероральными препаратами железа [3]. Более того, отмена препаратов не должна завершаться на фоне восстановления уровня гемоглобина и эритроцитов. Она должна быть продолжена до восстановления запасов железа в скорректированной дозе и длиться еще не менее 6 мес.

В настоящее время фармацевтический рынок располагает более чем 30 наименованиями монокомпонентных и комбинированных лекарственных препаратов (ЛП) двухвалентного (главным образом, сульфата) и трехвалентного железа (гидроксид-полимальтозный комплекс) и около 70 поливитаминными комплексами [3]. Ввиду различного химического строения ферропрепараты могут существенно различаться показателями биодоступности. Всасывание Fe(II) (в виде сульфата, фумарата) происходит по градиенту концентрации в интестинальной области (пассивная диффузия) и превышает скорость адсорбции Fe(III), что в конечном счете может повысить уровень сывороточного Fe^{2+} и стать причиной

интенсификации окислительных процессов (оксидативный стресс в желудочно-кишечном тракте наблюдается более чем у 20% пациентов) [3, 6, 8, 10].

Более того, проявляются такие нежелательные лекарственные реакции, как эритема, металлический привкус в ротовой полости (вплоть до изъязвления слизистой), потемнение зубной эмали и десен, диспепсические расстройства (тошнота, рвота, диарея, обстипация и т.д.), боли в эпигастрии [3, 10]. Низкая усвояемость ионов трехвалентного железа связана со способностью гидролизаться в желудочно-кишечном тракте с образованием преципитата. Перспективной молекулой среди соединений Fe(III) является гидроксид-полимальтозный комплекс Fe(III) (действующее вещество таких ЛП, как «Феррум Лек», «Мальтофер», «Феринжент»). Мембрану эритроцитов оно преодолевает посредством активного транспорта, поэтому снижается риск развития сидероза [6]. Более того, оно пребывает в редокс-инертном состоянии, не взаимодействует с компонентами пищи и другими ЛП [4]. Единственным его недостатком является появление аллергических реакций вплоть до развития анафилактического шока [3, 8]. Поэтому имеется острая необходимость поиска новых перспективных лигандов для ионов Fe(III), применяющихся в профилактических и терапевтических целях при манифестной стадии железодефицита, к которым относятся гуминовые вещества (ГВ) [16–23].

Гуминовые вещества представляют биодеструктивно устойчивые полидисперсные сополимеры, являющиеся носителями большого количества функциональных групп – карбоксильных, фенольных, хиноидных, амидных, сложно- и простых эфирных и др. [16]. Полифункциональность, развитая внутренняя поверхность, следовательно, и высокая реакционная активность (способность участвовать в ионных, окислительно-восстановительных реакциях, ван-дер-ваальсовых взаимодействиях и др.) определили тропность ГВ к клеткам разных органов и систем, а природное происхождение – безопасность, отсутствие токсических свойств в широких концентрациях, мягкое воздействие на метаболические процессы на клеточном, органном и системном уровнях. Ввиду этого ГВ применяются в качестве гепатопротекторов, противовоспалительных, иммуномодулирующих [17], антигипоксантных, антиоксидантных [18, 19], детоксикационных, противоаллергических средств [20].

Одной из причин, объясняющих повышенный интерес к многопрофильному изучению данного класса природных биомолекул, является способность ГВ за счет электронодонорных групп выступать в качестве полидентантных лигандов и замедлять миграцию металлов-токсикантов в природных биосредах. При

этом в ряде работ установлена высокая корреляционная зависимость между токсичностью металла и степенью его связывания гуминовыми веществами [21, 22]. То есть ГВ могут выступать не только в качестве эффективных хелатных сорбентов [23], но и играть роль носителей биогенных металлов, в частности железа, в легкодоступной комплексной форме, что наряду с отсутствием в организме ферментативных систем, их метаболизирующих, способствует пролонгации терапевтического эффекта.

Целью настоящего исследования явилась оценка степени влияния железосодержащих активных фармацевтических субстанций (АФС) на основе комплексов гидроксида Fe(III) с ГВ на гематологические показатели на модели острой постгеморрагической и алиментарной анемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные образцы железосодержащих АФС на основе ГВ (комплексы гидроксида Fe(III) с ГВ и полимальтозатом) были синтезированы на базе лаборатории природных гуминовых систем кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: ГК-Fe³⁺ (с гуматом калия), ГК-ПМ-Fe³⁺ (с гуматом калия и полимальтозатом (1:1)), ФК-Fe³⁺ (с фульвокислотами) и ФК-ПМ-Fe³⁺ (с фульвокислотами и полимальтозатом (1:1)). Первый этап исследования – скрининг антианемических свойств веществ с целью поиска наиболее эффективных кандидатных препаратов для коррекции острой постгеморрагической анемии (ОПА) выполнен на 30 самках крыс линии Вистар конвенциональной категории массой 270–310 г. Содержание, уход и обращение с животными осуществляли в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов. Эксперименты, осуществленные в рамках текущего исследования, соответствовали этическим нормам и принципам биомедицинских исследований и были одобрены этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8461/1 от 05.11.2020).

Животные на первом этапе были рандомизированы на шесть экспериментальных групп, в каждой из которых ОПА была вызвана кровопотерей (объем образца отобранной биожидкости составлял 1,5% от массы тела) [24]. Для расчета дозы вводимого железа проводили межвидовой перенос доз [25]. Животным первой группы (контроль, $n = 5$) в течение 5 сут после острой кровопотери ежедневно внутрижелудочно вводили очищенную воду в объеме $1 \pm 0,1$ мл. Вторая группа внутрижелудочно получала референтный препарат – сироп «Феррум Лек» (Словения) в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо ($n = 5$ – положительный контроль, контроль-3). Животным

третьей, четвертой, пятой и шестой групп ($n = 5$) в течение 5 сут ежедневно внутрижелудочно вводили железосодержащие АФС на основе ГВ (ГК-Fe³⁺, ГК-ПМ-Fe³⁺, ФК-Fe³⁺, ФК-ПМ-Fe³⁺ соответственно) в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо. Кровь из хвостовой вены у животных всех групп отбирали на 6-е сут (эвтаназия – удушье CO₂). Далее биологический материал подвергали гематологическому анализу по показателям: уровень гемоглобина (HGB), г/л; содержание эритроцитов (RBC), $\times 10^3$ /мкл; гематокрит (HCT), %. Содержание железа в сыворотке определяли спектрофотометрически (реактивы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), спектрофотометр СФ-2000 (Россия)).

На втором этапе исследования изучали влияние наиболее эффективных препаратов на основе ГВ, выявленных в ходе первого эксперимента, на течение ЖДА. Для эксперимента было задействовано 23 самки крыс линии Вистар конвенциональной категории массой 216–256 г. В течение 4,5 мес часть животных (пять особей) имела неограниченный доступ к полнорационному корму с обычным содержанием железа (76,8 мкг/г), остальные 18 самок имели *ad libitum* питание с низким содержанием данного микроэлемента (28,2 мкг/г). По прошествии 4,5 мес у всех животных установили основные гематологические показатели (см. выше). После этого пяти животным на протяжении 14 сут внутрижелудочно вводили очищенную воду в объеме $1 \pm 0,1$ мл. Остальные животные с развившейся у них анемией разделили на три группы ($n = 6$). В последующие 2 нед эксперимента они продолжали получать рацион с низким содержанием железа на фоне ежедневного внутрижелудочного введения референтного препарата – сиропа «Феррум Лек», ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺ соответственно. Содержание железа в препарате «Феррум Лек», ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺ составило 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо. После этого отбирали кровь из хвостовой вены (удушьем CO₂) и устанавливали морфологические и биохимические показатели (см. выше).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Использовали методы непараметрической статистики: критерии Фридмана и Краскела – Уоллиса. Для каждой выборки вычисляли среднее значение величины признака X и ошибку средней величины SE . Различия между наблюдениями/группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа данных установлено, что острая кровопотеря у крыс контрольной группы привела к падению исследуемых гематологических по-

казателей. При этом данные показатели при применении очищенной воды в продолжении эксперимента не достигли соответствующих исходных значений. У группы лабораторных животных положительного контроля (после ОПГА получали референтный пре-

парат «Феррум Лек») наблюдали значительное увеличение показателей содержания HGB, HCT, уровня RBC по сравнению с животными группы контроля, однако повышения показателей до исходного уровня также не было достигнуто ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Показатели клинического лабораторного анализа крови после 5-х сут эксперимента, $X \pm SE$								
Группа	До курсового введения (контроль-1)				После курсового введения			
	HGB, г/л	HCT, %	RBC, $\times 10^3/\text{мкл}$	Fe, мкМ/л	HGB, г/л	HCT, %	RBC, $\times 10^3/\text{мкл}$	Fe, мкМ/л
Вода, $n = 5$ (контроль-2)	176,9 $\pm$ 2,0	45,1 $\pm$ 0,8	8,1 $\pm$ 0,1	61,7 $\pm$ 2,2	149,4 $\pm$ 2,1*	43,2 $\pm$ 0,5*	7,4 $\pm$ 0,1*	47,3 $\pm$ 1,7*
«Феррум Лек», $n = 5$ (контроль-3)	189,4 $\pm$ 5,3	46,6 $\pm$ 1,8	8,5 $\pm$ 0,4	64,0 $\pm$ 8,9	158,4 $\pm$ 6,9*	45,8 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 0,3	44,4 $\pm$ 2,9
ГК-Fe ³⁺ , $n = 5$	178,8 $\pm$ 3,9	47,0 $\pm$ 2,3	8,4 $\pm$ 0,4	74,4 $\pm$ 6,4	158,4 $\pm$ 7,1*	45,8 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 0,4	51,6 $\pm$ 5,8*
ГК-ПМ-Fe ³⁺ , $n = 5$	191,1 $\pm$ 13,3	43,6 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 0,3	56,3 $\pm$ 7,0	146,0 $\pm$ 2,9*	42,6 $\pm$ 0,8	7,1 $\pm$ 0,3	38,8 $\pm$ 7,3
ФК-Fe ³⁺ , $n = 5$	182,1 $\pm$ 6,1	43,9 $\pm$ 3,5	7,9 $\pm$ 0,6	60,6 $\pm$ 2,2	145,3 $\pm$ 8,4*	42,6 $\pm$ 2,3	7,2 $\pm$ 0,6	48,0 $\pm$ 7,1
ФК-ПМ-Fe ³⁺ , $n = 5$	172,1 $\pm$ 3,0	43,5 $\pm$ 2,8	7,9 $\pm$ 0,4	58,7 $\pm$ 3,9	143,6 $\pm$ 6,8*	41,4 $\pm$ 1,9	7,1 $\pm$ 0,4	51,1 $\pm$ 4,4

* $p < 0,05$ с группой контроль-1 (критерий Фридмана); # $p < 0,05$ с группой контроль-2 (критерий Краскела – Уоллиса); ^ $p < 0,05$ с группой контроль-3 (критерий Краскела – Уоллиса).

Ежедневное внутрижелудочное введение исследуемых АФС в дозе 17 мг/кг в течение 5 сут после моделирования ОПГА также приводило к частичной нормализации гематологических показателей. Следует отметить, что исследуемые вещества ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺ при курсовом внутрижелудочном введении продемонстрировали большую эффективность в коррекции последствий экспериментальной ОПГА в сравнении с образцами железосодержащих АФС ГК-ПМ-Fe³⁺ и ФК-ПМ-Fe³⁺, что выражалось в более значительном повышении уровней исследуемых гематологических показателей. При этом все исследуемые образцы железосодержащих АФС на основе ГВ действуют подобно препарату положительного контроля «Феррум Лек», что приводит к эффективной нормализации гематологических показателей лабораторных животных. Значимых отличий между эффективностью исследуемых веществ, а также референтного препарата не обнаружено.

Ежедневное внутрижелудочное введение АФС ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺, а также препарата сравнения «Феррум Лек» в течение 14 сут в дозе 17 мг/кг в пересчете на элементарное железо приводило к восстановлению концентраций сывороточного железа до исходных значений ($p < 0,05$) (табл. 2). Следует отметить, что курсовое введение АФС ГК-Fe³⁺ увеличивало концентрацию сывороточного железа по сравнению с «Феррум Лек» в виде устойчивой тенденции ($p > 0,05$) (см. табл. 2). Однако введение исследуемых веществ и препарата сравнения в течение 14 сут не позволило достичь восстановления концентрации гемоглобина и уровня гематокрита до контрольных значений ($p < 0,05$) (см. табл. 2). Также следует отметить, что курсовое 14-кратное введение препарата «Феррум Лек», ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺ в дозе 17 мг/кг не оказывало влияния на массу тела крыс, абсолютную и относительную массу печени и селезенки в модели алиментарной анемии ($p > 0,05$).

Таблица 2

Показатели клинического лабораторного анализа крови после 14-х сут эксперимента, $X \pm SE$								
Группа	После моделирования анемии				После курсового введения			
	HGB, г/л	HCT, %	RBC, $\times 10^6/\text{мкл}$	Fe, мкМ	HGB, г/л	HCT, %	RBC, $\times 10^6/\text{мкл}$	Fe, мкМ
Вода, $n = 5$	198,8 $\pm$ 3,2	59,6 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 0,2	64,5 $\pm$ 1,6	197,8 $\pm$ 4,5^	59,5 $\pm$ 1,7^	9,7 $\pm$ 0,3	67,3 $\pm$ 1,1
«Феррум Лек», $n = 6$	170,6 $\pm$ 6,7	51,1 $\pm$ 2,2	10,0 $\pm$ 0,4	25,4 $\pm$ 5,8	169,6 $\pm$ 3,2#	50,3 $\pm$ 0,9#	9,5 $\pm$ 0,3	60,6 $\pm$ 8,0*
ГК-Fe ³⁺ , $n = 6$	180,8 $\pm$ 5,7	53,6 $\pm$ 1,7	10,0 $\pm$ 0,4	34,1 $\pm$ 3,7	172,0 $\pm$ 1,9#	51,3 $\pm$ 0,6#	9,4 $\pm$ 0,1	75,0 $\pm$ 6,7*
ФК-Fe ³⁺ , $n = 6$	164,8 $\pm$ 11,7	50,1 $\pm$ 3,3	10,2 $\pm$ 0,5	20,4 $\pm$ 5,5	166,0 $\pm$ 1,7#	49,7 $\pm$ 0,7#	9,3 $\pm$ 0,2	62,3 $\pm$ 7,9*

* $p < 0,05$ с группой «После моделирования анемии» (критерий Фридмана); # $p < 0,05$ с группой «Вода» (критерий Краскела – Уоллиса); ^ $p < 0,05$ с группой «Феррум Лек» (критерий Краскела – Уоллиса).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено, что ежедневное внутривенное введение исследуемых АФС после моделирования ОПГА способствовало частичной нормализации гематологических показателей. Среди исследуемых четырех образцов наиболее выражено повышают гемоглобиновый фонд, эритроцитоз и сывороточное железо два железосодержащих образца АФС: ГК-Fe³⁺ и ФК-Fe³⁺. При этом действие всех образцов железосодержащих АФС на основе ГВ подобно препарату положительного контроля «Феррум Лек» (значимых отличий между эффективностью исследуемых веществ, а также референтного препарата не обнаружено).

На модели хронической алиментарной анемии показана антианемическая активность комплексов гидроксида Fe(III), стабилизированных гуминовыми кислотами и фульвокислотами. При этом обе активные фармацевтические субстанции (ГК-Fe³⁺, матрица которой представлена 100% гуматом калия, и ФК-Fe³⁺, матрица которой представлена 100% фульвокислотами) проявляют сопоставимую активность. Полученные результаты подтверждают перспективность использования ГВ в качестве лигандов с целью получения АФС для нормализации железодефицитных состояний.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Левина А.А., Цибульская М.М., Минина Л.Т., Цветаева Н.В. Соотношение между основными микроэлементами (Fe, Cu, Zn) при анемиях различной этиологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;7:45–48.
2. Powers J.M., Buchanan G.R., Adix L., Zhang S., Gao A., McCavit T.L. Effect of low-dose ferrous sulfate vs iron polysaccharide complex on hemoglobin concentration in young children with nutritional iron-deficiency anemia. *JAMA*. 2017;137(22):2297–2304. DOI: 10.1001/jama.2017.6846.
3. Чилова Р.А., Мурашко А.В., Вечорко В.И., Чушков Ю.В., Королев В.С. Профилактика и лечение железодефицитных состояний у беременных и кормящих женщин. *РМЖ. Мать и дитя*. 2017;15:1092–1095.
4. Атаджанян А.С., Зайнулина М.С., Малаховская Е.А. Сравнительная эффективность внутривенных и таблетированных препаратов железа у беременных с анемией. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2019;68(2):23–32.
5. Jose A., Mahey R., Sharma J.B., Bhatla N., Saxena R., Kailani M. et al. Comparison of ferric carboxymaltose and iron sucrose complex for treatment of iron deficiency anemia in pregnancy- randomised controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1):54. DOI: 10.1186/s12884-019-2200-3.
6. Lepanto M.S., Luigi R., Cutone A., Conte M.P., Paesano R., Valenti P. Efficacy of lactoferrin oral administration in the treatment of anemia and anemia of inflammation in pregnant and non-pregnant women: an interventional study. *Front Immunol*. 2018;9:2121. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02123.
7. Lasocki S., Asfar P., Jaber S., Ferrandiere M., Kerforne T., Asehnoune K. et al. Impact of treating iron deficiency, diagnosed according to hepcidin quantification, on outcomes after a prolonged ICU stay compared to standard care: a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Crit. Care*. 2021;25(1):62. DOI: 10.1186/s13054-020-03430-3.
8. Cappellini M.D., Musallam K.M., Taher A.T. Iron deficiency anaemia revisited. *J. Intern. Med*. 2020;287(2):153–170. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.09012.x10.1111/joim.13004.
9. Кононова С.В., Кузин В.Б., Ловцова Л.В., Зуева И.А., Ганенков А.А. Фармакологические и клинко-экономические аспекты применения лекарственных препаратов железа (обзор). *Медицинский альманах*. 2010;3(12):197–201.
10. Гороховская Г.Н., Юн В.Л. Железодефицитные состояния в практике терапевта. Особенности дефицита железа и профилактики железодефицитных анемий. *Медицинский совет*. 2014;2:85–92.
11. Андреичев Н.А., Андреичева Е.Н. Дифференциальная диагностика анемий, связанных с обменом железа. *Российский медицинский журнал*. 2016;22(4):213–221.
12. Лукина Е.А., Ледина А.В., Роговская С.И. Железодефицитная анемия: взгляд гематолога и гинеколога. Оптимизируем диагностику и лечебную тактику. *РМЖ. Мать и дитя*. 2020;3(4):248–253.
13. Савченко Т.Н., Агаева М.И. Анемия и беременность. *РМЖ. Мать и дитя*. 2016;15:971–975.
14. Струтинский А.В. Диагностика и лечение железодефицитных анемий. *Трудный пациент*. 2013;11(12):38–43.
15. Егорова Н.А., Канатникова Н.В. Железо, его метаболизм в организме человека и гигиеническое нормирование в питьевой воде. Обзор литературы. Часть 1. *Гигиена и санитария*. 2020;99(4):412–417.
16. Perminova I.V. From green chemistry and nature-like technologies towards ecoadaptive chemistry and technology. *Pure Appl. Chem*. 2019;91(5):851–864. DOI: 10.1515/pac-2018-1110.
17. Trofimova E.S., Danilets M.G., Ligacheva A.A., Sherstoboev E.Y., Zykova M.V., Tsupko A.V. et al. Immunomodulating properties of humic acids extracted from oligotrophic sphagnum magellanicum peat. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;170(4):461–465. DOI: 10.1007/s10517-021-05088-5.
18. Братишко К.А., Зыкова М.В., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Дрыгунова Л.А., Перминова И.В. и др. Гуминовые кислоты торфа – перспективные биологически активные вещества с антиоксидантной активностью для разработки протекторных средств. *Химия растительного сырья*. 2021;1:287–298.
19. Zykova M.V., Logvinova L.A., Bratishko K.A., Yusubov M.S., Romanenko S.V., Schepetkin I.A. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules*. 2018;23(4):753. DOI: 10.3390/molecules23040753.
20. Trofimova E.S., Ligacheva A.A., Danilets M.G., Sherstoboev E.Y., Zykova M.V., Logvinova L.A. et al. Anti-allergic properties of humic acids isolated from pine-sphagnum-cotton sedge peat. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022;172(3):324–327. DOI: 10.1007/s10517-022-05385-7.

21. Аввакумова Н.П. Гуминовые вещества – фактор защиты биосистем от экотоксикантов. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2009;11(1-2):197–201.
22. Буйко Е.Е., Зыкова М.В., Иванов В.В., Братишко К.А., Уфандеев А.А., Григорьева И.О. и др. Антиоксидантная активность серебросодержащих бионанокмпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):46–53.
23. Панкратов Д.А., Анучина М.М., Константинов А.И., Перминова И.В. Анализ динамики взаимодействия веществ угля с металлическим железом. *Журнал физической химии*. 2019;93(7):992–1001.
24. Остроушко А.А., Тонкушина М.О., Гагарин И.Д., Гржегоржевский К.В., Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ коррекции постгеморрагической анемии. Патент РФ. 2018: 2671077 С1.
25. Шекунова Е.В., Ковалева М.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(1):19–28.

Вклад авторов

Братишко К.А., Уфандеев А.А., Буйко Е.Е., Рабцевич Е.С., Кузнецова М.В. – проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных. Логвинова Л.А. – анализ и интерпретация полученных данных, составление черновика рукописи. Иванов В.В. – формулировка цели и задач, проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных. Жиркова А.М. – синтез и модификация исследуемых соединений. Зима А.П., Белоусов М.В. – формулировка цели и задач, анализ и интерпретация полученных данных. Перминова И.В. – формирование идеи, синтез и модификация исследуемых соединений. Зыкова М.В. – формирование идеи, формулировка цели и задач, критический пересмотр и внесение замечаний в рукопись, презентация опубликованной работы.

Информация об авторах

Братишко Кристина Александровна – ст. преподаватель, кафедра химии, СибГМУ, г. Томск, kr-1295@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6571-4061>

Логвинова Людмила Анатольевна – канд. хим. наук, ст. преподаватель, кафедра химии, СибГМУ, г. Томск, ludmila_logvinova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0167-7043>

Иванов Владимир Владимирович – канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, СибГМУ, г. Томск, ivanovvv1953@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-9348-4945>

Жиркова Анастасия Михайловна – мл. науч. сотрудник, научно-исследовательская лаборатория природных гуминовых систем, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, nastya12349@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6571-4061>

Уфандеев Александр Анатольевич – мл. науч. сотрудник, Центр доклинических исследований, СибГМУ, г. Томск, ufandeev@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3837-1179>

Буйко Евгений Евгеньевич – лаборант, Центра доклинических исследований, СибГМУ, г. Томск, Россия, buykoevgen@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6714-1938>

Зима Анастасия Павловна – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, zima2302@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-9034-7264>

Рабцевич Евгения Сергеевна – канд. хим. наук, ассистент, кафедра химии, СибГМУ; инженер-исследователь, испытательная лаборатория «Аналитический центр геохимии и природных систем», НИ ТГУ, г. Томск, Россия, evgenia882-a@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9275-4453>

Кузнецова Мария Викторовна – студентка, 6-й курс, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск, mary35889@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2446-9108>

Белоусов Михаил Владимирович – д-р фармацевт. наук, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск, mvb63@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2153-7945>

Перминова Ирина Васильевна – д-р хим. наук, профессор, зав. научно-исследовательской лабораторией природных гуминовых систем, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, ipermimova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-9084-7851>

Зыкова Мария Владимировна – д-р фармацевт. наук, доцент, зав. кафедрой химии, СибГМУ, г. Томск, Россия, gmv2@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1973-8983>

(✉) Логвинова Людмила Анатольевна, ludmila_logvinova@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.2021;
одобрена после рецензирования 08.02.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616.151.511: 615.273.5:616.153.962.4]-092.4

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-20-28>

Сравнительный анализ предрасположенности к тромбообразованию при применении известных системных гемостатических средств и фибрин-мономера в эксперименте

Вдовин В.М.¹, Шахматов И.И.¹, Момот А.П.^{1,2}

¹ Алтайский государственный медицинский университет (АГМУ)

Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

² Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) гематологии (Алтайский филиал)

Россия, 656045, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1/2

РЕЗЮМЕ

Цель. Провести сравнительную оценку предрасположенности к тромбообразованию, обусловленную применением известных системных гемостатических средств и фибрин-мономера в условиях нормокоагуляции и на фоне фармакологически индуцированной гипокоагуляции в эксперименте.

Материалы и методы. В сериях экспериментов *in vivo* сопоставляли протромботический эффект внутривенного введения различных системных гемостатических препаратов. В их числе использовались фибрин-мономер (ФМ) (0,25 мг/кг), концентрат факторов протромбинового комплекса (КФПК) (40 МЕ/кг) или рекомбинантный фактор VIIa (rFVIIa) (270 мкг/кг). Исследования проводились на фоне гипокоагуляции, обусловленной приемом варфарина (*per os* в дозе 0,4–0,5 мг/кг/сут на протяжении 14 сут) или дабигатрана этексилата (*per os* в разовой дозе 15–20 мг/кг). Оценивали показатели системы гемостаза, включая проведение тромбоэластометрии и калиброванной тромбографии.

Результаты. Установлено, что в группах животных с индуцированной варфарином коагулопатией КФПК реверсировал эффекты антикоагулянта, но приводил к сверхкомпенсированному усилению плотностных характеристик сгустка крови наряду с избыточным усилением генерации тромбина. Использование КФПК и rFVIIa в группах животных с гипокоагуляцией, вызванной приемом дабигатрана, также приводило к нарастанию тромбогенных свойств крови. Это иллюстрировалось в случаях использования КФПК увеличением уровня D-димера, а применения rFVIIa – усилением плотностных характеристик сгустка. В то же время замена данных гемостатиков на ФМ не отражалась на показателях системы гемостаза.

Заключение. ФМ в дозе 0,25 мг/кг в сравнении с КФПК и rFVIIa более безопасен с позиции риска возникновения внутрисосудистого тромбообразования.

Ключевые слова: тромбообразование, гипокоагуляция, концентрат факторов протромбинового комплекса, эптаког альфа (активированный), фибрин-мономер, варфарин, дабигатрана этексилат

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

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет средств гранта РФФИ (№ 18-415-220001), при финансовой поддержке ООО «Технология-Стандарт» и Алтайского государственного медицинского университета.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета (протокол № 12 от 12.11.2015).

Для цитирования: Вдовин В.М., Шахматов И.И., Момот А.П. Сравнительный анализ предрасположенности к тромбообразованию при применении известных системных гемостатических средств и фибрин-мо-

Comparative study of predisposition to thrombosis with administration of known systemic hemostatic agents and fibrin monomer in the experiment

Vdovin V.M.¹, Shakhmatov I.I.¹, Momot A.P.^{1,2}

¹ Altai State Medical University (ASMU)

40, Lenina Av., Barnaul, 656038, Russian Federation

² Altai Branch of the National Research Center for Hematology

1/2, Lyapidevskogo Str., Barnaul, 656045, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To compare predisposition to thrombosis caused by administration of known systemic hemostatic agents and fibrin monomer under the conditions of normal coagulation versus drug-induced hypocoagulation in the experiment.

Materials and methods. The prothrombotic effect of intravenous (IV) administration of various systemic hemostatic agents was compared in a series of *in vivo* experiments. These agents included fibrin monomer (FM) (0.25 mg / kg), prothrombin complex concentrate (PCC) (40 IU / kg) or recombinant factor VIIa (rFVIIa) (270 mcg / kg). The studies were conducted under the conditions of hypocoagulation induced by the administration of warfarin (*per os* at a dose of 0.4–0.5 mg / kg / day for 14 days) or dabigatran etexilate (*per os* at a single dose of 15–20 mg / kg). Hemostatic system parameters were evaluated using thromboelastometry and calibrated automated thrombography.

Results. It was found that PCC reversed anticoagulant effects and led to an overcompensated increase in the density characteristics of the blood clot along with an excessive increase in thrombin generation in the groups of animals with warfarin-induced coagulopathy. The use of PCC and rFVIIa in the groups of animals with dabigatran-induced hypocoagulation also resulted in an increase in blood thrombogenic properties. In the administration of PCC, it was manifested though an increased D-dimer level and in administration of rFVIIa – through an increase in the clot density characteristics. At the same time, replacement of these hemostatic agents with FM did not affect the hemostatic system parameters.

Conclusion. FM at a dose of 0.25 mg / kg, as opposed to PCC and rFVIIa, is safer in terms of the risk of thrombosis.

Keywords: thrombosis, hypocoagulation, prothrombin complex concentrate, Eptacog alfa (activated), fibrin monomer, warfarin, dabigatran etexilate

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 grant of the Russian Foundation for Basic Research (No. 18-415-220001), Technology Standard LLC, and ASMU.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Altai State Medical University (Protocol No. 12 of 12.11.2015).

For citation: Vdovin V.M., Shakhmatov I.I., Momot A.P. Comparative study of predisposition to thrombosis with administration of known systemic hemostatic agents and fibrin monomer in the experiment. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):20–28. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-20-28>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клинической практике доступен целый спектр системных гемостатических средств, обладающих известным механизмом действия [1]. К ним можно отнести препараты тромбозитов, фибриноген, а также обогащенный этим

белком криопреципитат, концентрат факторов протромбинового комплекса (КФПК), факторы VIII и IX, эптакког альфа (активированный) – он же рекомбинантный фактор VIIa (rFVIIa), антиингибиторный коагулянтный комплекс (Feiba), транексамовую кислоту и ряд других. Отмеченные гемостатики востребованы в практической медицине для профилактики

геморрагического синдрома или управления течением при травмах, обширных операциях, в том числе на фоне тромбопрофилактики. Отмечается, что их использование в целом приводит к смещению гемостатического равновесия в сторону усиления процессов свертывания крови, что и обеспечивает гемостатический эффект [2].

К приоритетным условиям для выбора тех или иных лекарственных препаратов, оказывающих влияние на систему гемостаза, наряду с эффективностью действия является безопасность их применения. Известно, что востребование ряда системных гемостатиков (в соответствии с рекомендованными дозами) сопряжено с риском развития венозных или артериальных тромбозов в связи с возможным избыточным нарастанием гемостатического потенциала.

Ранее нами были проведены оригинальные исследования, показавшие наличие самостоятельной гемостатической активности экзогенно введенного препарата фибрин-мономера (ФМ) на модели экспериментальной дозированной травмы печени [3]. Аналогичные результаты были получены на той же модели с фармакологически обусловленной гипокоагуляцией [4, 5]. По результатам вышеотмеченных исследований ФМ не уступал по эффективности как rFVIIa, так и КФПК. В данных публикациях акцент делался на сравнении результативности перечисленных препаратов с ФМ, а вопросы безопасности (с точки зрения риска тромбообразования) остались без анализа и обсуждения. Очевидно, что этот серьезный аспект должен быть рассмотрен при дополнительном анализе, предусматривающем оценку вероятности появления состояния так называемой тромботической готовности, характеризующегося соответствующими изменениями со стороны системы гемостаза [6].

В связи с этим целью данного исследования явилось проведение сравнительной оценки предрасположенности к тромбообразованию, обусловленной применением известных системных гемостатических средств и фибрин-мономера в условиях нормокоагуляции и на фоне фармакологически индуцированной гипокоагуляции в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные были получены на 94 здоровых самцах кроликов породы шиншилла массой 3,0–4,5 кг, содержащихся в стандартных условиях вивария. Из животных методом блочной рандомизации было сформировано семь групп. Эксперименты на животных проводили в соответствии с Европейской конвенцией и директивами по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте 86/609/ЕЕС, а

также Хельсинкской декларацией и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Работа одобрена локальным этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета (протокол № 12 от 12.11.2015).

Животные групп № 1 ($n = 13$), № 2 ($n = 14$) и № 3 ($n = 16$) в начале эксперимента *per os* получали растворенный в воде варфарин (Никомед, Дания) в дозе 0,4–0,5 мг/кг ежедневно на протяжении 14 сут до достижения значений международного нормализованного отношения (МНО) 2,0 и выше. По истечении указанного срока у животных проводили забор крови путем флеботомии из краевой вены уха (самотеком) для исследования системы гемостаза. Далее этим животным осуществляли внутривенное (в/в) введение плацебо в объеме 0,5 мл (3,75 М раствор мочевины, соответствующий ее концентрации в растворе ФМ), КФПК (Протромплекс 600, Baxter, Италия) в дозе 40 МЕ/кг или ФМ в дозе 0,25 мг/кг соответственно. Препарат ФМ получался по оригинальной технологии [7]. Спустя 1 ч после в/в введения плацебо или системного гемостатика осуществляли повторный забор крови.

Животные групп № 4 ($n = 10$), № 5 ($n = 14$), № 6 ($n = 14$) и № 7 ($n = 13$) в начале эксперимента *per os* получали растворенный в воде дабигатрана этексилат (Прадакса®, Boehringer Ingelheim, Германия) в дозе 15–20 мг/кг. Установление дозы препарата для животных с целью достижения достаточного антикоагулянтного эффекта производили с учетом коэффициента пересчета доз с человека на животных [8] и рекомендаций, указанных в инструкции к лекарственному препарату (Прадакса®, регистрационное удостоверение № ЛСР-007065/09). Спустя 2 ч у этих животных забирали кровь для исследования гемостаза и далее в/в вводили плацебо в объеме 0,5 мл, КФПК (Протромплекс 600, Baxter, Италия) в дозе 40 МЕ/кг, rFVIIa (НовоСэвен, Novo Nordisk A/S, Дания) в дозе 270 мкг/кг или ФМ в дозе 0,25 мг/кг соответственно. Определение дозы для КФПК и rFVIIa осуществляли в соответствии с имеющимися рекомендациями [9–11]. Спустя 1 ч после в/в введения плацебо, а также того или иного гемостатика осуществляли повторный забор крови.

Для подсчета количества тромбоцитов кровь от животных всех групп исследования помещали в пластиковые пробирки с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты, для изучения других параметров – с 0,11 М (3,8%) раствором цитрата натрия (соотношение крови и стабилизатора 9 : 1). Получение обедненной тромбоцитами плазмы крови во всех образцах проводили по общепринятой методике. В образцах венозной крови оценивалось коли-

чество тромбоцитов на гематологическом анализаторе Drew-3 (Drew Scientific Inc., Великобритания – США). В плазме крови определяли МНО, эхитоксовое время свертывания и концентрацию фибриногена по Clauss на коагулометре Thrombostat 2 (Behnk Elektronik, Германия) с использованием реагентов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия), а также уровень D-димера при помощи анализатора-рефлектометра Nycocard Rader II (Axis-Shield PoC AS, Норвегия) и тест-системы Nycocard® D-Dimer (Axis-Shield PoC AS, Норвегия).

Проводилась тромбоэластометрия стабилизированной цитратом крови на тромбоэластометре ROTEM® Gamma (Pentapharm GmbH, Германия) с реагентом Startem в режиме Natem. Определяли следующие показатели: CT – время начала коагуляции; CFT – время формирования сгустка; угол α – амплитуда сгустка; MCF – максимальная твердость сгустка; A10 – амплитуда сгустка через 10 мин. Для оценки генерации тромбина использовался метод калиброванной автоматизированной тромбографии по Н.С. Hemker (2003) с применением планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (ThermoFisher Scientific, Финляндия) с программным обеспечением Thrombinoscope® 3.0.0.26 и набором реагентов Thrombinoscope® (Нидерланды) (PPP-Reagent, Thrombin Calibrator, FluCa-Kit) с тканевым фактором в концентрации 5,0 пМ. Учитывались следующие показатели: Lagtime – время инициации образования тромбина; ETP – эндогенный тромбиновый потенциал; Peak thrombin – пиковая концентрация тромбина; ttPeak – время достижения пиковой концентрации тромбина; V – скорость образования тромбина [12].

Распределение признаков в выборках оценивали по критерию Шапиро – Уилка. В зависимости от распределения признаков применяли *t*-критерий Стьюдента, *U*-критерий Манна – Уитни или *W*-критерий Вилкоксона. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Обработка результатов проводилась программой MedCalc Version 17.9.7 (лицензия BU556-P12YT-BBS55-YAH5M-UBE51). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_{25}; Q_{75}]$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группах животных с индуцированной варфаринной коагулопатией (верифицированной в группе № 1 – плацебо) при использовании системных гемостатических препаратов – КФПК (группа № 2) и ФМ (группа № 3) в системе гемостаза наблюдались отличия по достигаемым эффектам (табл. 1). В частности, введение КФПК приводило к реверсии МНО до уровня нормальных значений и к статистически

значимому снижению количества тромбоцитов в периферической крови. Это сопровождалось сверхкомпенсированным повышением плотностных характеристик сгустка крови (данные тромбоэластометрии – по показателям MCF (+21%, $p < 0,005$) и A10 (+49%, $p < 0,006$)) в сравнении с плацебо [13] и избыточным усилением генерации тромбина (данные калиброванной тромбографии – по показателю ETP, Peak thrombin и V образования тромбина) (см. табл. 1). Отметим, что в группе варфаринизированных животных, получивших ФМ (группа № 3), несмотря на резкое снижение кровопотери (в 9,1 раза по сравнению с плацебо – в группе № 1) [5], высокое МНО и гипокоагуляционный сдвиг по показателям калиброванной тромбографии не корректировались в сторону значений физиологической нормы.

В следующих группах животных с прямым ингибированием тромбина дабигатраном также были получены различия в параметрах, описывающих систему гемостаза, при использовании, с одной стороны, КФПК (группа № 5) или rFVIIa (группа № 6) и, с другой – ФМ (группа № 7) (табл. 2). Введение животным КФПК или rFVIIa на фоне приема дабигатрана этексилата приводило к увеличению уровня D-димера в 2,8 и 8,0 раза соответственно, что не было характерным для экспериментальной группы, получившей ФМ. Кроме того, применение КФПК в группе № 5, как и в группе № 2, сопровождалось статистически значимым снижением количества тромбоцитов в периферической крови (на 17,0 и 6,1% соответственно), что не было свойственно эффектам ФМ. Далее, по данным, полученным в группе № 6, где в качестве системного гемостатика был использован rFVIIa, зафиксирован гиперкоагуляционный сдвиг по таким параметрам тромбоэластометрии, как CT, MCF, CFT и A10, что также не было свойственно для животных, получивших ФМ (группа № 7). По ряду показателей плотностные характеристики сгустка (угол α (+28,2%, $p < 0,001$), CFT (–44,7%, $p < 0,001$) и A10 (+30,2%, $p < 0,019$)) превышали таковые в группе с плацебо [13]. Как было показано ранее, применение ФМ снижало объем кровопотери в 2,9 раза по сравнению с группой № 4, тогда как использование КФПК и rFVIIa не отражалось на изменении объема кровопотери [4].

ОБСУЖДЕНИЕ

В мировой практике имеются наблюдения, указывающие на наличие риска возникновения тромботических осложнений при применении rFVIIa или КФПК в целях профилактики или купирования манифестного кровотечения. Настороженность в этом отношении проявили ряд зарубежных авторов. Так,

Таблица 1

Результаты оценки системы гемостаза у животных в экспериментальных группах на фоне действия варфарина, $Me (Q_{25} \div Q_{75})$						
Показатель	Группа № 1 (плацебо)		Группа № 2 (КФПК)		Группа № 3 (ФМ 0,25 мг/кг)	
	до введения плацебо _(1a)	после введения плацебо _(1б)	до введения КФПК _(2a)	после введения КФПК _(2б)	до введения ФМ _(3a)	после введения ФМ _(3б)
Число тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	555,0 [471,0÷591,0]	512,0 [474÷700,0] $p_{1a-1б} = 0,382$	425,0 [392,8÷531,3]	399,0 [334,0÷454,5] $p_{2a-2б} = 0,049$ $\Delta -6,1\%$	509,0 [417,8÷578,0]	479,5 [408,3÷551,5] $p_{3a-3б} = 0,328$
МНО, отношение	2,4 [2,0÷4,0]	2,5 [2,2÷4,6] $p_{1a-1б} = 0,650$	2,1 [1,7÷6,2]	1,1 [1,0÷1,2] $p_{2a-2б} = 0,002$ $\Delta -47,6\%$	2,0 [1,6÷3,6]	2,0 [1,5÷2,9] $p_{3a-3б} = 0,063$
Фибриноген, г/л	2,8 [2,6÷4,3]	3,0 [2,6÷4,4] $p_{1a-1б} = 0,814$	3,3 [2,8÷4,1]	2,9 [2,5÷3,6] $p_{2a-2б} = 0,260$	3,1 [2,7÷3,5]	3,0 [2,5÷3,3] $p_{3a-3б} = 0,065$
D-димер, нг/мл	150,0 [100,0÷200,0]	150,0 [100,0÷200,0] $p_{1a-1б} = 0,351$	100,0 [100,0÷100,0]	100,0 [100,0÷200,0] $p_{2a-2б} = 0,180$	200,0 [100,0÷250,0]	200,0 [150,0÷400,0] $p_{3a-3б} = 0,075$
Тромбоэластометрия						
СТ, с	2122,5 [1328,3÷2464,8]	2095,0 [1052,0÷2398,0] $p_{1a-1б} = 0,530$	1573,5 [948,3÷2394,0]	494,0 [355,0÷626,0] $p_{2a-2б} = 0,002$ $\Delta -3,2$ раза	1459,0 [783,5÷2198,8]	1559,5 [734,0÷1918,8] $p_{3a-3б} = 0,221$
Угол α , град.	н.р. в 9 случаях	н.р. в 7 случаях	48,0 [39,5÷52,0] н.р. в 8 случаях	68,0 [59,0÷71,0]	39,5 [30,3÷60,8] н.р. в 6 случаях	37,0 [32,8÷55,3] н.р. в 4 случаях $p_{3a-3б} = 0,767$
CFT, с	н.р. в 10 случаях	н.р. в 8 случаях	356,0 [307,5÷794,5] н.р. в 8 случаях	166,0 [110,0÷181,0]	452,5 [218,5÷522,5] н.р. в 8 случаях	367,0 [187,0÷404,8] н.р. в 6 случаях $p_{3a-3б} = 0,735$
MCF, мм	н.р. в 8 случаях	н.р. в 7 случаях	22,5 [9,0÷49,5] н.р. в 4 случаях	70,0 [67,0÷76,0] $p_{2a-2б} = 0,008$ $\Delta -3,1$ раза	32,5 [15,8÷50,5] н.р. в 6 случаях	44,0 [32,0÷49,5] н.р. в 4 случаях $p_{3a-3б} = 0,139$
A10, мм	н.р. в 9 случаях	н.р. в 8 случаях	8,5 [4,0÷34,5] н.р. в 4 случаях	64,0 [55,0÷68,0] $p_{2a-2б} = 0,007$ $\Delta -7,5$ раз	24,5 [18,8÷38,0] н.р. в 6 случаях	32,0 [27,0÷41,0] н.р. в 5 случаях $p_{3a-3б} = 0,260$
Калиброванная тромбография						
Lagtime, мин	3,5 [2,7÷4,5] н.р. в 2 случаях	4,4 [3,4÷5,6] н.р. в 3 случаях $p_{1a-1б} = 0,592$	5,0 [4,3÷5,3] н.р. в 6 случаях	1,7 [1,5÷2,0] $p_{2a-2б} \Delta -2,9$ раза	4,5 [4,5÷5,3]	6,0 [5,9÷6,3] н.р. в 2 случаях $p_{3a-3б} = 0,593$
ETP, нмоль $\times$ мин	150,2 [92,3÷183,9] н.р. в 2 случаях	103,0 [60,9÷158,8] н.р. в 3 случаях $p_{1a-1б} = 0,109$	97,8 [68,2÷104,9] н.р. в 6 случаях	582,0 [444,9÷806,4] $p_{2a-2б} \Delta +6,0$ раз	131,7 [81,3÷145,2]	149,3 [111,3÷189,6] н.р. в 2 случаях $p_{3a-3б} = 0,514$
Peak thrombin, нмоль	28,2 [18,9÷56,2] н.р. в 2 случаях	12,5 [7,5÷21,8] н.р. в 3 случаях $p_{1a-1б} = 0,041$ $\Delta -2,3$ раза	10,9 [7,3÷14,8] н.р. в 6 случаях	65,4 [41,3÷74,5] $p_{2a-2б} \Delta +6,0$ раз	10,5 [10,3÷13,6]	13,3 [10,9÷21,9] н.р. в 2 случаях $p_{3a-3б} = 0,285$
ttPeak, мин	6,5 [4,7÷7,2] н.р. в 2 случаях	9,2 [8,3÷10,5] н.р. в 3 случаях $p_{1a-1б} = 0,108$	9,5 [7,9÷9,9] н.р. в 6 случаях	9,5 [8,8÷9,6]	10,5 [10,2÷11,0]	10,8 [10,3÷11,1] н.р. в 2 случаях $p_{3a-3б} = 0,922$
V, нмоль/мин	9,4 [7,1÷25,9] н.р. в 2 случаях	3,4 [2,0÷6,5] н.р. в 3 случаях $p_{1a-1б} = 0,085$	2,4 [1,6÷4,7] н.р. в 6 случаях	7,8 [6,4÷11,8] $p_{2a-2б} \Delta +3,3$ раза	2,3 [1,6÷3,0]	2,8 [2,3÷5,2] н.р. в 2 случаях $p_{3a-3б} = 0,592$

Примечание. Здесь и в табл. 2: КФПК – концентрат факторов протромбинового комплекса; ФМ – фибрин-мономер; p – уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей; Δ – разница показателей; н.р. – нет регистрации.

Таблица 2

Результаты оценки системы гемостаза у животных в экспериментальных группах при прямом ингибировании тромбина, $Me (Q_{25} \div Q_{75})$									
Показатель	Группа № 4 (плацебо)		Группа № 5 (КФПК)		Группа № 6 (rFVII)		Группа № 7 (ФМ 0,25 мг/кг)		
	до введения плацебо _(4a)	после введения плацебо _(4b)	до введения КФПК _(5a)	после введения КФПК _(5b)	до введения rFVII _(6a)	после введения rFVII _(6b)	до введения ФМ _(7a)	после введения ФМ _(7b)	
Число тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	541,5 [481,3÷553,0]	501,0 [421,5÷517,5] $p_{4a-4b} = 0,116$	521,0 [458,0÷601,8]	432,5 [379,8÷501,5] $p_{5a-5b} = 0,050$ $\Delta - 17,0\%$	638,5 [535,3÷709,5]	638,0 [523,8÷717,5] $p_{6a-6b} = 0,972$	559,0 [528,3÷566,5]	550,5 [499,8÷565,3] $p_{7a-7b} = 0,600$	
Эритроцитарное время, отношение	3,4 [3,1÷3,8]	3,5 [3,1÷4,1] $p_{4a-4b} = 0,333$	2,1 [1,8÷2,5]	2,5 [2,0÷3,3] $p_{5a-5b} = 0,016$ $\Delta + 19,1\%$	2,5 [2,1÷3,7]	3,0 [2,2÷3,6] $p_{6a-6b} = 0,156$	2,6 [2,2÷2,9]	2,5 [2,2÷2,7] $p_{7a-7b} = 0,600$	
Фибриноген, г/л	2,9 [2,3÷4,2]	2,9 [2,4÷3,1] $p_{4a-4b} = 0,139$	4,1 [3,4÷5,0]	3,6 [3,0÷4,7] $p_{5a-5b} = 0,033$ $\Delta - 12,2\%$	2,9 [2,4÷3,2]	2,8 [2,4÷3,4] $p_{6a-6b} = 0,969$	3,2 [2,9÷3,5]	3,1 [2,9÷3,5] $p_{7a-7b} = 0,433$	
D-димер, нг/мл	100,0 [100,0÷200,0]	100,0 [100,0÷200,0] $p_{4a-4b} = 0,480$	200,0 [200,0÷300,0]	550,0 [400,0÷800,0] $p_{5a-5b} = 0,003$ Δ в 2,8 раза	100,0 [100,0÷150,0]	800,0 [300,0÷1100,0] $p_{6a-6b} = 0,005$ Δ в 8,0 раз	100,0 [100,0÷200,0]	200,0 [100,0÷300,0] $p_{7a-7b} = 0,075$	
Тромбоэластометрия									
CT, с	925,0 [619,0÷995,0]	713,0 [673,0÷853,0] $p_{4a-4b} = 0,515$	1023,0 [776,0÷1404,8]	964,5 [768,5÷1087,8] $p_{5a-5b} = 0,037$ $\Delta - 5,7\%$	675,5 [573,5÷996,8]	484,0 [274,0÷948,3] $p_{6a-6b} = 0,048$ $\Delta - 28,3\%$	660,0 [477,5÷907,0]	480,0 [348,3÷637,0] $p_{7a-7b} = 0,139$	
Угол α , град.	59,0 [48,0÷66,0]	62,0 [60,0÷66,0] $p_{4a-4b} = 0,953$	61,5 [54,3÷67,3] н.р. в 3 случаях	57,0 [50,5÷62,0] н.р. в 2 случаях $p_{5a-5b} = 0,327$	61,5 [56,3÷68,8]	70,5 [63,3÷75,0] $p_{6a-6b} = 0,059$	64,5 [59,3÷75,3]	65,5 [59,8÷76,3] $p_{7a-7b} = 0,767$	
CFT, с	169,0 [140,0÷210,0]	151,0 [134,0÷167,0] $p_{8a-8b} = 0,767$	175,0 [143,0÷231,5] н.р. в 3 случаях	231,5 [182,3÷425,8] н.р. в 1 случае $p_{5a-5b} = 0,137$	166,5 [112,0÷196,0]	114,0 [84,0÷147,8] $p_{6a-6b} = 0,035$ $\Delta - 31,5\%$	132,0 [82,5÷165,5]	150,0 [123,0÷165,0] $p_{7a-7b} = 0,859$	
MCf, мм	56,0 [54,0÷66,0]	62,0 [48,0÷66,0] $p_{4a-4b} = 0,953$	65,5 [58,3÷74,0] н.р. в 3 случаях	69,5 [62,0÷70,8] н.р. в 3 случаях $p_{5a-5b} = 0,889$	59,5 [45,0÷64,8]	65,5 [56,0÷73,0] $p_{6a-6b} = 0,021$ $\Delta + 10,1\%$	63,0 [55,8÷67,8]	62,5 [58,0÷68,8] $p_{7a-7b} = 0,779$	
A10, мм	48,0 [47,0÷59,0]	52,0 [45,0÷60,0] $p_{4a-4b} = 0,374$	57,5 [47,3÷65,8] н.р. в 2 случаях	54,0 [48,0÷59,0] н.р. в 2 случаях $p_{5a-5b} = 0,441$	48,0 [39,8÷55,0]	56,0 [49,5÷65,8] $p_{6a-6b} = 0,034$ $\Delta + 16,6\%$	55,0 [48,0÷65,8]	54,0 [49,0÷67,0] $p_{7a-7b} = 0,889$	

Примечание. rFVII – рекомбинантный фактор VIIa.

в исследовании A. Girolami и соавт. продемонстрированы случаи артериальных и венозных тромбозов разной локализации в случаях применения rFVIIa у пациентов с рядом видов нарушений в системе гемостаза (дефицит FVII и FXI, дисфибриногенемия, болезнь Виллебранда, тромбастения Гланцмана) [4]. Также описаны случаи тромбозов после использования rFVIIa у кардиохирургических пациентов [5, 6]. Можно обратить внимание на обзорную работу M. Levi и соавт., где приведены результаты оценки безопасности применения rFVIIa в 35 рандомизированных исследованиях, объединяющих 4 468 пациентов. Показано, что у 9,0%, из числа взятых под наблюдение, были документированы тромбоэмболические события, состоявшиеся преимущественно в артериальном русле [7].

Использование КФПК многие авторы также ассоциируют с различными вариантами внутрисосудистого свертывания крови. S.G. Yates и R. Sarode отмечают, что риск тромбоэмболических осложнений после введения КФПК при лечении кровотечений, связанных с приемом кумаринов, остается актуальной клинической проблемой [8]. Ряд авторов описывают различные тромботические события, связанные с КФПК: от поверхностного тромбофлебита, тромбоза глубоких вен и легочной эмболии, тромбоза артерий и полостей сердца до диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдрома) [19–23]. При этом риск тромбозов возрастает у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и пожилого возраста, а также при сочетанном применении rFVIIa и КФПК [24].

В ранее опубликованных исследованиях показано, что введение экзогенного ФМ сопровождалось повышением уровня известного маркера гемокоагуляции и активации фибринолиза – D-димера, в 7,0 и 8,0 раз в группах животных, получивших данный препарат в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг соответственно [3]. Это сопровождалось повышением плотностных характеристик сгустка крови (по данным тромбоэластометрии) [13] и потреблением тромбоцитов со снижением их числа в 1,5 раза в периферической крови (с ФМ, взятом в дозе 5,0 мг/кг) [3]. В то же время использование ФМ в дозировке 0,25 мг/кг не приводило к таким сдвигам, свойственным гиперкоагуляционному сдвигу [3, 13]. Следует отметить, что интенсивность образования тромбина (по данным калиброванной тромбографии) не увеличивалась вне зависимости от дозы использованного ФМ [13].

В настоящих исследованиях наклонность к внутрисосудистому тромбообразованию проявили как rFVIIa, так и КФПК. При использовании rFVIIa най-

дено повышение плотностных характеристик сгустка крови по данным тромбоэластометрии (по показателям угол α , CT, CFT, MCF и A10) и 8-кратное увеличение уровня D-димера по сравнению с исходным значением до введения данного препарата ($p < 0,005$). Применение КФПК также сопровождалось подъемом уровня D-димера (в 2,8 раза в сравнении с исходным значением, $p < 0,003$), сверхкомпенсированным повышением плотностных характеристик сгустка крови (по данным тромбоэластометрии – по показателям MCF и A10), а также избыточным усилением генерации тромбина (по показателям ETP, Peak thrombin и V). В то же время замена обозначенных выше системных гемостатических препаратов на ФМ не проявилась признаками внутрисосудистого свертывания крови по использованным методам оценки системы гемостаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные выявили протромботические эффекты при применении обозначенных выше гемостатических препаратов – КФПК и rFVIIa. Последние были испытаны на двух экспериментальных моделях с фармакологически вызванной гипокоагуляцией, связанной с приемом варфарина или дабигатрана. Такие эффекты проявили себя в виде сверхкомпенсированных изменений (по сравнению с данными у интактных животных) со стороны системы гемостаза, включая увеличение уровня D-димера и появление гиперкоагуляционного сдвига по данным тромбоэластометрии.

Необходимо отметить, что ФМ, взятый в дозе 0,25 мг/кг, приводил к существенному снижению кровопотери без описанных выше тромбогенных эффектов со стороны крови, что отличает его от известных препаратов направленного гемостатического действия. Соответственно, мы имеем основание полагать, что препарат ФМ более безопасен с позиции возникновения нежелательных явлений в виде спонтанного тромбообразования в кровеносном русле.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мельник А.А. Механизм действия гемостатических лекарственных препаратов. *Новости медицины и фармации*. 2017;10(622).
2. Rossaint R., Bouillon B., Cerny V., Coats T.J., Duranteau J., Fernández-Mondéjar E. et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit. Care*. 2016;20:100. DOI: 10.1186/s13054-016-1265-x.
3. Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И., Толстоколов И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О. и др. Системные гемостатические и протромботические эффекты фибриномера в эксперименте при дозированной травме пече-

- ни. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(1):6–12. DOI: 10.15372/SSMJ20190101.
4. Вдовин В.М., Момот А.П., Красюкова В.О., Толстоко-ров И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О. и др. Системные гемостатические и гемостазиологические эффекты фибрин-мономера при прямом ингибировании тромбина в эксперименте. *Российский физиологический журнал*. 2019;105(2):207–215. DOI: 10.1134/S0869813919020109.
 5. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Толстоко-ров И.Г., Шевченко В.О., Шахматов И.И. и др. Системные гемоста-тические и гемостазиологические эффекты низкой дозы фибрин-мономера на фоне действия варфарина в экспе-рименте. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2019;79(3):16–23. DOI: 10.25555/THR.2019.3.0885.
 6. Момот А.П., Цывкина Л.П., Тараненко И.А., Мамаев А.Н., Сердюк Г.В., Шахматов И.И. и др. Современные методы распознавания состояния тромботической готовности. Бар-наул: Алтайский государственный университет, 2011:138.
 7. Момот А.П., Шахматов И.И., Ломаев И.С., Терехов С.С. Способ промышленного получения фибрин-мономера из плазмы крови. Патент РФ № 2522237. 10.07.2014. Бюл. № 19.
 8. Гуськова Т.А. Доклиническое токсикологическое изуче-ние лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований. *Токсикологиче-ский вестник*. 2010;104(5):2–5.
 9. Ryn J., Stangier J., Haertter S., Liesenfeld K.-H., Wienen W., Feuring M. et al. Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation as-says and reversal of anticoagulant activity. *Thromb. Haemost.* 2010;103(6):1116–1127. DOI: 10.1160/TH09-11-0758.
 10. Bavalia R., Abdoellakhan R., Brinkman H.J.M., Brekel-mans M.P.A., Hamulyák E.N., Zuurveld M. et al. Emergen-cies on direct oral anticoagulants: Management, outcomes, and laboratory effects of prothrombin complex concentrate. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2020;4(4):569–581. DOI: 10.1002/rth2.12336.
 11. Зозуля Н.И., Кумскова М.А., Полянская Т.Ю., Сви-рин П.В. Клинические рекомендации по диагностике и ле-чению гемофилии. НГО, 2018:34.
 12. Папаян Л.П., Головина О.Г., Четкин А.В., Бессмель-цев С.С., Капустин С.И., Каргин В.Д. и др. Алгоритм ди-агностики гемостаза и мониторинг антиромботической терапии. Методические рекомендации. СПб: Российский научно-исследовательский институт гематологии и транс-физиологии, 2016:18.
 13. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Бобров И.П., Момот Д.А., Шахматов И.И. и др. Влияние экзогенного фибрин-мономера на гемостатический потенциал и обра-зование фибрина в области дозированной травмы печени в эксперименте. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020;106(9):1132–1143. DOI: 10.31857/S0869813920070092.
 14. Girolami A., Marinis G.B., Bonamigo E., Lombardi A.M. Recombinant FVIIa concentrate-associated thrombotic events in congenital bleeding disorders other than hemophilias. *He-matology*. 2012;17(6):346–349. DOI: 10.1179/1607845412Y.0000000027.
 15. Pichon N., Bellec F., Sekkal S., Marsaud J.P., Laskar M., François B. et al. Fatal thrombotic event after infusion of re-combinant activated factor VII after cardiac surgery. *J. Tho-rac. Cardiovasc. Surg.* 2008;136(1):220–221. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.10.084.
 16. Hajj-Chahine J., Jayle C., Tomasi J., Houmida H., Corbi P. Acute aortic valve thrombosis secondary to recombinant fac-tor VIIa. *Ann. Thorac. Surg.* 2012;93:999. DOI: 10.1016/j.athoracsurg.2011.08.050.
 17. Levi M., Levy J.H., Andersen H.F., Truloff D. Safety of re-combinant activated factor VII in randomized clinical trials. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(19):1791–1800. DOI: 10.1056/NE-JMoa1006221.
 18. Yates S.G., Sarode R. New strategies for effective treatment of vitamin K antagonist-associated bleeding. *J. Thromb. Hae-most.* 2015;13(Suppl.1):S180–S186. DOI: 10.1111/jth.12970.
 19. Köhler M. Thrombogenicity of prothrombin complex con-centrates. *Thromb. Res.* 1999;95(4Suppl.1):S13–S17. DOI: 10.1016/s0049-3848(99)00079-1.
 20. Ehrlich H.J., Henzl M.J., Gomperts E.D. Safety of factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events. *Haemophilia*. 2002;8(2):83–90. DOI: 10.1046/j.1365-2516.2002.00532.x.
 21. Goldhammer J.E., Bakowitz M.J., Milas B.L., Patel P.A. Intra-cardiac thrombosis after emergent prothrombin complex con-centrate administration for warfarin reversal. *Anesthesiology*. 2015;123(2):458. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000464.
 22. Brinkman H.J.M. Prothrombin complex concentrate, a ge-neral antidote for oral anticoagulation. In the book: Basaran O. Anticoagulation Therapy, 2016. Chapter 5:79–109. DOI: 10.5772/64304.
 23. Gavva C., Reddy M., Sarode R. Four-factor prothrombin com-plex concentrates effectiveness in the reversal of anticoagula-tion. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine*. 2017;2017(5):39–47. DOI: 10.2147/IJCTM.S114736.
 24. Rajpurkar M., Croteau S.E., Boggio L., Cooper D.L. Throm-botic events with recombinant activated factor VII (rFVIIa) in approved indications are rare and associated with older age, cardiovascular disease, and concomitant use of activat-ed prothrombin complex concentrates (aPCC). *J. Blood Med.* 2019;10:335–340. DOI: 10.2147/JBM.S219573.

Вклад авторов

Вдовин В.М. – разработка концепции и дизайна, постановка экспериментальной модели, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации, поста-новка экспериментальной модели. Момот А.П. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации. Шахматов И.И. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных.

Информация об авторах

Вдовин Вячеслав Михайлович – канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой патологической физиологии, АГМУ, г. Барнаул, erytrab@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4606-3627>

Шахматов Игорь Ильич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии, АГМУ, г. Барнаул, iish59@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0979-8560>

Момот Андрей Павлович – д-р мед. наук, профессор, директор НМИЦ гематологии (Алтайский филиал); зав. лабораторией гемостаза, Институт клинической медицины, АГМУ, г. Барнаул; hyzan@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8413-5484>

(✉) **Вдовин Вячеслав Михайлович**, erytrab@gmail.com

Поступила в редакцию 18.02.2022;
одобрена после рецензирования 31.03.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616-008.9-021.6:616.233-008.8-076.5
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-29-36>

Особенности цитограммы и цитокинового профиля жидкости бронхоальвеолярного лаважа при экспериментальном метаболическом синдроме

Воронкова О.В., Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Есимова И.Е.,
Григорьева А.В., Осихов И.А., Чернышов Н.А., Мотлохова Е.А.

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

РЕЗЮМЕ

Цель. Выявить особенности клеточного состава и цитокинового профиля жидкости бронхоальвеолярного лаважа у крыс в модели диет-индуцированного метаболического синдрома.

Материалы и методы. В эксперименте на животных (крысах) воспроизведена модель метаболического синдрома (МС), индуцированного высокожировой и высокоуглеводной диетой. Для оценки состоятельности воспроизведенной модели использованы биохимические и морфометрические методы: измерение массы тела, удельной массы печени и висцерального жира, измерение артериального давления, определение содержания в крови глюкозы (в том числе в глюкозотолерантном тесте (ГТТ)), определение параметров липидного спектра крови. Для оценки интенсивности воспалительного ответа в крови определяли концентрацию общего белка, общее количество лейкоцитов и концентрацию иммуоцитокинов (интерлейкина (IL)-6, IL-10, фактора некроза опухоли альфа (TNF α), моноцитарного хемотоксического фактора-1 (MCP-1)). Открытым способом на изолированном комплексе «сердце-легкие» выполняли бронхоальвеолярный лаваж. В бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) определяли концентрацию белка, иммуоцитокинов (IL-6, IL-10, TNF α , MCP-1), общее количество лейкоцитов и соотношение их отдельных морфологических форм.

Результаты. У животных с МС выявлено повышение в крови общего количества лейкоцитов за счет гранулоцитарного компонента, увеличение концентрации белка и цитокинов TNF α и IL-10 по сравнению с соответствующими параметрами у крыс контрольной группы. В результате анализа БАЛЖ выявлено повышение концентрации белка, общего количества лейкоцитов, абсолютного числа альвеолярных макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов; более чем в 1,5 раза превышена концентрация IL-6 и MCP-1.

Заключение. Изменения качественных и количественных параметров БАЛЖ носят воспалительный характер и формируются на фоне системного воспалительного ответа, сопровождающего нарушение обмена веществ при моделировании МС у крыс в эксперименте.

Ключевые слова: метаболический синдром, бронхоальвеолярная жидкость, воспаление

Конфликт интересов. Авторы гарантируют отсутствие потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039>, и средств Администрации Томской области.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8201 от 27.03.2020).

Для цитирования: Воронкова О.В., Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Есимова И.Е., Григорьева А.В., Осихов И.А., Чернышов Н.А., Мотлохова Е.А. Особенности цитограммы и цитокинового профиля жидкости бронхоальвеолярного лаважа при экспериментальном метаболическом синдроме. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):29–36. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-29-36>.

Features of the cytogram and cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid in experimental metabolic syndrome

Voronkova O.V., Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Esimova I.E., Grigorieva A.V., Osikhov I.A., Chernyshov N.A., Motlokhova E.A.

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

ABSTRACT

The aim of the study was to identify the features of the cellular composition and cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid in rats in a model of diet-induced metabolic syndrome.

Materials and methods. In an experiment on animals (rats), a model of metabolic syndrome (MS) induced by a high-fat and high-carbohydrate diet was reproduced. To assess the viability of the reproduced model, biochemical and morphometric methods were used, such as measurement of body weight, specific gravity of liver and visceral fat, and blood pressure, determination of glucose concentration in the blood (including a glucose tolerance test), as well as determination of blood lipid parameters. To assess the intensity of the inflammatory response in the blood, the concentration of total protein, the total number of leukocytes, and the levels of immunocytokines (interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF) α , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1) were determined. Open bronchoalveolar lavage was performed on the isolated heart – lung complex. The concentration of protein, immunocytokines (IL-6, IL-10, TNF α , MCP-1), the total number of leukocytes, and the ratio of their morphological types were determined in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Results. In animals with MS, an increase in the total number of leukocytes in the blood due to granulocytes and a rise in the concentration of protein, TNF α , and IL-10 were revealed compared with the parameters in the controls. BALF analysis revealed an increase in the concentration of protein, the total number of leukocytes, and the absolute number of alveolar macrophages, neutrophil granulocytes, and lymphocytes. The levels of IL-6 and MCP-1 were more than 1.5 times higher.

Conclusion. Changes in the qualitative and quantitative parameters of BALF are inflammatory in nature and are formed during a systemic inflammatory response accompanying metabolic disorders in modeling MS in rats in the experiment.

Keywords: metabolic syndrome, bronchoalveolar lavage fluid, inflammation

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

Source of financing. The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039>, and funded by the Administration of the Tomsk Region.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 8201 of 27.03.2020).

For citation: Voronkova O.V., Birulina J.G., Ivanov V.V., Buyko E.E., Esimova I.E., Grigorieva A.V., Osikhov I.A., Chernyshov N.A., Motlokhova E.A. Features of the cytogram and cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid in experimental metabolic syndrome. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):29–36. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-29-36>.

ВВЕДЕНИЕ

Комплекс нарушений обмена веществ, объединенных рамками метаболического синдрома (МС), ускоряет развитие и прогрессирование ряда заболеваний, включая сердечно-сосудистую и цереброваскулярную патологию, сахарный диабет 2-го типа, болезни почек и желчевыводящих путей, некоторые виды рака [1–3]. В клинической медицине коморбидности одним из обсуждаемых является вопрос о

влиянии компонентов метаболического синдрома на состояние респираторной системы. В ряде клинических наблюдений МС был идентифицирован как независимый фактор риска нарушения функции легких и ухудшения респираторных симптомов при таких многофакторных заболеваниях, как бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких.

Установлено, что наиболее значимыми компонентами МС, способствующими респираторной патологии, являются абдоминальное ожирение, ги-

пергликемия и гиперинсулинемия [4–6]. Наименее изученными остаются ранние механизмы повреждающего действия компонентов МС на бронхолегочную систему. В определенной степени это связано с тем, что большинство исследований носят клинический характер. Поскольку кардиореспираторная система имеет широкие адаптивные возможности, в фокус внимания врачей попадают пациенты с уже выраженными проявлениями дыхательной недостаточности на фоне МС. В связи с этим изучение сложных механизмов влияния метаболических расстройств на морфофункциональное состояние бронхоальвеолярной системы целесообразно проводить в эксперименте с использованием животных моделей.

Получение и исследование бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) являются одним из достоверных методов изучения цитологических, иммунологических, биохимических и микробиологических характеристик бронхоальвеолярных отделов респираторной системы. Исследование БАЛЖ не только оказывает существенную помощь в диагностике и определении активности патологического процесса, но и позволяет глубже раскрыть патогенетические закономерности повреждения легких при основной или сопутствующей патологии [7, 8].

Цель исследования – выявить особенности клеточного состава и цитокинового профиля жидкости бронхоальвеолярного лаважа у крыс в модели diet-индуцированного метаболического синдрома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 33 самцах крыс аутбредной линии Вистар (средняя масса $280,5 \pm 36,1$ г, возраст на начало исследования 6 нед), которые были разделены на контрольную (15 животных) и опытную (18 животных) группы. Животные содержались в условиях вивария; исследования выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

На животных опытной группы была воспроизведена модель diet-индуцированного метаболического синдрома – крысы в течение 12 нед содержались на высокожировой и высокоуглеводной диете, включающей стандартный корм (66%) с добавлением животного жира (17%), фруктозы (17%), холестерина (0,25%) с заменой питьевой воды на 20%-й раствор фруктозы (общая калорийность суточного рациона 440 ккал/100 г). Крысы контрольной группы находились на стандартной диете (корм «Дельта Фидс», Биопро, Россия, общая калорийность 300 ккал/100 г, соотношение белки : жиры : углеводы составило 24 : 6 : 44) со свободным доступом к пище и воде.

Для оценки состоятельности воспроизведенной модели метаболического синдрома в начале и в конце эксперимента у животных измеряли массу тела и артериальное давление (Систола, Нейроботикс, Россия). На последней неделе эксперимента проводили ГТТ – крысам натошак (лишение корма на 12 ч) внутрижелудочно вводили раствор глюкозы в дозе 2 г/кг (D-глюкоза, Sigma-Aldrich, США). Через 0, 15, 30, 60, 90 и 120 мин в крови определяли концентрацию глюкозы ферментативным колориметрическим методом с использованием набора реагентов (Chronolab, Испания). Через 12 нед после начала эксперимента животных подвергали эвтаназии методом CO_2 -асфиксии, отбирали кровь из сердца для оценки гематологических показателей (вакутейнер с $\text{K}_2\text{ЭДТА}$) и получения сыворотки крови (вакутейнер с активатором свертывания). Гематологические показатели оценивали на автоматическом анализаторе BC-2800 Vet (Mindray, Китай). В сыворотке крови определяли биохимические параметры, включая показатели липидного спектра (на автоматическом биохимическом анализаторе Architect c4000 (Abbot, США), а также концентрацию иммуноцитокининтерлейкина (IL) -6, IL-10, фактора некроза опухоли альфа ($\text{TNF}\alpha$), моноцитарного хемотоксического фактора-1 (MCP-1) методом иммуноферментного анализа (наборы Bender MedSystems GmbH, Австрия). Методом диссекции выделяли печень и висцеральную жировую ткань (мезентериальную, эпидидимальную и забрюшинную жировую клетчатку), взвешивали на аналитических весах и рассчитывали их удельную массу.

Открытым способом на изолированном комплексе «сердце–легкие» выполняли бронхоальвеолярный лаваж. В качестве жидкости для промывания легких использовали холодный изотонический физиологический раствор [9]. Производили 2–3 промывки обеих легких шприцем с усеченной канюлей через трахею. Исходный объем омывающей жидкости для однократного введения составил 3 мл, объем возврата – не менее 2 мл. В лаважной жидкости определяли концентрацию белка спектрофотометрически BCA-методом (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich) и цитокинов IL-6, IL-10, $\text{TNF}\alpha$, MCP-1 методом иммуноферментного анализа (наборы Bender MedSystems GmbH, Австрия).

При цитологическом исследовании БАЛЖ определяли общее количество лейкоцитов и соотношение их отдельных морфологических форм. С этой целью БАЛЖ центрифугировали, клеточный осадок наносили на предметное стекло, фиксировали в парах формалина и окрашивали по методу Романовского – Гимзы. Подсчет клеточных элементов проводили на

200 клеток при микроскопии препаратов с использованием иммерсионного объектива.

Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения (тест Шапиро – Уилка), представляли в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$), не подчиняющиеся – медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}; Q_{75})$. Анализ различий между выборками выполняли при помощи t -критерия Стьюдента или U -критерия Манна – Уитни. При уровне значимости $p < 0,05$ различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие высокожировой и высокоуглеводной диеты на животных опытной группы приводило к статистически значимым по сравнению с контролем изменениям физиологических и биохимических показателей, а именно: повышению массы тела, увеличению удельной массы печени и висцеральной жировой ткани, повышению артериального давления, увеличению концентрации в крови общего белка и глюкозы (табл. 1).

Таблица 1

Влияние высокожировой и высокоуглеводной диеты на физиологические и биохимические параметры крыс, $M \pm SD$		
Показатель	Контрольная группа, $n = 15$	Модель метаболического синдрома, $n = 18$
Масса тела, г	$433,3 \pm 39,4$	$489,1 \pm 47,9$; $p = 0,01$
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	$130,4 \pm 9,5$	$145,1 \pm 8,7$; $p = 0,01$
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	$86,5 \pm 9,3$	$101,4 \pm 12,2$; $p = 0,028$
Глюкоза натощак, ммоль/л	$4,7 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,4$; $p < 0,001$
Общий белок, г/л	$52,7 \pm 3,4$	$66,7 \pm 3,8$; $p = 0,004$
Общий холестерол, ммоль/л	$1,7 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$; $p = 0,001$
ХС-ЛПВП, ммоль/л	$0,6 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$; $p = 0,003$
ХС-ЛПНП, ммоль/л	$0,9 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,4$; $p = 0,02$
ХС-ЛПОНП, ммоль/л	$0,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$; $p = 0,03$
Триацилглицеролы, ммоль/л	$0,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,5$; $p = 0,001$
Коэффициент атерогенности	$2,5 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,7$; $p = 0,02$
Удельная масса жировой ткани, г	$2,2 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,6$; $p < 0,001$
Удельная масса печени, г	$3,1 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,5$; $p < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями в контрольной группе.

Изменения показателей липидного спектра крови характеризовались повышением концентрации триацилглицеролов, общего холестерина, холестерина в составе липопротеинов низкой (ХС-ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС-ЛПОНП). Концентрация холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) оказалась ниже контрольных значений, что нашло отражение в коэффициенте атерогенности, который более чем в 1,5 раза ($p = 0,02$) превышал соответствующий показатель в контрольной группе (см. табл. 1).

У животных моделей МС было зарегистрировано снижение толерантности к глюкозе при проведении ГГТ – на графике динамики уровня глюкозы в крови зарегистрировано увеличение площади под кривой «концентрация глюкоза–время» в 1,3 раза по сравнению с результатами у интактных животных (AUC_{0-120}), которая для контрольной группы составила $752,2 \pm 50,4$ ммоль/л $\times$ 120 мин, для экспериментальной группы – $940,9 \pm 55,8$ ммоль/л $\times$ 120 мин ($p = 0,001$) (рис. 1).

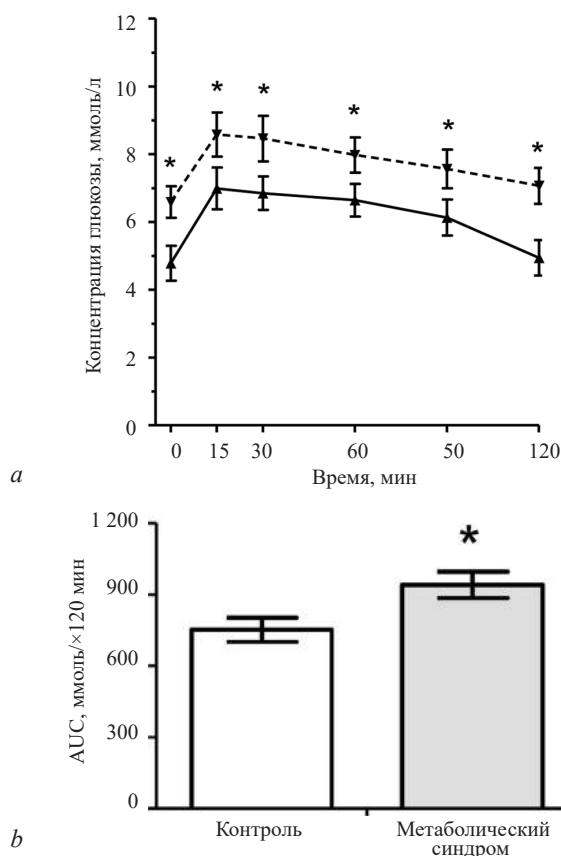


Рис. 1. Изменение концентрации глюкозы в крови крыс (a) и площадь под кривой «концентрация глюкоза–время» (AUC_{0-120}) (b) в глюкозотолерантном тесте: сплошная линия – контрольная группа, пунктирная – экспериментальная группа.

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

При анализе гематологических параметров выявлено увеличение общего количества лейкоцитов в крови у животных опытной группы в среднем в 1,4 раза по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе; количественный анализ лейкоцитарной формулы выявил статистически значимое увеличение абсолютного и относительного числа гранулоцитов в единице объема крови (табл. 2).

По результатам биохимического анализа концентрация белка в жидкости бронхоальвеолярного лаважа у животных опытной группы составила 1,08 ($\pm 0,30$) г/л, что в среднем в 1,5 раза ($p = 0,037$) превысило соответствующее значение в группе интактных

животных (табл. 3). Качественный и количественный анализ цитогаммы БАЛЖ выявил увеличение по сравнению с контрольными значениями общего количества лейкоцитов в единице объема жидкости за счет повышения абсолютного числа всех видов лейкоцитов, присутствующих в БАЛЖ – альвеолярных макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов (см. табл. 3). Исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови у экспериментальных животных выявило более высокий по сравнению с контрольными значениями уровень IL-10 и TNF α ; в БАЛЖ статистически значимо превышала контрольные значения концентрация IL-6 и MCP-1 (табл. 4).

Таблица 2

Общее количество лейкоцитов и показатели гемограммы у экспериментальных животных, $Me (Q_{25}; Q_{75})$			
Показатель		Контрольная группа, $n = 15$	Модель метаболического синдрома, $n = 18$
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		9,9 (9,4; 10,9)	13,7 (11,4; 15,0); $p = 0,001$
Количественный состав клеток (в числителе – в %, в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9/\text{л}$)	Гранулоциты	$\frac{28,2 (25,9; 31,3)}{2,5 (1,7; 3,6)}$	$\frac{33,2 (31,5; 34,2)}{3,9 (3,2; 4,4)}; p = 0,001$
	Лимфоциты	$\frac{65,3 (64,2; 67,6)}{7,6 (5,9; 8,3)}$	$\frac{64,2 (62,7; 66,2)}{7,1 (6,4; 8,5)}; p = 0,343$
	Моноциты	$\frac{3,4 (3,0; 3,6)}{0,4 (0,2; 0,4)}$	$\frac{3,5 (3,1; 4,0)}{0,5 (0,3; 0,4)}; p = 0,166$

Таблица 3

Концентрация белка, $M \pm SD$, общее количество лейкоцитов и показатели цитогаммы БАЛЖ у экспериментальных животных, $Me (Q_{25}; Q_{75})$			
Показатель		Контрольная группа, $n = 15$	Модель метаболического синдрома, $n = 18$
Общий белок, г/л		0,74 ($\pm 0,20$)	1,08 ($\pm 0,30$); $p = 0,037$
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		0,55 (0,30; 0,84)	0,80 (0,65; 1,55); $p = 0,047$
Количественный состав клеток (в числителе – в %, в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9/\text{л}$)	Альвеолярные макрофаги	$\frac{42,60 (38,50; 53,00)}{0,23 (0,13; 0,39)}$	$\frac{51,50 (33,88; 55,25)}{0,66 (0,51; 0,87)}; p = 0,677$
	Нейтрофильные гранулоциты	$\frac{47,00 (41,60; 55,50)}{0,27 (0,14; 0,36)}$	$\frac{45,25 (36,50; 55,50)}{0,58 (0,02; 0,09)}; p = 0,589$
	Лимфоциты	$\frac{5,50 (1,75; 7,75)}{0,02 (0,01; 0,04)}$	$\frac{7,00 (2,38; 9,88)}{0,05 (0,02; 0,09)}; p = 0,146$

Таблица 4

Концентрация цитокинов, пг/мл, в сыворотке крови и БАЛЖ у экспериментальных животных, $Me (Q_{25}; Q_{75})$				
Параметр	Сыворотка крови		БАЛЖ	
	Контрольная группа, $n = 15$	Модель метаболического синдрома, $n = 18$	Контрольная группа, $n = 15$	Модель метаболического синдрома, $n = 18$
IL-6	5,5 (2,3; 6,3)	7,8 (4,7; 14,1); $p = 0,152$	5,3 (4,7; 9,2)	9,7 (9,4; 15,7); $p = 0,007$
IL-10	11,8 (6,0; 23,8)	43,3 (21,9; 54,7); $p = 0,029$	59,9 (37,4; 74,5)	66,1 (38,4; 85,9); $p = 0,351$
TNF α	2,6 (2,6; 5,2)	10,8 (6,4; 11,7); $p = 0,035$	40,1 (20,6; 46,2)	39,6 (31,5; 42,5); $p = 0,863$
MCP-1	158,6 (91,7; 454,6)	155,7 (111,7; 407,3); $p = 0,423$	166,7 (131,5; 352,5)	284,3 (184,0; 498,1); $p = 0,045$

ОБСУЖДЕНИЕ

Воспроизведение в эксперименте на животных генетических либо индуцированных диетой и химическими веществами моделей МС позволяет исследовать изменения параметров гомеостаза и анализировать влияние формирующихся метаболических нарушений на различные органы и системы.

Диет-индуцированные комбинированные *in vivo* модели МС с высоким содержанием в рационе жира и углеводов в большей степени близки к несбалансированному питанию человека, наиболее соответствуют алиментарному ожирению и адекватны по механизмам развития МС и связанной с ним сопутствующей патологии [10–12].

Модель, воспроизведенная в нашем эксперименте, отражала основные биометрические и биохимические изменения, соответствующие МС. У крыс, находящихся на 12-недельной высокожировой и высокоуглеводной диете, наблюдалось увеличение массы тела за счет накопления висцеральной жировой ткани и гепатомегалии, а также регистрировалась артериальная гипертензия с повышением как систолического, так и диастолического давления (см. табл. 1). При биохимическом анализе крови были выявлены изменения, свидетельствующие о нарушении углеводного и липидного обменов, а именно: гипергликемия натощак, низкая толерантность к глюкозе, дислипидотеинемия с повышением в крови уровня триацилглицеролов, атерогенных фракций липопротеинов (ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП) и снижением концентрации липопротеинов высокой плотности. Коэффициент атерогенности, рассчитанный для животных опытной группы, более чем в 1,5 раза превышал контрольные значения (см. табл. 1, рис. 1).

Ряд исследований подтвердил тот факт, что факторы иммунной системы активно вовлекаются в патогенез алиментарнозависимых заболеваний [13, 14]. Важное значение в патогенезе МС отводится асептическому воспалению жировой ткани, индукторами которого являются макро- и микронутриенты, а также продукты обмена, образующиеся в висцеральном жире при его избыточном накоплении [15]. Такое «метаболическое» воспаление часто не имеет выраженных клинических проявлений, но сопровождается локальными стромально-сосудистыми и функциональными изменениями жировой ткани – гипертрофией адипоцитов, инфильтрацией иммунными клетками, фиброзом внеклеточного матрикса, нарушением микроциркуляции, изменением секреторного фенотипа клеточных элементов [14]. Тем не менее в ряде случаев лабораторные тесты выявляют в крови повышение уровня неспецифических маркеров воспаления, таких как С-реактивный белок, фибриноген, прокальцитонин и других, коррелирующее с выраженностью воспалительного процесса в жировой ткани [16].

В результате проведенного нами эксперимента у животных – моделей МС было выявлено повышение общего количества лейкоцитов за счет гранулоцитарного компонента, а также увеличение концентрации белка в сыворотке крови по сравнению с соответствующими параметрами у интактных животных (см. табл. 1, 2). Наряду с этим мы зарегистрировали повышение концентрации TNF α и IL-10 в сыворотке крови (см. табл. 4). Выявленные изменения являются общими признаками воспалительного ответа, разви-

вающегося на фоне диет-индуцированного нарушения обмена веществ [17–19].

Факторы системного воспаления, ассоциированного с МС и ожирением, способствуют развитию патологии различных органов и систем, что подтверждается большим количеством экспериментальных и клинических исследований [2, 20]. Одним из информативных методов обнаружения биологических маркеров большинства заболеваний легких является исследование БАЛЖ (цитологическое, биохимическое, иммунологическое), которое дает точные представления о направленности и степени выраженности защитно-приспособительных и патологических реакций в легких и позволяет изучить системные механизмы поддержания структурного и функционального гомеостаза бронхолегочной системы [7, 8].

В результате анализа цитограммы БАЛЖ, полученной у животных моделей МС, нами установлено увеличение по сравнению с контрольными значениями общего количества лейкоцитов, а также их отдельных морфологических форм – абсолютного числа альвеолярных макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов (см. табл. 3). В норме макрофаги представляют большинство фагоцитов в нижних дыхательных путях [21]. При воспалении представительство альвеолярных макрофагов увеличивается как за счет пролиферации резидентных клеток (преимущественно), так и за счет рекрутинга (в меньшей степени) макрофагов моноцитарного происхождения из периферической крови [22]. Инфильтрирующие ткани моноциты оказываются в специфическом микроокружении и развиваются в макрофаги с измененными функциями, зачастую усугубляя реакции воспаления [23]. Предполагают, что именно рекрутированные из крови моноциты, а не пролиферирующие резидентные альвеолярные макрофаги, в легких являются предшественниками M1-поляризованных макрофагов. Последние отличаются выраженной цитотоксической и антимикробной активностью, секретируют большое количество активных форм кислорода, азота, провоспалительных цитокинов и способствуют альтерации и прогрессированию воспаления в слизистой оболочке бронхов [24].

В результате анализа цитокинового профиля БАЛЖ мы выявили повышение более чем в 1,5 раза концентрации IL-6 и MCP-1 у животных с МС по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 4). Известно, что моноцитарный хемотаксический фактор преимущественно секретируется моноцитами-макрофагами, дендритными клетками и легочными фибробластами и увеличивает хемотаксическую

активность моноцитов, но не нейтрофилов [25]. IL-6 – плейотропный цитокин, обладающий как про-, так и противовоспалительными свойствами за счет реализации разных видов сигналинга [26]. При хронических заболеваниях легких IL-6 имеет решающее значение для привлечения нейтрофилов в область воспаления, так как приводит к синтезу необходимых хемокинов эндотелиальными клетками в результате трансигналинга. При этом нейтрофилы, привлеченные в очаг воспаления, являются одним из источников растворимой формы рецептора для IL-6 (sIL-6R), необходимой для инициирования трансигналинга в отношении структурных клеточных элементов легких (фибробластов, эпителиальных, эндотелиальных и гладкомышечных клеток) [27, 28]. В свою очередь избыточная провоспалительная активность клеточных компонентов интерстициального легочного матрикса может приводить к повышению проницаемости альвеолярного-капиллярного барьера, подтверждением чему является выявленное нами увеличение концентрации белка в жидкости бронхоальвеолярного лаважа в группе животных с метаболическим синдромом (см. табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальный диет-индуцированный МС сопровождается развитием системного воспалительного ответа, лабораторными признаками которого являются нейтрофильный лейкоцитоз в крови, повышение сывороточной концентрации белка, иммуноцитокінов TNF α и IL-10. Органоспецифическими изменениями, характеризующими негативное влияние факторов МС на состояние бронхолегочной системы у экспериментальных животных, являются качественные и количественные изменения состава БАЛЖ, а именно увеличение концентрации белка, повышение содержания клеточных элементов (альвеолярных макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов), повышение концентрации провоспалительных цитокинов IL-6 и MCP-1. Поскольку данные изменения имеют воспалительный характер, целесообразной в дальнейших экспериментах представляется оценка структурных и морфофункциональных изменений в бронхоальвеолярном отделе у лабораторных животных, возникающих на фоне МС с оценкой их интенсивности во взаимосвязи с факторами системного и локального воспаления.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Lee J., Lee K.S., Kim H., Jeong H., Choi M.J., Yoo H.W. et al. The relationship between metabolic syndrome and the incidence of colorectal cancer. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2020;25(1):6. DOI: 10.1186/s12199-020-00845-w.
- Segula D. Complications of obesity in adults: a short review of the literature. *Malawi Med. J.* 2014; 26(1):20–24.
- Laakso M., Kuusisto J., Stančáková, A., Kuulasmaa T., Pakujanta P., Lusi A.J. et al. The Metabolic Syndrome in Men study: a resource for studies of metabolic and cardiovascular diseases. *Journal of Lipid Research*. 2017;58(3):481–493. DOI: 10.1194/jlr.O072629.
- Будневский А.В., Малыш Е.Ю., Овсянников Е.С., Дробышева Е.С. Бронхиальная астма и метаболический синдром: клинико-патогенетические взаимосвязи. *Терапевтический архив*. 2015;87(10):110–114. DOI: 10.17116/terarkh20158710110-114.
- Будневский А.В., Овсянников Е.С., Лабжания Н.Б. Сочетание хронической обструктивной болезни легких и метаболического синдрома: патофизиологические и клинические особенности. *Терапевтический архив*. 2017;89(1):123–127. DOI: 10.17116/terarkh2017891123-127.
- Воронкова О.В., Саприна Т.В., Букреева Е.Б., Зима А.П. Этиопатогенетические параллели и нерешенные вопросы патогенеза коморбидности хронической обструктивной болезни легких и метаболического синдрома (обзор литературы). *Ожирение и метаболизм*. 2020;17(3):292–298. DOI: 10.14341/omet12378.
- Зиновьев С.В., Селиверстов С.С., Целуйко С.С., Горбунов М.М., Семенов Д.А. Морфологическая характеристика открытого бронхоальвеолярного лаважа легкого крысы. *Амурский медицинский журнал*. 2015;4(12):103–108.
- Алимкина О.В., Петренко А.Э., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Таболякова Л.А., Максименко С.В. и др. Анализ клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа при моделировании и лечении острого респираторного дистресс-синдрома на мышцах-биомоделях. *Биомедицина*. 2021;17(3):17–22. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-17-22.
- Матичин А.А., Кательникова А.Е., Крышень К.Л. Особенности отбора бронхоальвеолярного лаважа у лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;4:6. DOI: 10.29296/2618723X-2019-04-06.
- Woods S.C., Seeley R.J., Rushing P.A., D'Alessio D., Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.* 2003; 133(4):1081–1087. DOI: 10.1093/jn/133.4.1081.
- Jawien J., Nastalek P., Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2004;55(3):503.
- Tran L.T., Yuen V.G., McNeill J.H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 2009;332(1-2):145–159. DOI: 10.1007/s11010-009-0184-4.
- Ригер Н.А., Апрятин С.А., Шипелин В.А., Гмошинский И.В. Иммунологические маркеры алиментарно-индуцированной гиперлипидемии у крыс линии Вистар. *Вопросы питания*. 2019;88(3):44–52. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10028.
- Романцова Т.И., Сыч Ю.П. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении. *Ожирение и метаболизм*. 2019;16(4):3–17. DOI: 10.14341/omet12218.
- Беспалова И.Д., Рязанцева Н.В., Калужин В.В. и др. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2013;117(2):5–9.

16. Шварц В. Воспаление жировой ткани (часть 1). Морфологические и функциональные проявления. *Проблемы эндокринологии*. 2009;55(4):44–49. DOI: 10.14341/probl200955444-49.
17. Крюков Н.Н., Гинзбург М.М., Киселева Е.В. Современный взгляд на роль асептического воспаления жировой ткани в генезе ожирения и метаболического синдрома. *Артериальная гипертензия*. 2013;19(4):305–310. DOI: 10.18705/1607-419X-2013-19-4-.
18. McCracken E., Monaghan M., Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin. Dermatol.* 2018;36(1):14–20. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
19. Lee B.-C., Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(3):446–462. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.05.017.
20. Кологривова И.В., Винницкая И.В., Кошельская О.А., Суслова Т.Е. Висцеральное ожирение и кардиометаболический риск: особенности гормональной и иммунной регуляции. *Ожирение и метаболизм*. 2017;14(3):3–10. DOI: 10.14341/OMET201733-10.
21. Kodavanti U.P. Respiratory toxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology. Academic Press*. 2014:217–239. DOI: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00012-9.
22. Лямина С.В., Шимшелашвили Ш.Л., Калиш С.В., Малышева Е.В., Ларионов Н.П., Малышев И.Ю. Изменение фенотипа и фенотипической пластичности альвеолярных макрофагов при заболеваниях легких, имеющих воспалительный компонент. *Пульмонология*. 2012;6:83–89. DOI: 10.18093/0869-0189-2012-0-6-83-89.
23. Кжышкова Ю.Г., Грачев А.Н. Маркеры моноцитов и макрофагов для диагностики иммунопатологий. *Патогенез*. 2012;10(1):14–19.
24. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14–20. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
25. Колотов К.А., Распутин П.Г. Моноцитарный хемотаксический протеин-1 в физиологии и медицине. *Пермский медицинский журнал*. 2018;35(3):99–105. DOI: 10.17816/pmj35399-105.
26. Rincon M., Irvin C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(9):1281–1290. DOI: 10.7150/ijbs.4874.
27. Durham A.L., Caramori G., Chung K.F., Adcock I.M. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. *Transl. Res.* 2016;167(1):192–203. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.08.004.
28. Wolf J., Rose-John S., Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70(1):11–20. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.05.024.

Вклад авторов

Воронкова О.В., Бирулина Ю.Г., Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна исследования, написание рукописи. Буйко Е.Е., Григорьева А.В., Чернышов Н.А., Мотлохова Е.А. – выполнение экспериментальной части исследования. Осихов И.А., Есимова И.Е. – анализ и интерпретация данных.

Информация об авторах

Воронкова Ольга Владимировна – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, voronkova-ov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9478-3429>

Бирулина Юлия Георгиевна – канд. биол. наук, доцент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск, birulina20@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1237-9786>

Иванов Владимир Владимирович – канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск, ivanovvv1953@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-9348-4945>

Буйко Евгений Евгеньевич – лаборант, Центр доклинических исследований, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск, buykoevgen@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6714-1938>

Есимова Ирина Евгеньевна – д-р мед. наук, доцент, кафедра биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, orevi@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7508-2878>

Григорьева Анна Валерьевна – ассистент, кафедра биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, anna-grigoreva-87@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1962-9584>

Осиков Иван Анатольевич – канд. мед. наук, доцент, кафедра биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск, osikhov.25-88@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4873-7680>

Чернышов Никита Алексеевич – студент, СибГМУ, niki-rembo@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4008-5606>

Мотлохова Елизавета Андреевна – студентка, СибГМУ, emotlokhova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7409-3770>

(✉) **Воронкова Ольга Владимировна**, voronkova-ov@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.04.2022;
одобрена после рецензирования 21.04.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616.348/351-006.6-089.844
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-37-43>

Разработка и характеристика ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с колоректальным раком, для тестирования новых фармакологических субстанций

Гончарова А.С., Колесников Е.Н., Егоров Г.Ю., Максимов А.Ю., Шевченко А.Н., Непомнящая Е.М., Гвалдин Д.Ю., Курбанова Л.З., Ходакова Д.В., Кит С.О., Каймакчи О.Ю., Снежко А.В.

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

РЕЗЮМЕ

Цель. Создание модели ксенотрансплантата, полученного от пациента с колоректальным раком (КРР), и определение ее гистологических и молекулярных характеристик, таких как статус генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и наличие микросателлитной нестабильности.

Материалы и методы. Для создания первого поколения модели *in vivo* использовали опухоли от пациентов с КРР ($n = 4$) и иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude ($n = 20$), для создания второго, третьего и четвертого поколения – мышей этой же линии ($n = 3$ для каждого поколения). Измерения подкожных ксенотрансплантатов выполняли штангенциркулем, их размеры вычисляли по формуле Шрека для эллипсоида. Криоконсервацию выполняли путем погружения образцов в микс для криоконсервации (80% RPMI 1640, 10% фетальной бычьей сыворотки, 10% диметилсульфоксида) и хранения их на -80°C . Гистологическое исследование выполняли согласно стандартной методике (приготовление парафиновых блоков и окрашивание микросрезов гематоксилином и эозином). Мутации в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* определяли методом прямого секвенирования по Сэнгеру, микросателлитную нестабильность – методом фрагментарного анализа по пяти локусам: *Bat-25*, *Bat-26*, *NR21*, *NR24*, *NR27*.

Результаты. Стабильные перевиваемые ксенотрансплантаты КРР получены от двух пациентов из четырех. Среднее время ожидания между имплантацией и ростом трансплантата первого поколения составило 28 сут. Латентная фаза после криоконсервации была сопоставима с латентной фазой при создании первого поколения пациентоподобной модели. Показано, что в модели воспроизведены гистотип, степень дифференцировки и мутационный статус генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и микросателлитная нестабильность донорской опухоли.

Заключение. Созданная модель КРР человека охарактеризована с учетом динамики роста, способности переносить криоконсервацию, гистологических и молекулярно-генетических параметров.

Ключевые слова: ксенотрансплантат, колоректальный рак, модели *in vivo*, PDX модель, Balb/c Nude

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 НМИЦ онкологии.

Для цитирования: Гончарова А.С., Колесников Е.Н., Егоров Г.Ю., Максимов А.Ю., Шевченко А.Н., Непомнящая Е.М., Гвалдин Д.Ю., Курбанова Л.З., Ходакова Д.В., Кит С.О., Каймакчи О.Ю., Снежко А.В. Разработка и характеристика ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с колоректальным раком, для

✉ Гончарова Анна Сергеевна, fateyeva_a_s@list.ru

тестирования новых фармакологических субстанций. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):37–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-37-43>.

Development and characterization of patient-derived xenograft models of colorectal cancer for testing new pharmacological substances

Goncharova A.S., Kolesnikov E.N., Egorov G.Yu., Maksimov A.Yu., Shevchenko A.N., Nepomnyashchaya E.M., Gvaldin D.Yu., Kurbanova L.Z., Khodakova D.V., Kit S.O., Kaymakchi O.Yu., Snezhko A.V.

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

ABSTRACT

The aim of the study was to create a patient-derived xenograft (PDX) model of human colorectal cancer and to determine its histologic and molecular characteristics, such as the status of *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes and the presence of microsatellite instability.

Materials and methods. First generation xenograft models *in vivo* were created using tumors from patients with colorectal cancer ($n = 4$) and immunodeficient Balb/c Nude mice ($n = 20$); second, third, and fourth generation models were created in the same mouse line ($n = 3$ for each generation). A caliper was used to measure subcutaneous xenografts; their size was calculated by the ellipsoid formula. Cryopreservation involved immersing the samples in a freezing medium (80% RPMI 1640, 10% fetal bovine serum, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)) and storing them at -80°C . The histologic analysis was performed according to the standard technique (preparation of paraffin blocks and staining of microsections with hematoxylin and eosin). Mutations in the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes were determined by direct Sanger sequencing; microsatellite instability was determined by the fragment analysis at five loci: *Bat-25*, *Bat-26*, *NR21*, *NR24*, and *NR27*.

Results. Stable, transplantable xenografts of colorectal cancer were obtained from two out of four patients. The average waiting time from the implantation to the growth of the first generation xenograft was 28 days. The latency phase after cryopreservation was comparable to that at the creation of the first generation PDX model. The model reproduced the histotype, grade and mutational status of the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes, as well as microsatellite instability of the donor tumor.

Conclusion. The developed model of human colorectal cancer was characterized in terms of growth dynamics, cryopreservation tolerance, and histologic and molecular genetic parameters.

Keywords: xenograft, colorectal cancer, *in vivo* models, PDX model, Balb/c Nude

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with 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 the National Medical Research Center for Oncology.

For citation: Goncharova A.S., Kolesnikov E.N., Egorov G.Yu., Maksimov A.Yu., Shevchenko A.N., Nepomnyashchaya E.M., Gvaldin D.Yu., Kurbanova L.Z., Khodakova D.V., Kit S.O., Kaymakchi O.Yu., Snezhko A.V. Development and characterization of patient-derived xenograft models of colorectal cancer for testing new pharmacological substances. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):37–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-37-43>.

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) занимает одну из лидирующих позиций в структуре общей онкологической заболеваемости и характеризуется высокими

показателями летальности на поздних стадиях [1]. Смертность от КРР может быть снижена путем раннего выявления, а также при помощи выбора оптимальной схемы лечения при ведении пациентов с запущенными формами заболевания.

Стратегия лечения KPP зависит от стадии злокачественного процесса и его локализации, а также от молекулярных характеристик опухоли [2]. На сегодняшний день терапия пациентов с раком толстой кишки представляет собой хирургическую резекцию в сочетании со стандартной адъювантной химиотерапией, а для пациентов с местно-распространенным раком прямой кишки рекомендуется неoadъювантная радиохимиотерапия [2, 3]. Применение комбинации химиотерапии с новыми таргетными препаратами, такими как ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), и иммунотерапии способствуют дальнейшему увеличению средней выживаемости [4]. Установлено, что на таргетную терапию, включая препараты против EGFR или против VEGFR, положительно реагируют пациенты с диким типом гена *KRAS* в опухоли, тогда как пациенты с опухолями с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (*MSI*) получают больше пользы от иммунотерапии [5].

Несмотря на достигнутые положительные результаты в лечении больных KPP, во всем мире продолжается поиск новых противоопухолевых препаратов. На ранних этапах разработки потенциально полезных фармакологических субстанций используются панели линий раковых клеток в качестве инструмента для изучения биологических механизмов действия и проверки активности новых соединений *in vitro*. Однако клеточные линии не в состоянии воспроизвести гетерогенность человеческих опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*. Напротив, ксенотрансплантаты, полученные от пациента, или так называемые PDX (patient-derived xenograft), лучше отражают существующую молекулярную гетерогенность человеческих злокачественных новообразований и, следовательно, считаются более подходящими моделями для проведения исследований эффективности препаратов [6].

Использование PDX в качестве платформы для оценки терапевтических ответов в доклинических исследованиях требует стандартизации этих моделей, что особенно важно в отношении оценок, проведенных на молекулярном уровне [7].

В связи с этим целью работы было создание PDX модели KPP человека и определение ее молекулярных характеристик, таких как статус *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *MSI*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу выполнили на иммунодефицитных мышах линии Balb/c Nude (29 самок в возрасте 5–6 нед), полученных из SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Животных содержали в SPF-блоке вивария

НМИЦ онкологии в IVC-системе (Tecniplast, Италия) в помещении с контролируемыми параметрами климата (температура 21–26 °C, влажность воздуха 50–60%), корм и вода, предварительно стерилизованные автоклавированием, были предоставлены в свободном доступе. При выполнении всех манипуляций соблюдали «Правила проведения работ с использованием лабораторных животных».

Для создания подкожных PDX моделей KPP человека использовали образцы опухолей, полученных в результате хирургических резекций от пациентов, обратившихся в отделение абдоминальной онкологии № 1 ФГБУ «НМИЦ онкологии» в период с февраля по апрель 2020 г. От пациентов получено письменное информированное согласие на передачу биологического материала.

Для получения подкожных ксенографтов была выполнена имплантация фрагмента донорской опухоли размером $3 \times 3 \times 3$ мм под кожу правого бедра животных-реципиентов ($n = 5$ для образца, взятого от одного пациента). Для второго, третьего и четвертого поколения PDX использовали мышей этой же линии ($n = 3$ для каждого поколения). Имплантацию выполняли с применением инъекционной анестезии для лабораторных животных, используя препараты «Ксила» и «Золетил-100» в дозах 20 и 50 мг/кг соответственно. Эвтаназию производили методом дислокации шейных позвонков. Измерения подкожных ксенотрансплантатов выполняли штангенциркулем (Griff, Россия), их размеры вычисляли по формуле Шрека для эллипсоида – $V = a \times b \times c \times \pi/6$, где V – объем опухоли, мм³; a , b , c – измерения эллипсоида в трех плоскостях, мм.

Выделенные опухолевые узлы разделяли на фрагменты размером $3 \times 3 \times 3$ мм и затем помещали в микс для криоконсервации (80% RPMI 1640, 10% фетальной бычьей сыворотки, 10% диметилсульфоксида), криопробирки размещали в морозильной камере –80 °C. Восстановление замороженных образцов осуществляли путем погружения в водяную баню при 37 °C и последующего помещения образцов в контейнер с питательной средой RPMI 1640. После процедуры разморозки проводили процедуру имплантации опухолевых фрагментов. Фрагменты донорской и ксеногенных опухолей фиксировали в 10%-м формалине в течение 24 ч, после этого заключали в парафин, затем готовили гистологические микросрезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартной методике.

Геномную ДНК из образцов PDX экстрагировали с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и станции автоматического выделения нуклеиновых кислот QIAcube Connect (Qiagen,

Германия). Методом прямого секвенирования по Сэнгеру (AB3500, LifeTechnologies, США) идентифицировали мутации во 2, 3 и 4-м экзонах генов *KRAS* и *NRAS* и мутации в сайте V600 гена *BRAF*. Микросателлитную нестабильность определяли методом фрагментарного анализа (AB3500, LifeTechnologies, США) по пяти локусам *Bat-25*, *Bat-26*, *NR21*, *NR24*, *NR27*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образцы опухоли для создания PDX-модели KPP человека получены от четырех пациентов в результате операций по удалению опухолей толстой кишки (резекция сигмовидной кишки/поперечно-ободочной кишки). Свежерезицированные фрагменты

опухолей от каждого пациента транспортировали из оперблока в SPF-виварий в стерильном контейнере с питательной средой RPMI 1640 и в течение часа имплантировали иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude ($n = 5$ для образца, взятого от одного пациента). Характеристики пациентов и соответствующая им оценка результатов процедуры ксенотрансплантации представлены в таблице.

Стабильные перевиваемые PDX модели KPP были получены от двух пациентов из четырех. Среднее время ожидания между имплантацией и ростом PDX первого поколения (P1) составило 28 сут (диапазон 20–45 сут). Приживление и скорость роста свежеимплантированных фрагментов опухоли были неоднородны (рис. 1).

Таблица

Клинические характеристики пациентов и оценка результатов ксенотрансплантации опухолевого материала иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude						
№ процедуры	Способ получения образца	Локализация опухоли	Стадия TNM	Гистология	Результаты имплантации	Длительность латентной фазы, сут
PDX-1	Хирургическая резекция	Поперечно-ободочная кишка	$T_{4b}N_{1c}M_0$	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	2/5	25 (20–30)
PDX-2	Хирургическая резекция	Сигмовидная кишка	$T_3N_{1b}M_0$	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	3/5	31 (24–45)
PDX-3	Хирургическая резекция	Сигмовидная кишка	$T_3N_0M_0$	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	0/5	–
PDX-4	Хирургическая резекция	Сигмовидная кишка	$T_3N_{1b}M_0$	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	0/5	–



Рис. 1. Динамика роста PDX-1 первого поколения (P1)

Если в результате ксенотрансплантации не был зафиксирован рост подкожных опухолевых узлов в течении 60 сут, процедуру расценивали как неудовлетворительную и останавливали соответствующие наблюдения (PDX-3 и PDX-4). Для двух успешно установленных ксенотрансплантатов (PDX-1 и PDX-2) выполняли серийное пассирование для создания ксенотрансплантатов второго (P2, $n = 3$) и третьего поколения (P3, $n = 3$).

Для оценки влияния криоконсервации на приживление образцов и скорость роста подкожные опухолевые узлы PDX-1 третьего поколения были выделены, фрагментированы, подвержены криоконсервации согласно стандартной методике и хранению при -80°C . После восстановления из криоконсервации PDX-1 два образца из трех продемонстрировали линейный рост, образовав четвертое поколение (P4) (рис. 2).



Рис. 2. Динамика роста PDX-1, восстановленного после криоконсервации, четвертое поколение (P4)

Латентная фаза PDX-1 четвертого поколения (P4), полученного после криоконсервации, была несколько более продолжительной в сравнении с латентной фазой первого поколения (P1).

Гистологические характеристики первичной опухоли были сохранены в ходе пассирования, также они были воспроизведены в четвертом поколении PDX-1, полученным после криоконсервации. Пре-

параты описаны как умеренно дифференцированная аденокарцинома (G2).

В опухоли наблюдались очаги некроза с выраженным инфильтративным ростом и участки с высокой митотической активностью. В препаратах пациента – донора опухолевого материала определялась незначительная лимфолейкоцитарная инфильтрация (рис. 3).

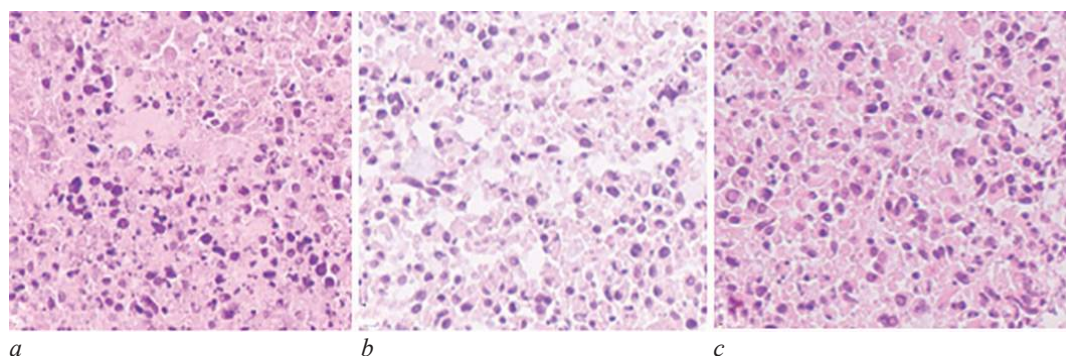


Рис. 3. Гистологические препараты опухоли пациента и соответствующие ей ксенотрансплантаты: *a* – опухоль пациента; *b* – ксеногенная опухоль 1-го поколения; *c* – ксеногенная опухоль 4-го поколения (после криоконсервации). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Молекулярно-генетическое исследование показало отсутствие мутаций во 2, 3 и 4-м экзонах генов *KRAS*, *NRAS* и в сайте V600 гена *BRAF*. Также определена микросателлитная стабильность как в образце пациента-донора опухолевого материала, так и в полученном от него ксенотрансплантате третьего (P3) и четвертого поколения (P4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках данной работы нами выполнено четыре процедуры подкожной имплантации фрагментов опухолей пациентов с КРР иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude, в результате чего получено две стабильные перевиваемые линии PDX, что соответствовало показателям, характеризующим приживление, продемонстрированным в научных публикациях [7, 8]. Известно, что успешное приживление клинических опухолевых образцов в модели PDX не универсально для всех типов опухолей, однако, согласно данным литературы, ксенотрансплантаты КРР обладают сравнительно высокими показателями приживления, колеблющимися в диапазоне от 50 до 70% [7–9].

В работе А. Katsiampoura и соавт. (2017) продемонстрировано, что образцы, полученные хирургическим способом, имели более высокие показатели приживления по сравнению с биопсийными, около 70 и 35% соответственно [8]. В связи с этим в данной работе для создания PDX был сделан вы-

бор в пользу получения фрагментов опухолей хирургическим способом, кроме того малые размеры биопсийных образцов делают затруднительным выбор зоны интереса для имплантации, а также создание серии ксенотрансплантатов с одномоментным дублированием проб для биобанка [10, 11]. Динамика роста PDX после криоконсервации (P4) показала, что длительность латентного периода в целом сопоставима с таковым при создании первого поколения (P1).

В нашей работе продемонстрирована способность PDX повторять морфологические особенности заболевания, а именно гистотип и степень дифференцировки опухоли. Кроме того, исследование последовательно созданных поколений P1, P2, P3 и P4 позволяет сделать вывод, что пассирование PDX не оказывает значительного воздействия на способность воспроизводить гистологический подтип, во всяком случае на ранних стадиях создания PDX, что согласуется с литературными данными [7]. В более масштабных исследованиях других авторов также показано, что степень дифференцировки донорских опухолевых клеток не влияет на установление линии PDX [8].

Модели PDX способны воспроизводить не только морфологические характеристики опухолей, но и молекулярно-генетическую гетерогенность, являющуюся фундаментальной чертой человеческого заболевания [12]. В ходе исследования отмечено, что

дикий тип генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* сохранился в ходе последовательного пассирования, кроме того, была установлена микросателлитная стабильность в образцах модели PDX третьего поколения (P3), что соответствовало молекулярно-генетическим характеристикам донорской опухоли. Это делает полученную модель пригодной для тестирования как новых фармакологических субстанций с цитотоксическим действием, так и препаратов на основе моноклональных антител.

В других работах обнаружено, что клинически значимые генетические мутации (*KRAS*, *BRAF* и *PIK3CA*) не влияют на развитие PDX, однако авторы считают, что трех генов недостаточно, чтобы полностью воспроизвести весь спектр биологии колоректального рака. Напротив, в масштабном исследовании М. Cybulska и соавт. (2018) по стратификации PDX KPP человека было проведено исследование транскриптомного и мутационного профилей первичных опухолей и полученных от них ксенотрансплантатов с использованием панели из 409 связанных с раком генов. В результате установлены отличия как генетических, так и транскриптомных профилей донорских опухолей и производных PDX, что, вероятно, являлось следствием субклональной эволюции на ранней стадии развития ксенотрансплантата или технических ошибок. В связи с этим авторы считают, что для стандартизации модели необходимо учитывать более стабильные параметры, такие как наличие таргетных мишеней, наряду с оценкой ответа на стандартную противоопухолевую терапию [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отвечая стремлению исследователей преодолеть определенные недостатки, связанные с тестированием лекарств на традиционных опухолевых моделях, нами была предпринята попытка разработки и стандартизации моделей PDX колоректального рака человека для представления широкого биологического и клинического спектра свойств человеческих опухолей. Для одной из полученных в ходе работы моделей PDX были охарактеризованы динамика роста опухолевых узлов в первой и четвертой генерации, способность переносить криоконсервацию, гистологические параметры, а также молекулярно-генетические критерии, имеющие важное значение при выборе терапевтической стратегии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Геворкян Ю.А., Колесников В.Е., Солдаткина Н.В., Харагезов Д.А., Дашков А.В., Каймакчи Д.О. и др. Малоинвазивные хирургические вмешательства в лечении больных метастатическим колоректальным раком. *Южно-Российский онкологический журнал*. 2020;1(2):22–27. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-2-3.
2. Baran B., Ozupek N.M., Tetik N.Y., Acar E., Bekcioglu O., Baskin Y. Difference between left-sided and right-sided colorectal cancer: a focused review of literature. *Gastroenterology Research*. 2018;1(4):264–273. DOI: 10.14740/gr1062w.
3. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Колесников В.Е., Харагезов Д.А. Лапароскопические комбинированные оперативные вмешательства при метастатическом колоректальном раке. *Колонпроктология*. 2015;4:19–23.
4. Punt C.J.A., Koopman M., Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nature reviews Clinical Oncology*. 2017;14(4):235–246. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.171.
5. Wang F., Bai L., Liu T.S., Yu Y.Y., He M.M., Liu K.Y. et al. Right- and left-sided colorectal cancers respond differently to cetuximab. *Cancer Communications*. 2015;34(9):384–393. DOI: 10.1186/s40880-015-0022-x.
6. Ireson C.R., Alavijeh M.S., Palmer A.M., Fowler E.R., Jones H. The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *British Journal of Cancer*. 2019;121(2):101–108. DOI: 10.1038/s41416-019-0495-5.
7. Cybulska M., Olesinski T., Goryca K., Paczkowska K., Statkiewicz M., Kopczynski M. et al. Challenges in stratifying the molecular variability of patient-derived colon tumor xenografts. *BioMed Research International*. 2018;2018:2954208. DOI: 10.1155/2018/2954208.
8. Katsiampoura A., Raghav K., Jiang Z.Q., Menter D.G., Varkaris A., Morelli M.P. et al. Modeling of patient-derived xenografts in colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017;16(7):1435–1442. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0721.
9. Conte N., Mason J.C., Halmagui C., Neuhauser S., Mosaku A., Yordanova G. et al. PDX finder: a portal for patient-derived tumor xenograft model discovery. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D1073–D1079. DOI: 10.1093/nar/gky984.
10. Jung J., Seol H.S., Chang S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*. 2018;50(1):1–10. DOI: 10.4143/crt.2017.307.
11. Ivanics T., John R., Bergquist J.R., Liu G., Kim M.P., Kang Y. et al. Patient-derived xenograft cryopreservation and reanimation outcomes are dependent on cryoprotectant type. *Laboratory Investigation*. 2018;98(7):947–956. DOI: 10.1038/s41374-018-0042-7.
12. Yoshida G.J. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1):4. DOI: 10.1186/s13045-019-0829-z.

Благодарности

Выражаем благодарность Олеся Андреевне Оссовской за перевод текста рукописи на английский язык.

Вклад авторов

Гончарова А.С. – концепция и дизайн исследования. Колесников Е.Н. – проведение хирургических манипуляций. Егоров Г.Ю. – сбор клинических данных о пациентах. Максимов А.Ю. – сбор и анализ данных, проведение операций. Шевченко А.Н. – сбор и анализ данных. Непомнящая Е.М. – проведение гистологического исследования. Гвалдин Д.Ю. – оформление библиографии. Курбанова Л.З. – написание текста, техническое редактирование. Ходакова Д.В. – написание текста рукописи. Кит С.О., Снежко А.В. – редактирование текста рукописи. Каймакчи О.Ю. – анализ и интерпретация данных.

Информация об авторах

Гончарова Анна Сергеевна – канд. биол. наук, зав. испытательным лабораторным центром, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, fateyeva_a_s@list.ru, <http://orcid.org/0000-0003-0676-0871>

Колесников Евгений Николаевич – канд. мед. наук, зав. отделением абдоминальной онкологии № 1, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, onko-sekretar@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9749-709X>

Егоров Георгий Юрьевич – аспирант, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, egorovgu@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-1413-6406>

Максимов Алексей Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, зам. генерального директора по перспективным научным разработкам, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, onko-sekretar@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1397-837X>

Шевченко Алексей Николаевич – д-р мед. наук, профессор, зав. отделением онкоурологии, врач-уролог, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, alexshew@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9468-134X>

Непомнящая Евгения Марковна – д-р мед. наук, профессор, врач-патологоанатом, патологоанатомическое отделение, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, mloi-patology@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-0521-8837>

Гвалдин Дмитрий Юрьевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, 89dmitry@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8633-2660>

Курбанова Луиза Зулкаидовна – мл. науч. сотрудник, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, luizacurbanowa@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3436-1325>

Ходакова Дарья Владиславовна – мл. науч. сотрудник, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, coctail.moxuto@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Кит Сергей Олегович – мл. науч. сотрудник, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, onko-sekretar@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1566-8906>

Каймакчи Олег Юрьевич – д-р мед. наук, врач-хирург, отделение абдоминальной онкологии № 2, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, onko-sekretar@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7556-9897>

Снежко Александр Владимирович – д-р мед. наук, врач-хирург, отделение абдоминальной онкологии № 1 с группой рентгенэндоваскулярных методов диагностики и лечения, НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, snezko.sania@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3998-8004>

(✉) Гончарова Анна Сергеевна, fateyeva_a_s@list.ru

Поступила в редакцию 03.02.2022;
одобрена после рецензирования 27.02.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616-006.6-085.28.065:616.1-02]-055.2
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-44-53>

Фармакогенетика в лечении антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний

Гракова Е.В.¹, Копьева К.В.¹, Шилов С.Н.², Березикова Е.Н.², Попова А.А.²,
Неупокоева М.Н.², Ратушняк Е.Т.², Калюжин В.В.³, Тепляков А.Т.¹

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Определить роль полиморфизмов генов $\beta 1$ -адренорецептора (*ADRB1*) (Arg389Gly, rs1801253) и ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (*I/D*, rs4343) в оценке эффективности терапии β -блокатором (карведилолом) и ингибитором АПФ (эналаприлом) у женщин с антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью (АИК) и без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в течение 12-месячного периода наблюдения.

Материалы и методы. В исследование включены 82 женщины в возрасте 45,0 (42,0; 50,0) лет с АИК и без ССЗ в анамнезе. Эхокардиографию и определение уровня NT-proBNP в сыворотке крови выполняли исходно и через 12 мес после включения в исследование. Оценку полиморфизмов генов *ADRB1* и *ACE* проводили с помощью полимеразной цепной реакции исходно.

Результаты. У носителей генотипа G/G гена *ADRB1* и генотипа G/G гена *ACE* (*I/D*, rs4343) диагностировано значительное увеличение фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ), уменьшение размеров ЛЖ и левого предсердия (ЛП), а также снижение уровней NT-proBNP. У носителей других генотипов наблюдалось дальнейшее прогрессирование АИК, что проявлялось снижением ФВ ЛЖ и увеличением размеров ЛЖ и ЛП.

Заключение. Оценка полиморфизмов генов *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) и *ACE* (*I/D*, rs4343) может быть рекомендована до начала лечения АИК у женщин без ССЗ в анамнезе, чтобы определить, какие больные будут иметь преимущества от терапии карведилолом и эналаприлом, а также выделить приоритетную группу больных для персонализированной интенсификации и оптимизации лечения с целью уменьшения развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Ключевые слова: антрациклин-индуцированная кардиотоксичность, сердечная недостаточность, полиморфизмы генов, β -адреноблокатор, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента

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

Источник финансирования. Фундаментальное научное исследование «Изучение механизмов структурного и функционального ремоделирования миокарда при разных фенотипах хронической сердечной недостаточности ишемической и неишемической этиологии» № 122020300045-5.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ.

Для цитирования: Гракова Е.В., Копьева К.В., Шилов С.Н., Березикова Е.Н., Попова А.А., Неупокоева М.Н., Ратушняк Е.Т., Калюжин В.В., Тепляков А.Т. Фармакогенетика в лечении антрациклин-индуцированной кардиотоксичности у женщин без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):44–53. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-44-53>.

Pharmacogenetics in treatment of anthracycline-induced cardiotoxicity in women without prior cardiovascular diseases

Grakova E.V.¹, Kopeva K.V.¹, Shilov S.N.², Berezikova E.N.², Popova A.A.², Neupokoeva M.N.², Ratushnyak E.T.², Kalyuzhin V.V.³, Teplyakov A.T.¹

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMCC), Russian Academy of Sciences 111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University (NSMU)
1, Pirogova Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the role of polymorphisms in adrenoceptor beta 1 (*ADRB1*) (Arg389Gly, rs1801253) and angiotensin-converting enzyme (*ACE*) (I/D, rs4343) genes in assessing the effectiveness of β -blocker (carvedilol) and ACE inhibitor (enalapril) therapy in women with anthracycline-induced cardiotoxicity (AIC) without prior cardiovascular diseases (CVD) during 12-month follow-up.

Materials and methods. A total of 82 women (average age 45.0 (42.0; 50.0) years) with AIC and without prior CVD were included in the study. Echocardiography was performed and serum levels of NT-proBNP were determined at baseline and at 12 months after the enrollment. Gene polymorphisms in *ADRB1* and *ACE* genes were evaluated by polymerase chain reaction at baseline.

Results. Carriers of the G/G genotype in the *ADRB1* gene and G/G genotype in the *ACE* (I/D, rs4343) gene showed a significant increase in left ventricular ejection fraction (LVEF), a decrease in the size of the left ventricle (LV) and left atrium (LA), and a fall in the NT-proBNP level. Carriers of other genotypes had further progression of AIC which was manifested through a decrease in LVEF and an increase in the size of LV and LA.

Conclusion. Evaluation of gene polymorphisms in *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) and *ACE* (I/D, rs4343) genes may be recommended before treatment initiation for AIC in women without prior CVD to determine who will benefit from carvedilol and enalapril therapy, as well as to identify a priority group of patients for personalized intensification and optimization of treatment for decreasing development of adverse cardiovascular events.

Keywords: anthracycline-induced cardiotoxicity, heart failure, gene polymorphisms, β -blocker, angiotensin-converting enzyme inhibitor

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

Source of financing. Basic research “Study of the mechanisms of structural and functional myocardial remodeling in different phenotypes in heart failure of ischemic and non-ischemic etiology” No. 122020300045-5.

Conformity with 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 Cardiology Research Institute of Tomsk NRMCC.

For citation: Grakova E.V., Kopeva K.V., Shilov S.N., Berezikova E.N., Popova A.A., Neupokoeva M.N., Ratushnyak E.T., Kalyuzhin V.V., Teplyakov A.T. Pharmacogenetics in treatment of anthracycline-induced cardiotoxicity in women without prior cardiovascular diseases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):44–53. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-44-53>.

ВВЕДЕНИЕ

Антрациклины являются важным компонентом многих схем химиотерапии, однако их применение связано с повышенным риском развития кардиотоксичности и сердечной недостаточности (СН) [1]. Вследствие роста числа выживших после онкопатологии пациентов, увеличивается и частота антрациклин-индуцированной кардиотоксичности (АИК). Однако для данной когорты пациентов не разработана оптимальная первичная профилактическая стратегия [2], а также не существует специфических методов лечения. Субклиническое повреждение клеток миокарда антрациклинами может проявляться как бессимптомной левожелудочковой дисфункцией, так и симптоматической СН, и оба данных состояния потенциально могут инициировать развитие необратимой кардиомиопатии. Однако если ранняя АИК, развившаяся в первые 12 мес, часто обратима, то поздняя включает в себя каскад повреждений, которые приводят к практически необратимым изменениям [3].

Лечение АИК в настоящее время включает стандартную терапию застойной СН с применением ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), β -блокаторов и петлевых диуретиков [4]. Эналаприл и карведилол являются одними из основных препаратов для лечения АИК, которые эффективны в снижении частоты систолической дисфункции левого желудочка и предотвращении снижения фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) при АИК [2, 5, 6], при этом не все пациенты отвечают на терапию данными препаратами. Существуют респондеры, у которых наблюдается увеличение ФВ ЛЖ после начала терапии, и нереспондеры, у которых ФВ ЛЖ не только не увеличивается, а иногда даже снижается, несмотря на оптимальное медикаментозное лечение [7]. Генетические факторы могут играть важную роль в ответе пациентов на проводимое лечение и потенциально могут помочь идентифицировать подгруппу пациентов с АИК для интенсификации и оптимизации лечения с целью уменьшения развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [8].

Таким образом, цель исследования – оценка роли полиморфизмов генов $\beta 1$ -адренорецептора (АР) (*ADRB1*) (Arg389Gly, rs1801253) и АПФ (I/D, rs4343) в оценке эффективности терапии β -блокатором (карведилолом) и ингибитором АПФ (эналаприлом) у женщин с АИК и без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в течение 12-месячного периода наблюдения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Исследование являлось проспективным, наблюдательным, одноцентровым. Всего с февраля 2019 г. по февраль 2020 г. в исследование включены 82 женщины с развившейся через 12 мес после химиотерапии АИК.

Критерии включения: 1) женщины с раком молочной железы без предшествующих ССЗ, у которых развилась АИК; 2) химиотерапевтическое лечение: комбинация доксорубицина и циклофосфида (схема AC) либо комбинация доксорубицина, циклофосфида и доцетаксела (схема TAC); 3) уровни NT-proBNP ≥ 125 пг/мл; 4) ремиссия рака молочной железы.

Критерии развития АИК: снижение ФВ ЛЖ ≥ 10 единиц от исходных значений или значения ФВ ЛЖ менее 55% с симптомами СН и уровнями NT-proBNP ≥ 125 пг/мл через 12 мес после завершения химиотерапии.

Критерии исключения: 1) сахарный диабет 1-го и 2-го типа; 2) ишемическая болезнь сердца; 3) гипертония; 4) пороки клапанов и предшествующие кардиомиопатии любой этиологии; 5) сердечная недостаточность с альтернативной причиной проявления (тяжелые заболевания легких, первичная легочная гипертензия в анамнезе, анемия, индекс массы тела > 50 кг/м²); 6) предшествующее лечение любыми сердечно-сосудистыми препаратами, включая ингибиторы АПФ и β -адреноблокаторы; 7) сопутствующая тяжелая почечная, печеночная или полиорганная недостаточность; 8) признаки лекарственной непереносимости; 9) хронический алкоголизм или психические расстройства; 10) патология яичников или гормональный дисбаланс.

Образцы крови получены путем венопункции, а адекватные образцы сыворотки после центрифугирования хранились при температуре -24 °C с одним циклом замораживания/оттаивания. Уровни NT-proBNP в сыворотке определяли с помощью иммуноферментного анализа (Biomedica иммуноанализы, Австрия).

Для определения полиморфизма генов забирались буккальный эпителий. ДНК выделяли из клеток буккального эпителия с помощью фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование гена *ADRB1* (полиморфизм Arg389Gly, rs1801253) и I/D гена *ACE* (I/D, rs4343) проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Для контроля результатов генотипирования использовали тест равновесия Харди – Вайнберга, который проводился с помощью онлайн-программы на сайте Института генетики человека (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Все пациенты получали терапию β -блокатором (карведилолом) и ингибитором АПФ (эналаприлом) для лечения АИК. Дозы препаратов титровали до максимально переносимых. Учитывая тот факт, что в исследование были включены женщины без ССЗ в анамнезе, то средняя доза карведилола составила 50 (25; 50) мг/сут, а эналаприла – 10 (10; 20) мг/сут.

Неблагоприятное течение АИК определяли как появление или ухудшение симптомов/признаков СН, снижение ФВ ЛЖ более чем на 5 единиц или увеличение функционального класса (по NYHA) на 1 единицу и более. Пациенты, которые не соответствовали данным критериям, имели благоприятное течение.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0 пакета R версия 2. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}; Q_{75})$. Для проверки статистических гипотез при анализе количественных показателей использовали критерий Манна – Уитни при сравнении двух независимых групп. При анализе качественных признаков проводили анализ таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 Пирсона. Если имелись ячейки с ожидаемой частотой меньше 5, то применяли двусторонний точный критерий Фишера или поправку Йетса (для таблиц 2×2). Отношения шансов (ОШ) для полиморфизмов гена определялись с помощью логистической регрессии. Все значения p являлись двусторонними. Критический уровень значимости p для всех используемых процедур статистического анализа принимали равным 0,05. Расчетная мощность анализа (power calculation) составила 72,6%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходно обследованы 303 женщины в возрасте 45,0 (42,0; 50,0) лет с раком молочной железы и без сердечно-сосудистых заболеваний и факторов риска (ФВЛЖ 67,0 (62; 70)%), получавших химиотерапевтическое лечение. Кумулятивная доза доксорубина составила 300–360 мг/м². Через 12 мес после окончания химиотерапии у 82 пациентов развились симптомы СН (I–III функциональный класс (ФК) по NYHA) и было диагностировано снижение ФВ ЛЖ на 25,2% с 65,5 (61; 70) до 49 (47; 52)%. Данные пациенты были включены в исследование, и для лечения АИК им назначены карведилол и эналаприл в максимально переносимых дозировках.

Все пациентки обследованы через 12 мес терапии и разделены на две группы: первую группу ($n = 31$) составили больные с неблагоприятным течением АИК, вторую ($n = 51$) – с благоприятным. Исходные клинико-демографические характеристики не различались между группами (табл. 1). Эхокардиографические параметры также были одинаковыми в обеих группах. Однако через 12 мес после начала лечения в первой группе ФВ ЛЖ достоверно ($p < 0,001$) снизилась на 10,0% с 50 (47; 53) до 45 (44; 49)%; конечно-систолический размер (КСР) увеличился на 3,0% ($p = 0,037$) и конечно-диастолический размер (КДР) – на 4,0% ($p = 0,001$), размер левого предсердия (ЛП) возрос на 3,2% (0,001), дистанция теста 6-минутной ходьбы (ТШХ) уменьшилась ($p = 0,046$) на 5,4%. Во второй группе ФВ ЛЖ достоверно ($p = 0,005$) увеличилась на 6% с 49 (46; 51) до 52 (47; 55)%; уровни NT-proBNP снизились на 22,5% ($p < 0,001$), дистанция ТШХ возросла ($p = 0,011$) на 11,6% (табл. 2).

Наличие генотипа C/G гена *ADRB1* rs1801253 (ОШ = 2,01; $p = 0,004$) и генотипа A/A гена *ACE* rs4343 (ОШ = 4,21; $p = 0,003$) ассоциировалось с дальнейшим снижением ФВ ЛЖ и прогрессированием симптомов СН несмотря на проводимую терапию. Генотип G/G гена *ADRB1* rs1801253 (ОШ = 0,55; $p < 0,001$) и генотип G/G гена *ACE* rs4343 (ОШ = 0,65; $p = 0,001$) были значимо связаны с улучшением симптомов СН и увеличением ФВ ЛЖ на 6%. Таким образом, пациенты с данными генотипами имели пользу от терапии β -блокатором (карведилолом) и ингибитором АПФ (эналаприлом) для лечения АИК (табл. 3).

Не было выявлено различий в эхокардиографических параметрах и уровнях NT-proBNP исходно и через 12 мес наблюдения в зависимости от функционального класса по NYHA. Проанализирована динамика эхокардиографических показателей, уровней NT-proBNP и дистанции ТШХ за период наблюдения в зависимости от полиморфизмов генов *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) и *ACE* (I/D, rs4343) (табл. 4). Женщины с генотипом G/G гена *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) имели абсолютную пользу от терапии карведилолом и эналаприлом. У данных больных ФВ ЛЖ достоверно ($p < 0,001$) увеличилась на 10,7% с 50 (48; 51) до 56 (53; 57)%, КСР снизился на 5,8% ($p < 0,001$) и КДР – на 6,0% ($p < 0,001$), размер ЛП уменьшился на 9,7% ($p < 0,001$), дистанция ТШХ возросла ($p = 0,008$) на 4,7%, а уровни NT-proBNP снизились на 34,8% ($p < 0,001$). У носителей генотипов C/C и C/G наблюдалось дальнейшее прогрессирование СН, что проявлялось снижением ФВ ЛЖ и увеличением размеров ЛЖ и ЛП.

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика пациентов на момент включения в исследование			
Показатель	Группа 1, <i>n</i> = 31	Группа 2, <i>n</i> = 51	<i>p</i>
Возраст, годы, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	50 (47; 52)	48 (45; 50)	0,066
Индекс массы тела, кг/м ² , <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	23,7 (21,3; 26,2)	24,3 (21; 26,3)	0,601
ЧСС, уд./мин, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	75 (68; 83)	75 (69; 81)	0,825
Систолическое АД, мм рт. ст., <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	115 (110; 120)	115 (110; 120)	0,744
Диастолическое АД, мм рт. ст., <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	70 (70; 80)	75 (70; 80)	0,012
ФК (по NYHA)			
ФК I, <i>n</i> (%)	16 (51,6)	26 (50,9)	0,987
ФК II, <i>n</i> (%)	13 (41,9)	20 (39,1)	0,675
ФК III, <i>n</i> (%)	2 (6,5)	5 (9,8)	0,423
Курение, <i>n</i> (%)	5 (16,1)	8 (15,7)	0,143
ХОБЛ, <i>n</i> (%)	4 (12,9)	7 (13,7)	0,981
Способность к деторождению, <i>n</i> (%)	10 (32,2)	18 (35,3)	0,877
Менопауза, <i>n</i> (%)	21 (67,8)	33 (64,7)	0,191
СКФ, мл/мин/м ² , <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	89 (78; 96)	88 (76; 98)	0,876
Тест 6-минутной ходьбы, м, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	426 (349; 482)	426 (359; 472)	0,601
Общий холестерин, мг/дл, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	93,6 (83,7; 102,6)	94,5 (84,6; 102,6)	0,882
ЛПНП, мг/дл, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	43,2 (39,6; 50,4)	43,2 (39,6; 50,5)	0,475
ЛПВП, мг/дл, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	41,44 (36,0; 42,2)	39,6 (36,0; 43,2)	0,323
Глюкоза, ммоль/л, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	5,3 (4,2; 6,1)	5,4 (4,1; 6,0)	0,541
Гемоглобин, г/л, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	109,5 (100; 117)	109,5 (99; 117,5)	0,798
NT-proBNP, пмоль/мл, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})	353,9 (265,4; 412,5)	317 (253; 372,9)	0,163

Примечание. СКФ – скорость клубочковой фильтрации (CKD-EPI); ЛПВП – липопротеиды высокой плотности; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; ФК – функциональный класс; ЧСС – частота сердечных сокращений.

Таблица 2

Динамика эхокардиографических параметров, уровня NT-proBNP и дистанции ТШХ в течение периода наблюдения, <i>Me</i> (Q_{25} ; Q_{75})									
Показатель	До химиотерапии		<i>p</i>	Через 12 мес после химиотерапии (перед назначением терапии)		<i>p</i>	Через 12 мес терапии карведилолом и эналаприлом		<i>p</i>
	Группа 1, <i>n</i> = 31	Группа 2, <i>n</i> = 51		Группа 1, <i>n</i> = 31	Группа 2, <i>n</i> = 51		Группа 1, <i>n</i> = 31	Группа 2, <i>n</i> = 51	
ФВЛЖ, %	67 (63; 70)	65 (60; 69)	0,119	50 (47; 53)	49 (46; 51)	0,117	45 (44; 49) [#]	52 (47; 55) [#]	<0,001
ЛП, мм	28 (26; 31)	28 (25,5; 31)		31 (29; 33)	31 (28; 32)	0,064	32 (30; 34) [#]	29 (27; 30) [#]	<0,001
КДР, мм	41 (39; 44)	42 (40; 44)	0,396	48 (45; 51)	50 (46; 51)	0,252	50 (48; 52) [#]	48 (47; 50)	0,005
КСР, мм	30 (27; 32)	29 (27; 30)	0,336	37 (34; 39)	36 (32; 38)	0,191	38 (37; 39) [#]	35 (32; 37)	<0,001
NT-proBNP, пг/мл	52,7 (45,9; 60,8)	51,1 (45; 61,9)	0,775	353,9 (265,4; 412,5)	317 (253; 372,9)	0,163	314,5 (259,3; 357,8)	245,6 (211,9; 276,8) [#]	<0,001
ТШХ, м	576 (552; 592)	575 (560; 589)	0,924	426 (349; 482)	426 (359; 472)	0,149	403 (341; 436) [#]	482 (375; 476) [#]	0,008

Примечание. Здесь и в табл. 4: КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер; ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка; ТШХ – тест 6-минутной ходьбы; [#] статистически значимые различия в сравнении с исходными значениями.

Таблица 3

Частота встречаемости генотипов, <i>n</i> , %, и отношение шансов							
Ген	Генотип	Группа 1, <i>n</i> = 31	Группа 2, <i>n</i> = 51	ОШ	95%-й доверительный интервал	χ^2	<i>p</i>
<i>ADRB1</i> (Arg389Gly, rs1801253)	C/C	10 (32,3)	11 (21,6)	0,98	0,87–1,12	1,16	0,282
	C/G	21 (67,7)	18 (35,3)	2,01	1,91–2,27	8,13	0,004
	G/G	0 (0,0)	22 (43,1)	0,55	0,18–1,11	18,27	<0,001
<i>ACE</i> (I/D, rs4343)	A/A	16 (51,5)	10 (19,6)	4,21	2,89–11,54	9,12	0,003
	A/G	14 (45,3)	24 (47,1)	0,98	0,9–1,13	0,04	0,867
	G/G	1 (3,2)	17 (33,3)	0,65	0,38–1,43	10,20	0,001

Таблица 4

Динамика эхокардиографических параметров, уровней NT-proBNP и дистанции ТШХ в течение периода наблюдения в зависимости от генотипов <i>ADRB1</i> (Arg389Gly, rs1801253) и <i>ACE</i> (I/D, rs4343), <i>Me</i> (<i>Q</i> ₂₅ ; <i>Q</i> ₇₅)								
Пока- затель	Через 12 мес после химиотерапии (перед назначением терапии)			<i>p</i>	Через 12 мес терапии карведилолом и эналаприлом			<i>p</i>
	<i>ADRB1</i> (Arg389Gly, rs1801253)				<i>ADRB1</i> (Arg389Gly, rs1801253)			
	C/C, <i>n</i> = 21	C/G, <i>n</i> = 39	G/G, <i>n</i> = 22		C/C, <i>n</i> = 21	C/G, <i>n</i> = 39	G/G, <i>n</i> = 22	
ФВЛЖ, %	49 (47; 51)	49 (46; 53)	50 (48; 51)	0,859	48 (45; 49) [#]	46 (44; 49) [#]	56 (53; 57) [#]	<0,001
ЛП, мм	30 (29; 33)	31 (28; 33)	31 (29; 32)	0,431	31 (30; 33) [#]	31 (29; 33)	28 (27; 30) [#]	<0,001
КДР, мм	49 (45; 50)	48 (46; 52)	50 (48; 51)	0,377	49 (48; 51) [#]	48 (46; 52) [#]	47 (46; 48) [#]	<0,001
КСР, мм	35 (33; 38)	37 (33; 39)	34 (32; 37)	0,335	37 (35; 38) [#]	37 (36; 39) [#]	32 (31; 34) [#]	<0,001
NT-proBNP, пг/мл	324,8 (285,7; 394,7)	318,9 (259,7; 381,8)	327,5 (260,1; 387,5)	0,976	311,7 (248,9; 350,9)	276,8 (242,8; 337,8) [#]	213,55 (195,3; 256,7) [#]	<0,001
ТШХ, м	426 (359; 445)	433 (348; 488)	423 (364; 467)	0,667	403 (350; 418) [#]	430 (345; 476)	444 (402; 476) [#]	0,038
<i>ACE</i> (I/D, rs4343)				<i>p</i>	<i>ACE</i> (I/D, rs4343)			<i>p</i>
A/A, <i>n</i> = 26		A/G, <i>n</i> = 38	G/G, <i>n</i> = 18		A/A, <i>n</i> = 26	A/G, <i>n</i> = 38	G/G, <i>n</i> = 18	
ФВЛЖ, %	52 (47; 53)	48,5 (46; 51)	50,5 (47; 51)		0,052	48 (45; 50) [#]	47 (45; 51)	
ЛП, мм	29 (27; 32)	31 (29; 33)	30 (29; 32)	0,125	32 (29; 33) [#]	32 (29; 33)	29 (27; 30) [#]	0,031
КДР, мм	49,5 (45; 50)	48 (46; 50)	50 (49; 52)	0,192	50 (48; 52) [#]	48 (47; 50)	48,5 (47; 50) [#]	0,116
КСР, мм	35,5 (33; 37)	36 (33; 39)	38 (34; 40)	0,237	37 (35; 38) [#]	36 (33; 38)	36 (32; 37) [#]	0,341
NT-proBNP, пг/мл	359,5 (265,4; 421,5)	321,1 (259,7; 387,5)	314,1 (279,6; 372,9)	0,678	287,6 (245,6; 350,9)	258 (214,7; 314,5) [#]	249,9 (195,3; 267,8) [#]	0,035
ТШХ, м	397 (335; 450)	433,5 (358; 482)	426 (378; 473)	0,252	397 (335; 432)	413,5 (376; 474)	449 (421; 487)	0,015

Женщины с генотипом G/G гена *ACE* (I/D, rs4343) также имели пользу от терапии карведилолом и эналаприлом. У данных пациентов ФВ ЛЖ достоверно ($p = 0,002$) увеличилась на 7% с 50,5 (47; 51) до 54 (50; 57)%, КСР уменьшился на 5,3% ($p = 0,007$), КДР – на 3,0% ($p = 0,038$), размер ЛП – на 3,3% ($p = 0,012$), а концентрации NT-proBNP снизились на 20,4% ($p = 0,007$). У носителей генотипа A/A отмечалось дальнейшее прогрессирование сердечной недостаточности, что проявлялось снижением ФВ ЛЖ и увеличением размеров ЛЖ, но имелась тенденция к снижению уровня NT-proBNP на 20% ($p = 0,052$). Эхокардиографические показатели у носителей A/G генотипа АПФ (I/D, rs4343) не изменились, но уровни NT-proBNP достоверно снизились на 19,6% ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие АИК в значительной степени обусловлено образованием свободных радикалов при воздействии доксорубина на митохондриальный окислительно-восстановительный цикл в кардиомиоцитах, что в конечном итоге приводит к дисфункции ЛЖ и, в наиболее тяжелых случаях, к необратимой застойной сердечной недостаточности [4]. Клинические последствия в данной области становятся более важными с увеличением использования кардиотоксичных препаратов [9] и ростом числа выживших после онкопатологии, что в результате приводит к увеличе-

нию случаев кардиотоксичности, вызванной антрациклинами [3]. Однако оптимальная стратегия профилактики и лечения АИК остается малоизученной. В настоящее время исследуются различные группы препаратов для лечения и профилактики АИК. Ингибиторы АПФ и β -блокаторы замедляют прогрессирование дисфункции ЛЖ при СН, но их эффективность в лечении АИК остается спорным вопросом.

Окислительный стресс как основной механизм развития и прогрессирования АИК может также способствовать снижению сократительной функции ЛЖ, развитию ремоделированию сердца, жизнеугрожающим аритмиям и внезапной сердечной смерти. Известно, что определенные группы препаратов обладают антиоксидантным действием, в том числе некоторые ингибиторы АПФ и β -блокаторы. Карведилол относится к неселективным β -адреноблокаторам с антиоксидантными свойствами [10]. Полученные в ряде исследований результаты указывают на то, что карведилол оказывает протективное действие при первичной профилактике АИК [2] и даже в низких дозах может ингибировать ее развитие [11]. Однако в исследовании CECCY (Carvedilol Effect in Preventing Chemotherapy Induced Cardiotoxicity), где было рандомизировано 200 пациентов с раком молочной железы, которым планировалась терапия антрациклинами (доксорубин 240 мг/м²), для получения терапии карведилолом или плацебо в качестве первичной профилактики, не было выявлено различий (когор-

та карведилола = 14,5% по сравнению с плацебо = 13,5%; $p = 1,0$) по частоте развития АИК [12].

М. Guglin и соавт. провели исследование с включением 468 женщин с HER2+ раком молочной железы, принимавших трастузумаб. Пациенты были рандомизированы для получения лечения лизиноприлом, карведилолом или плацебо. По результатам анализа также не выявлено существенной разницы (32% в группе плацебо, 29% в группе карведилола и 30% в группе лизиноприла) по наступлению первичной конечной точки – развитию АИК [13].

Еще одна группа препаратов с антиоксидантным действием, рассматриваемая для лечения и профилактики АИК, – это ингибиторы АПФ, такие как эналаприл. Установлено, что у пациентов с высоким риском развития АИК, по данным повышенных уровней тропонина I, раннее лечение эналаприлом предотвращало развитие и прогрессирование поздней кардиотоксичности [14]. В другом исследовании с использованием эналаприла и кандесартана по сравнению с плацебо установлено, что эналаприл приводил к снижению конечно-систолического напряжения стенки ЛЖ, хотя не улучшал максимальный сердечный индекс по данным эхокардиографии с физической нагрузкой [15].

D. Cardinale и соавт. показали, что пациенты, рандомизированные для получения эналаприла с целью первичной профилактики, имели меньшую частоту сердечных событий по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) [14]. В рандомизированном исследовании OVERCOME (Prevention of Left Ventricular Dysfunction with Enalapril and Carvedilol in Patients Submitted to Intensive Chemotherapy for the Treatment of Malignant Hemopathies) показано, что комбинированная терапия карведилолом с эналаприлом предотвращала снижение ФВ ЛЖ по сравнению с контрольной группой через 6 мес наблюдения ($p = 0,035$), однако различий по частоте наступления серьезных нежелательных явлений между группами не выявлено [16].

Таким образом, эналаприл и карведилол – одни из основных препаратов для лечения АИК, которые являются эффективными в снижении частоты развития систолической дисфункции ЛЖ и предотвращении снижения ФВ ЛЖ у больных с АИК [2, 5], однако не все пациенты отвечают на терапию данными группами препаратов. Существуют респондеры, у которых наблюдается увеличение ФВ ЛЖ после начала терапии, и нереспондеры, у которых ФВ ЛЖ не только не увеличивается, а иногда даже снижается, несмотря на оптимальное медикаментозное лечение [6]. Существует несколько причин, по которым пациенты могут не реагировать на лечение. Во-пер-

вых, это может зависеть от необратимости повреждения при АИК. Ранняя токсичность 1-го типа часто обратима, поздняя токсичность 2-го типа включает в себя каскад повреждений, которые приводят к практически необратимым изменениям [3]. Так как большинство исследований включают пациентов с ранней АИК, то до сих пор не установлена польза от карведилола и эналаприла для пациентов со 2-м типом АИК [12–14, 16]. Во-вторых, генетические факторы могут играть важную роль в ответе пациентов на проводимое лечение и потенциально могут помочь идентифицировать подгруппу пациентов с АИК для интенсификации и оптимизации лечения с целью уменьшения развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [7, 17].

В данном исследовании оценено влияние генетических факторов (полиморфизмы гена *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) и гена *ACE* (I/D, rs4343) на эффективность терапии β-блокатором (карведилолом) и ингибитором АПФ (эналаприлом) у женщин с АИК без ССЗ в течение 12-месячного периода наблюдения. В регуляции сердечно-сосудистой системы β1-АР играют ключевую роль. Изменения в экспрессии или свойствах β-АР могут иметь фенотипические последствия, влияющие на их сердечно-сосудистую или метаболическую функции, или могут способствовать развитию патологических состояний, таких как артериальная гипертензия, СН, астма или ожирение [18]. Оценка генотипа β1-АР предсказывала ответную реакцию на лечение β-блокаторами у пациентов с ишемической СН: пациенты, гомозиготные по полиморфизму β1-АР Arg389, являлись респондерами, в то время как пациенты, гомозиготные по полиморфизму β1 Gly389-АР, практически не отвечали на терапию данной группой препаратов [6, 19].

L.M. Baudhuin и соавт. показали, что у носителей генотипа G/G необходимо увеличение дозы β-блокаторов для достижения терапевтического эффекта при лечении СН [24]. В другом исследовании не выявлено связи между генотипами полиморфизма Arg389Gly гена *ADRB1* и эффективностью терапии карведилолом у 183 пациентов с СН с ишемической или неишемической кардиомиопатиями и ФВ ЛЖ $\leq 35\%$ [21]. Генотип C/C ассоциирован со значительно большим увеличением ФВ ЛЖ на фоне лечения карведилолом у больных с СН неишемической этиологии по сравнению с генотипами C/G или G/G гена *ADRB1* [22]. Эти различия в фармакогенетической эффективности карведилола при оценке полиморфизма Arg389Gly гена *ADRB1* в разных исследованиях указывают на необходимость дальнейшего изучения в данном направлении. Перспективна также совместная оценка с полиморфизмами гена *CYP2D6*,

влияющего на фармакокинетические эффекты препарата [23] и, соответственно, на режим дозирования препарата, несмотря на то, что R. Shihmanter и соавт. выявили следующее: изменение генотипа CYP2D6 не связано с изменением дозы карведилола у пациентов с сердечной недостаточностью [24].

В нашем исследовании мы оценили влияние полиморфизмов гена *ADRB1* на фармакодинамические эффекты карведилола. Таким образом, женщины с генотипом G/G гена *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) имели абсолютную пользу от терапии карведилолом и эналаприлом. У этих больных ФВ ЛЖ достоверно ($p < 0,001$) увеличилась на 10,7%; КСР уменьшился на 5,8% ($p < 0,001$) и КДД на 6,0% ($p < 0,001$), а размер ЛП – на 9,7% ($p < 0,001$), расстояние ТШХ возросло ($p = 0,008$) на 4,7%, а уровни NT-proBNP снизились на 34,8% ($p < 0,001$). У носителей генотипов C/C и C/G наблюдалось дальнейшее прогрессирование СН, что проявлялось снижением ФВ ЛЖ и увеличением размеров ЛЖ и ЛП. Однако в нашем исследовании выявлена низкая частота встречаемости генотипа G/G в группе с неблагоприятным течением АИК, что не противоречит литературным данным: генотип G/G редко встречается и в общей популяции вплоть до его полного отсутствия [25]. Поэтому необходимы дальнейшие наблюдения в отношении данного генотипа у больных с АИК.

В общей популяции ген АПФ связан с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и, более того, с множественными сердечно-сосудистыми факторами риска, хотя в некоторых исследованиях не обнаружены такие ассоциации [26]. Полиморфизмы гена АПФ были связаны с ответом на терапию ингибиторами АПФ, но нет единого мнения относительно того, какой аллель обладает более выраженным эффектом. В нашем исследовании впервые установлено, что женщины с генотипом G/G гена АПФ (I/D, rs4343) имели пользу от терапии карведилолом и эналаприлом. У этих больных ФВ ЛЖ достоверно ($p = 0,002$) увеличилась на 7%, КСР уменьшилась на 5,3% ($p = 0,007$) и КДР на 3,0% ($p = 0,038$), размер ЛП – на 3,3% ($p = 0,012$), а концентрации NT-proBNP снизились на 20,4% ($p = 0,007$). У носителей генотипа A/A отмечалось дальнейшее прогрессирование сердечной недостаточности, но имелась тенденция к снижению уровней NT-proBNP на 20% ($p = 0,052$). Эхокардиографические показатели у носителей генотипа A/G гена АПФ (I/D, rs4343) не изменились, но уровни NT-proBNP достоверно снизились на 19,6% ($p < 0,001$), что, вероятно, связано с сопутствующей терапией β-блокатором.

Следует отметить, что наши данные никоим образом не предполагают, что следует отменять тера-

пию β-блокаторами и ингибиторами АПФ только на основании генетического анализа. Однако оценка данных генов может способствовать идентификации подгруппы пациентов с АИК и дисфункцией ЛЖ, которым может помочь персонифицированная интенсификация и оптимизация лечения с целью уменьшения развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные свидетельствуют о том, что оценка полиморфизма гена *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) и гена *ACE* (I/D, rs4343) может быть рекомендована до начала лечения АИК у женщин без предшествующих сердечно-сосудистых заболеваний, чтобы идентифицировать подгруппу пациентов с АИК и дисфункцией ЛЖ, которым может помочь персонифицированная интенсификация и оптимизация лечения с целью уменьшения развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Носители генотипа G/G гена *ADRB1* и генотипа G/G гена *ACE* (I/D, rs4343) имели преимущества от терапии карведилолом и эналаприлом.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным ограничением исследования была небольшая выборка пациентов, короткий срок наблюдения и отсутствие «жестких» конечных точек. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы прояснить роль *ADRB1* (Arg389Gly, rs1801253) и гена *ACE* (I/D, rs4343) в оценке эффективности терапии β-блокатором карведилолом и ингибитором АПФ эналаприлом у пациенток с антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н. и др. Состояние сердечно-сосудистой системы у больных с антрациклиновой кардиомиопатией. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(3):127–136. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-127-136.
2. Kheiri B., Abdalla A., Osman M., Haykal T., Chahine A., Ahmed S. et al. Meta-Analysis of Carvedilol for the Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Am. J. Cardiol.* 2018;122(11):1959–1964. DOI: 10.1016/j.amjcard.2018.08.039.
3. McCune C., McGowan M., Johnston R., McCarthy A., Watson C., Dixon L. The prevalence of late anthracycline induced cardiotoxicity in survivors of childhood malignancy in Northern Ireland. *Heart*. 2019;105:A52. DOI: 10.1136/heartjnl-2019-ICS.64.
4. Volkova M., Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr. Cardiol. Rev.* 2011;7(4):214–220. DOI: 10.2174/157340311799960645.

5. Janbabai G., Nabati M., Faghihinia M., Azizi S., Borhani S., Yazdani J. Effect of enalapril on preventing anthracycline-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc. Toxicol.* 2017;17(2):130–139. DOI: 10.1007/s12012-016-9365-z.
6. Cardinale D., Colombo A., Lamantia G., Colombo N., Civelli M., De Giacomo G. et al. Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010;19;55(3):213–220. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.03.095.
7. Aminkeng F., Ross C.J., Rassekh S.R., Hwang S., Rieder M.J., Bhavsar A.P. et al. CPNDS Clinical Practice Recommendations Group. Recommendations for genetic testing to reduce the incidence of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2016;82(3):683–695. DOI: 10.1111/bcp.13008.
8. Elitok A., Oz F., Cizgici A.Y., Kilic L., Ciftci R., Sen F. et al. Effect of carvedilol on silent anthracycline-induced cardiotoxicity assessed by strain imaging: A prospective randomized controlled study with six-month follow-up. *Cardiol. J.* 2014;21(5):509–515. DOI: 10.5603/CJ.a2013.0150.
9. Bansal N., Adams M.J., Ganatra S., Colan S.D., Aggarwal S., Steiner R. et al. Strategies to prevent anthracycline-induced cardiotoxicity in cancer survivors. *Cardiooncology.* 2019;2;5:18. DOI: 10.1186/s40959-019-0054-5.
10. Book W.M. Carvedilol: a nonselective β blocking agent with antioxidant properties. *Congestive Heart Failure.* 2002;8:173–190. DOI: 10.1111/j.1527-5299.2002.00718.x.
11. Nabati M., Janbabai G., Baghyari S., Esmaili K., Yazdani J. Cardioprotective effects of carvedilol in inhibiting doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2017;69(5):279–285. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000470.
12. Avila M.S., Ayub-Ferreira S.M., de Barros Wanderley M.R. et al. Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity: The CECCY Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018;22;71(20):2281–2290. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.02.049.
13. Guglin M., Krischer J., Tamura R., Fink A., Bello-Matricaria L., McCaskill-Stevens W. et al. Randomized Trial of Lisinopril Versus Carvedilol to Prevent Trastuzumab Cardiotoxicity in Patients With Breast Cancer. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019;11;73(22):2859–2868. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.03.495.
14. Cardinale D., Colombo A., Sandri M., Lamantia G., Colombo N., Civelli M. et al. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation.* 2006;5;114(23):2474–2481. DOI: 10.1161/CIRCULATION-AHA.106.635144.
15. Silber J.H., Cnaan A., Clark B.J., Paridon S.M., Chin A.J., Rychik J. et al. Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines. *J. Clin. Oncol.* 2004;1;22(5):820–828. DOI: 10.1200/JCO.2004.06.022.
16. Bosch X., Rovira M., Sitges M., Domènech A., Ortiz-Pérez J.T., de Caralt T.M. et al. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (prevention of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive Chemotherapy for the treatment of Malignant hemopathies). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;11;61(23):2355–2362. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.02.072.
17. Nazarenko M.S., Markov A.V., Sleptsov A.A. et al. Comparative analysis of gene expression in vascular cells of patients with advanced atherosclerosis. *Biomed. Khim.* 2018;64(5):416–442. DOI: 10.18097/PBMC20186405416.
18. Brodde O.E. Beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008;22(2):107–125. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2007.00557.x.
19. Baudhuin L.M., Miller W.L., Train L., Bryant S., Hartman K.A., Phelps M. et al. Relation of ADRB1, CYP2D6, and UGT1A1 polymorphisms with dose of, and response to, carvedilol or metoprolol therapy in patients with chronic heart failure. *Am. J. Cardiol.* 2010;1;106(3):402–408. DOI: 10.1016/j.amjcard.2010.03.041.
20. Metra M., Covolo L., Pezzali N., Zacà V., Bugatti S., Lombardi C. et al. Role of beta-adrenergic receptor gene polymorphisms in the long-term effects of beta-blockade with carvedilol in patients with chronic heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2010;24(1):49–60. DOI: 10.1007/s10557-010-6220-5.
21. Chen L., Meyers D., Javorsky G., Burstow D. et al. Arg-389Gly-beta1-adrenergic receptors determine improvement in left ventricular systolic function in nonischemic cardiomyopathy patients with heart failure after chronic treatment with carvedilol. *Pharmacogenet. Genomics.* 2007;17(11):941–949. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3282ef7354.
22. Luzum J.A., Sweet K.M., Binkley P.F., Schmidlen T.J., Jarvis J.P., Christman M.F. et al. CYP2D6 genetic variation and beta-blocker maintenance dose in patients with heart failure. *Pharm. Res.* 2017;34(8):1615–1625. DOI: 10.1007/s11095-017-2104-8.
23. Shihmanter R., Nulman I., Goland S., Caspi A., Bar-Haim A., Harary I. et al. Variation in the CYP2D6 genotype is not associated with carvedilol dose changes in patients with heart failure. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2014;39(4):432–438. DOI: 10.1111/jcpt.12154.
24. Katsarou M.S., Karathanasopoulou A., Andrianopoulou A., Desiniotis V., Tzinis E., Dimitrakis E. et al. Beta 1, Beta 2 and Beta 3 adrenergic receptor gene polymorphisms in a south-eastern European population. *Front. Genet.* 2018;28;9:560. DOI: 10.3389/fgene.2018.00560.
25. Uemura K., Nakura J., Kohara K., Miki T. Association of ACE I/D polymorphism with cardiovascular risk factors. *Hum Genet.* 2000; 107(3):239–42. doi: 10.1007/s004390000358.
26. Niu T., Chen X., Xu X. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease: therapeutic implications. *Drugs.* 2002;62(7):977–993. DOI: 10.2165/00003495-200262070-00001.

Информация об авторах

Гракова Елена Викторовна – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение патологии миокарда, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, gev@cardio-tomsk.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4019-3735>

Копьева Кристина Васильевна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, отделение патологии миокарда, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, Kristin-kop@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2285-6438>

Шилов Сергей Николаевич – д-р мед. наук, доцент, кафедра патологической физиологии и клинической патофизиологии, НГМУ, г. Новосибирск, newsib54@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-7777-6419>

Березикова Екатерина Николаевна – д-р мед. наук, доцент, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, НГМУ, г. Новосибирск, berezikova@ngs.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9630-0213>

Попова Анна Александровна – д-р мед. наук, зав. кафедрой поликлинической терапии и общей врачебной практики, НГМУ, г. Новосибирск, ann24@ngs.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2645-162X>

Неупокоева Мария Николаевна – ассистент, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, НГМУ, г. Новосибирск, maria.neupokoeva@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3102-8156>

Ратушняк Елена Таировна – ассистент, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, НГМУ, г. Новосибирск, lalala777elena@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4223-3457>

Калюжин Вадим Витальевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, СибГМУ, г. Томск.

Тепляков Александр Трофимович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, Vgelen1970@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-0721-0038>

(✉) **Копьева Кристина Васильевна**, Kristin-kop@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.03.2022;
одобрена после рецензирования 05.07.2022;
принята к публикации 08.09.2022

УДК 616.24-002.5-06:612.226:577.29
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-54-62>

Молекулярные механизмы воспаления в патогенезе нарушений внешнего дыхания у больных туберкулезом легких

Дьякова М.Е.¹, Серебряная Н.Б.^{2,3,4}, Кирюхина Л.Д.¹, Эсмедяева Д.С.¹,
Яблонский П.К.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии (СПбНИИФ)
Россия, 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский проспект, 2-4

² Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ)
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова
(СЗГМУ им. И.И. Мечникова)
Россия, 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

⁴ Институт экспериментальной медицины (ИЭМ)
Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить функцию внешнего дыхания и ее связь с активностью воспаления и активностью ферментов пуринового метаболизма у больных острой и хронической формой туберкулеза легких (ТЛ).

Материалы и методы. У больных острой (ОФТЛ) и хронической формой ТЛ (ХФТЛ) оценивали активность аденозиндезаминазы (ADA-1, 2) в сыворотке крови (eADA), мононуклеарах и нейтрофилах, концентрацию экто-5'-нуклеотидазы (eNT5E) в сыворотке крови, CD26 (дипептидилпептидазы-4, DPPIV) в сыворотке крови и мононуклеарах, продукцию активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) в мононуклеарах и нейтрофилах, функцию внешнего дыхания (ФВД).

Результаты. У больных ТЛ выявлено: увеличение концентрации eNT5E и активности eADA-2 в сыворотке крови, стимулированной продукцией АФК нейтрофилами; снижение концентрации DPPIV (CD26) в мононуклеарах, продукции АФА мононуклеарами и нейтрофилами; при ХФТЛ снижение активности ADA-1 в мононуклеарах и концентрации DPPIV (CD26) в сыворотке крови; при ОФТЛ снижение активности eADA-1 в сыворотке крови, ADA-1 в нейтрофилах, продукции АФК мононуклеарами и увеличение спонтанной продукции АФК нейтрофилами. Выявлены корреляции между параметрами ФВД и концентрацией eNT5E в сыворотке крови, спонтанной продукцией АФК мононуклеарами, АФА нейтрофилами при ХФТЛ; активностью eADA-2 в сыворотке крови, ADA-1 в нейтрофилах, DPPIV (CD26) в мононуклеарах, продукцией АФК и АФА мононуклеарами и нейтрофилами.

Заключение. Полученные данные позволяют связать регуляцию внешнего дыхания с показателями пуринового обмена, в частности с концентрацией и активностью ферментов, ответственных за образование и метаболизм аденозина, определяющих его уровень вне клеток и внутри мононуклеаров и нейтрофилов, с экспрессией кофакторных молекул, а также с длительностью активации клеток врожденного иммунитета, нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, определяемой в значительной степени возможностями аденозиновой регуляции.

Ключевые слова: пуриновый метаболизм, воспаление, туберкулез легких, функция внешнего дыхания

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

✉ Дьякова Марина Евгеньевна, marinadyakova@yandex.ru

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено независимым этическим комитетом Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (протокол № 57 от 11.09.2012).

Для цитирования: Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Кирюхина Л.Д., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К. Молекулярные механизмы воспаления в патогенезе нарушений внешнего дыхания у больных туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):54–62. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-54-62>.

Molecular mechanisms of inflammation in the pathogenesis of respiratory disorders in patients with pulmonary tuberculosis

Dyakova M.Ye.¹, Serebryanaya N.B.^{2,3,4}, Kiryukhina L.D.¹, Esmedlyeva D.S.¹, Yablonskiy P.K.^{1,2}

¹ St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology
2–4, Ligovsky Av., St. Petersburg, 191036, Russian Federation

² St. Petersburg University
7–9, Universitetskaya Emb., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

³ I.I.Mechnikov North-Western State Medical University
41, Kirochnaya Str., St. Petersburg, 191015, Russian Federation

⁴ Institute of Experimental Medicine
12, Akademika Pavlova Str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To assess external respiration (ER) and its relationship with the activity of enzymes involved in purine metabolism in patients with acute and chronic forms of pulmonary tuberculosis (TB).

Materials and methods. In patients with acute and chronic TB, we assessed the activity of adenosine deaminase (ADA)-1, 2 in the blood serum (eADA), mononuclear cells, and neutrophils, the concentration of ecto-5'-nucleotidase (eNT5E) in the blood serum, the level of CD26 (dipeptidyl peptidase-4, DPPIV) in the blood serum and mononuclear cells, production of reactive oxygen intermediates (ROI) and reactive nitrogen intermediates (RNI) in mononuclear cells and neutrophils, as well as parameters of ER.

Results. Patients with TB were found to have an increase in the concentration of eNT5E and eADA-2 activity in the blood serum, stimulated production of ROI in neutrophils, a decrease in the concentration of DPPIV (CD26) in mononuclear cells, and a fall in the production of RNI in mononuclear cells and neutrophils. In patients with chronic TB, a decrease in the activity of ADA-1 in mononuclear cells and a fall in the concentration of DPPIV (CD26) in the blood serum were noted. In patients with acute TB, a decrease in the activity of eADA-1 in the blood serum and ADA-1 in neutrophils, reduced production of ROI in mononuclear cells, and an increase in spontaneous production of ROI in neutrophils were revealed. Correlations were found between the parameters of ER and the concentration of eNT5E in the blood serum, spontaneous production of ROI in mononuclear cells and production of RNI in neutrophils in chronic TB, as well as between eADA-2 in the blood serum, ADA-1 in neutrophils, DPPIV (CD26) activity in mononuclear cells, and ROI and RNI production in mononuclear cells and neutrophils.

Conclusion. The data obtained make it possible to associate regulation of external respiration with parameters of purine metabolism, in particular with the concentration and activity of enzymes responsible for generation and metabolism of adenosine, that determine its level outside cells and inside mononuclear cells and neutrophils, with expression of cofactor molecules, as well as with the duration of activation of cells in innate immunity, neutrophils, and monocytes/ macrophages, determined largely by the potential of adenosine regulation.

Keywords: purine metabolism, inflammation, pulmonary tuberculosis, respiratory function

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with 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 St. Petersburg State Research Institute of Phthiopulmonology (Protocol No. 57 of 11.09.2012).

For citation: Dyakova M.Ye., Serebryanaya N.B., Kiryukhina L.D., Esmelyaeva D.S., Yablonskiy P.K. Molecular mechanisms of inflammation in the pathogenesis of respiratory disorders in patients with pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):54–62. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-54-62>.

ВВЕДЕНИЕ

Треть населения мира инфицирована *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), и ежегодно регистрируется 10 млн новых случаев туберкулеза [1–3]. При туберкулезе легких (ТЛ) формируется гранулематозное воспаление, поддерживаемое сложным каскадом воспалительных сигнальных молекул – цитокинов и аутокинов, таких как пуриновый нуклеозид аденозин. Аденозин (ADO) контролирует активность, объем, продолжительность и разрешение воспалительной реакции, меняя метаболизм задействованных клеток через активацию специфических рецепторов (ADORA A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), широко представленных на клетках организма [4].

Показано, что при остром воспалении, в частности при повреждении легких, аденозин обладает противовоспалительным и тканезащитным действием [5–7]. Однако при хроническом повреждении легких аденозин усиливает провоспалительные и профибротические процессы [8].

В условиях воспаления, ишемии и гибели клеток концентрация внеклеточного аденозина увеличивается. Стрессированные клетки высвобождают аденозинтрифосфат, который ступенчато дефосфорилируется при скоординированной активности эктонуклеотидаз, в основном эктонуклеотидтрифосфатдифосфогидролазой 1 (CD39, E-NTPDase1) и экто-5'-нуклеотидазой (CD73, eNTP5E) до аденозина. Вне- и внутриклеточный аденозин дезаминируется аденозиндеаминазой (ADA) или трансформируется в аденозинмонофосфат ферментом аденозинкиназой [9].

Изоферменты ADA (ADA-1 и ADA-2) являются ключевыми ферментами путей спасения пуринов и крайне важны в контроле пуринового метаболизма [10]. ADA-1 локализуется не только в цитозоле и ядре клеток, но также в виде эктоформы присутствует на клеточной мембране, где создает комплексы с дипептидилпептидазой IV (CD26) и (или) аденозиновыми рецепторами A_1 и A_{2B} [11].

ADA-2 локализуется в основном во внеклеточном пространстве, преобладая в сыворотке крови. Основным источником ADA-2 являются моноциты-макрофаги, в которых сосуществуют обе изоформы,

ADA-1 и ADA-2 [12]. При физиологических концентрациях аденозина каталитическая активность ADA-2 близка к нулю, однако эта изоформа эффективна для дезаминирования при повышенных уровнях аденозина в слабокислой среде, например во время гипоксии [13].

Поскольку пуринергическая регуляция аденозинтрифосфатом и аденозином влияет на функциональное состояние клеток дыхательной и иммунной систем, изучение молекулярных механизмов воспаления в ткани легких может помочь в понимании патогенеза легочных повреждений у больных туберкулезом легких и указать новые мишени для направленной терапии, что необходимо для повышения эффективности лечения больных ТЛ.

Цель настоящего исследования – оценить функцию внешнего дыхания и ее связь с активностью воспаления и экспрессией, активностью ферментов пуринового метаболизма у больных острой и хронической формой туберкулеза легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 60 больных с верифицированным диагнозом «туберкулез легких», находившихся на лечении в клинике Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии. Группу больных острой формой ТЛ (ОФТЛ) составили 15 пациентов с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких, 6 мужчин и 9 женщин в возрасте 25,0–31,0 лет (средний возраст – 29,0 лет), хронической (ХФТЛ) – 45 с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких, 30 мужчин и 15 женщин в возрасте 28,0–42,0 года (средний возраст – 32,0 года). Всем больным с ТЛ проведено комплексное исследование функции внешнего дыхания. Критерий исключения – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких. В референтную (контрольную) группу (РГ) были включены 20 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Группы больных ТЛ значительно различались по статусу курения (курящие/некурящие – 33,3/66,7% и 71,4/28,6%; $p = 0,01$) и по длительности заболева-

ния (длительность заболевания до года – 100,0% и 17,1%; $p = 0,00001$): больные с ХФТЛ в 2 раза чаще курили и значительно дольше болели.

Пуриновый метаболизм оценивали по активности аденозиндезаминазы-1 и 2 (ADA-1 и ADA-2) в сыворотке крови (eADA-1 и eADA-2), лизате моноклеаров и нейтрофилов (путем трехкратного замораживания и оттаивания), определяемой методом G. Giusti (1974) на спектрофотометре PV 1251C (Беларусь); концентрации в сыворотке крови белков экто-5'-нуклеотидазы (eNT5E), CD26 (дипептидилпептидазы-4, DPPIV) (растворимая форма, sCD26 (DPPIV) и в лизате моноклеаров – методом ELISA (Ecto NT5E, USCN, Китай и Human sCD26 Platinum ELISA, eBioscience, Австрия). Продукцию активных форм кислорода фагоцитами оценивали по показателям респираторного взрыва в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест): спонтанному (НСТс.) и индуцированному зимозаном (НСТи).

Моноклеары (мн) выделяли из периферической крови в градиенте плотности верографин – фиколл (1,077 г/л), из оставшегося осадка (после лизиса эритроцитов и дополнительного центрифугирования) – нейтрофилы (нф). Генерацию оксида азота определяли по уровню нитритов (NO_2^-) и нитратов (NO_3^-) в моноклеарах и нейтрофилах методом ELISA (R&D Systems, Канада).

Комплексное исследование функции внешнего дыхания включало спирометрию, бодиплетизмографию, исследование диффузионной способности легких на установке MasterScreen Body Diffusion (VIASYS Healthcare, Германия) согласно международным рекомендациям по стандартизации легочных функциональных тестов и национальному руководству по функциональной диагностике [14–18]. Анализировались общая емкость легких (ОЕЛ), ее структура – жизненная емкость легких (ЖЕЛ), остаточный объем легких (ООЛ), отношение ООЛ/ОЕЛ, емкость вдоха (Евд.), резервный объем выдоха (РОВд.) и параметры, характеризующие проходимость дыхательных путей: объем форсированного выдоха за 1 с (ОФВ_1), отношение $\text{ОФВ}_1/\text{ФЖЕЛ}$ (индекс Генслера). Легочный газообмен оценивали по диффузионной способности легких (ДСЛ) и трансфер-коэффициенту по угарному газу – отношению ДСЛ к альвеолярному объему (ДСЛ/АО). Для исключения влияния антропометрических характеристик значения показателей, имеющих должные величины (Д), выражали в процентном отношении от Д для соответствующего пола, роста, массы тела, возраста. В качестве референтных значений использовали должные величины, предложенные Европейским сообществом угля и стали (European Coal and Steel Community, 1993) [19].

Анализ показателей функции внешнего дыхания у пациентов с ОФТЛ и ХФТЛ выявил, что значения большинства функциональных характеристик находились в пределах референтного диапазона, кроме значимо сниженного ДСЛ% (71,4 и 78,6% у больных ОФТЛ и ХФТЛ соответственно). При этом больные ТЛ значимо различались только по значению индекса Генслера, который был выше в группе с ОФТЛ по сравнению с группой с ХФТЛ (83,6 (75,9–85,7) и 76,5 (70,2–81,1) соответственно, $p = 0,025$).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ Statistica для Windows, версия 13.0. Метрические показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (LQ-UQ)$. Проверку гипотез однородности по двум выборкам проводили по U -критерию Манна – Уитни. При корреляционном анализе метрических величин использовали ранговый коэффициент Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение показателей пуринового метаболизма у обследованных больных ТЛ выявило по сравнению с референтной группой значимое увеличение концентрации eNT5E в сыворотке крови, от которой зависит образование аденозина, и снижение концентрации DPPIV (CD26) в лизатах моноклеаров. Это указывает на снижение экспрессии данного белка на мембране этих клеток, которое ведет к снижению его способности образовывать комплексы с eADA-1 и нарушает иммунорегуляторную способность моноцитов по отношению к Т-лимфоцитам (табл. 1). У больных ХФТЛ также была значимо снижена концентрация растворимой формы DPPIV (CD26) в сыворотке крови по сравнению с референтной группой.

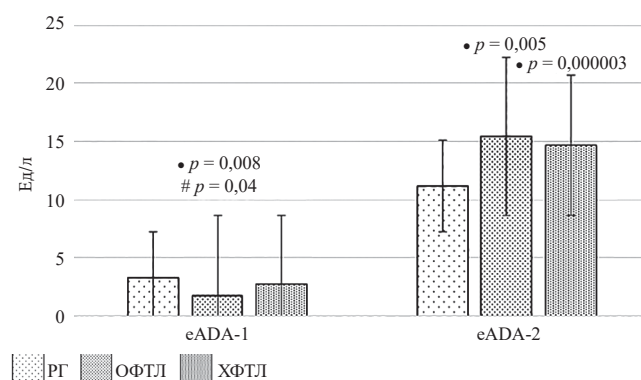
Таблица 1

Концентрация ферментов пуринового метаболизма у больных острой и хронической формой туберкулеза легких в сыворотке крови, $Me (LQ-UQ)$			
Показатель	Группа		
	РГ	ОФТЛ	ХФТЛ
eNT5E, нг/мл	0,06 (0,01–0,6)	0,7* ($p = 0,006$) (0,46–1,3)	0,9* ($p = 0,01$) (0,45–1,4)
sDPPIV(CD26), нг/мл	692,5 (625,0–875,0)	560,0 (550,0–585,0)	473,5* ($p = 0,04$) (265,0–628,2)
DPPIV(CD26) мн, нг/10 ⁶ клеток	19,2 (12,8–25,0)	1,46* ($p = 0,0004$) (1,03–3,0)	3,95* ($p = 0,0008$) (1,2–6,6)

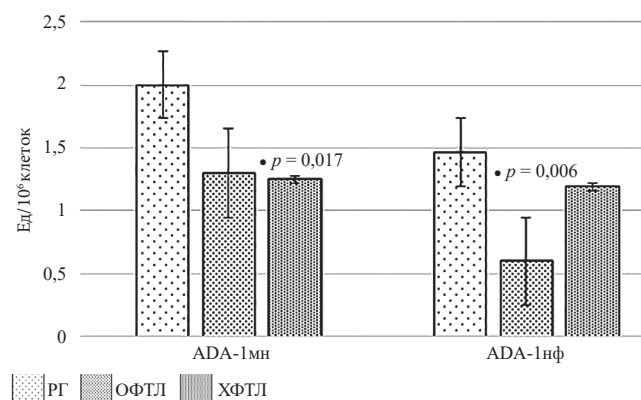
Примечание. РГ – референтная группа; ОФТЛ – острая форма туберкулеза легких; ХФТЛ – хроническая форма туберкулеза легких; eNT5E – экто-5'-нуклеотидаза; DPPIV(CD26) – дипептидилпептидаза-4; sDPPIV(CD26) – ее растворимая форма.

* уровень статистической значимости различий по сравнению с референтной группой.

Активность изоферментов $eADA-1$ и $eADA-2$ в сыворотке крови (рис.1, а) в группах больных ТЛ в основном изменялась однонаправленно по сравнению с референтной группой. В случае $eADA-1$ выявлено значимое снижение активности для больных ОФТЛ, а в случае $eADA-2$, основная функция которого – деградация внеклеточного аденозина, повышение активности было зарегистрировано в обеих группах больных ТЛ. Активность $ADA-1$ в лизате мононуклеаров была ниже у больных ХФТЛ, чем в референтной группе, а в лизате нейтрофилов – у больных ОФТЛ. Однако различий по активности $ADA-1$ в лизате мононуклеаров и нейтрофилов у больных ОФТЛ и ХФТЛ не выявлено ($p = 0,91$ и $p = 0,28$ соответственно, рис. 1, б).



а



б

Рис. 1. Показатели вне- (а) и внутриклеточной (б) активности аденозиндеаминазы в группах больных ОФТЛ и ХФТЛ и РГ. Здесь и на рис. 2, 3: РГ – референтная группа, ОФТЛ – острая форма туберкулеза легких, ХФТЛ – хроническая форма туберкулеза легких. $eADA-1$ и $eADA-2$ – активность аденозиндеаминазы 1 и 2 в сыворотке крови,

$ADA-1$ – активность аденозиндеаминазы

• уровень статистической значимости различий по сравнению с референтной группой, # уровень статистической значимости различий между группами; уровень значимости приведен в скобках

Таким образом, в обеих группах больных, как с острой, так и хронической формой заболевания, распределение активности ферментов пуринового метаболизма и ассоциированных с ними молекул указывает на повышение концентрации внеклеточного аденозина и снижение иммунорегуляторных свойств клеток иммунной системы. При этом у больных ОФТЛ значимое снижение активности $eADA-1$ создает условия для более выраженного повышения уровня аденозина, угнетения функций моноцитов и Т-лимфоцитов.

Известно, что клеткам врожденного иммунитета – моноцитам, макрофагам и нейтрофилам – принадлежит ключевая роль в контроле над распространением *Mtb*; и активностью тканевого воспаления. О функциональном состоянии этих клеток можно судить по продукции ими активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА).

Представленные на рис. 2 данные свидетельствуют, что в обеих обследованных группах больных ТЛ стимулированная бактериальными компонентами продукция АФК нейтрофилами была повышена. Это говорит о высокой степени их активации. В группе больных ОФТЛ спонтанная и стимулированная продукция АФК мононуклеарами была значимо снижена по сравнению с референтной группой, а при сравнении с больными ХФТЛ – по стимулированной продукции АФК. Это свидетельствует о существенном нарушении функциональных возможностей этих клеток. При этом и спонтанная, и индуцированная продукция АФК нейтрофилами у больных этой группы была существенно выше, чем в референтной группе.

Для уничтожения *Mtb* необходимым компонентом являются АФА, которые обладают микробицидным действием по отношению к внутриклеточным патогенам.

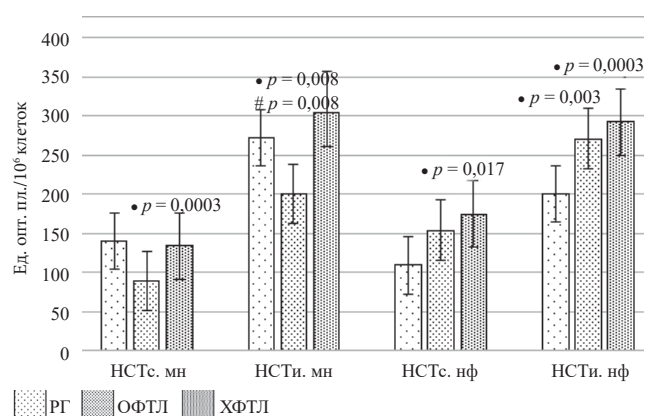


Рис. 2. Показатели оксидативного взрыва в группах больных ОФТЛ и ХФТЛ и РГ. Здесь и в табл. 2: НСТс. mn, нф и НСТи. mn, нф – тест восстановления нитросинего тетразолия: спонтанный (НСТс.) и индуцированный зимиозаном (НСТи) в мононуклеарах и нейтрофилах

Количество радикалов нитритов (NO_2^-) и нитратов (NO_3^-), произведенных мононуклеарами и нейтрофилами больных ТЛ, было значимо снижено по сравнению с референтной группой, при этом продукция нитритов (NO_2^-) и нитратов (NO_3^-) нейтрофилами больных ОФТЛ еще больше снижена, чем больных ХФТЛ (рис. 3). Известно, что нейтрофилы, активные участники воспаления при ТЛ, в отличие от активированных макрофагов, не производят значительных количеств метаболитов NO [20].

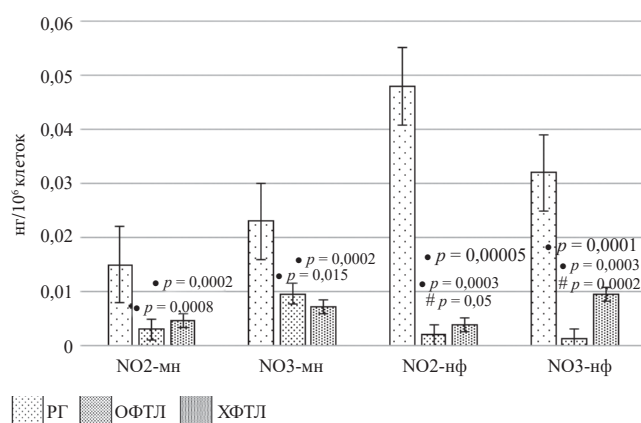


Рис. 3. Генерация активных форм азота в группах больных ОФТЛ и ХФТЛ и РГ. Здесь и в табл. 2: NO_2^- мн, нф и NO_3^- мн и нф – уровни нитритов и нитратов в мононуклеарах и нейтрофилах. • – отличия значимы по сравнению с референтной группой, # – отличия значимы между анализируемыми группами

В целом сниженная продукция метаболитов NO мононуклеарами и нейтрофилами у больных ТЛ, безусловно, определяет нарушение иммунного ответа к микобактериям туберкулеза, причем более выраженное снижение продукции метаболитов NO нейтрофилами, наблюдаемое у больных ОФТЛ, можно расценивать как более глубокое нарушение микробицидных функций по сравнению с больными с ХФТЛ.

Об участии пуриновых медиаторов в регуляции активности фагоцитов у больных ХФТЛ свидетельствует выявленная позитивная корреляция ($r = 0,7$; $p = 0,037$) между уровнем индуцированной продукции АФК нейтрофилами и активностью внутриклеточной ADA-1 нейтрофилов. Интересно, что для больных ОФТЛ корреляция индуцированной продукции АФК нейтрофилами с активностью внутриклеточной ADA-1 нейтрофилов оказалась негативной ($r = -0,4$; $p = 0,03$). То есть у больных ОФТЛ при активации нейтрофилов уровень внутриклеточного аденозина увеличивается, что способствует глубокому угнетению их функций.

Анализ зависимости нарушений параметров внешнего дыхания от способности фагоцитов производить реактивные радикалы кислорода и азота показал, что у больных ХФТЛ параметры, характеризующие статические легочные объемы (ЖЕЛ и РОВыд) и трансфер-коэффициент (ДСЛ/АО, характеризующий газообменную функцию легких), были связаны со спонтанной продукцией АФК мононуклеарами и генерацией радикалов нитрита и нитрата нейтрофилами ($r = -0,4$; $p = 0,04$, $r = -0,6$; $p = 0,04$, $r = -0,7$; $p = 0,01$ соответственно). У больных ОФТЛ корреляций между активностью фагоцитов и параметрами внешнего дыхания выявлено значительно больше, что свидетельствует о большем напряжении в системе регуляции внешнего дыхания [21].

Такие параметры, как статические легочные объемы (ОЕЛ, ЖЕЛ, РОВыд, ООЛ, отношение ООЛ/ОЕЛ, Евд.), динамические легочные объемы, характеризующие также проходимость дыхательных путей (ОФВ₁, индекс Генслера) и ДСЛ, характеризующий газообменную функцию легких, имели значимые корреляции со спонтанной продукцией АФК мононуклеарами, спонтанной и индуцированной продукцией АФК нейтрофилами и генерацией нитратных радикалов мононуклеарами и нитритных – нейтрофилами (табл. 2). Таким образом, выявленные корреляции подтверждают, что активация и нарушение функций нейтрофилов и мононуклеаров связаны с изменением параметров внешнего дыхания больных ТЛ.

Таблица 2

Корреляционные связи между характеристиками окислительного взрыва, метаболитами оксида азота и параметрами внешнего дыхания (коэффициент корреляции и его значимость) у больных острой формой туберкулеза легких		
Пары признаков		ОФТЛ
НСТс. мн	ООЛ/ОЕЛ	0,7 (0,02)
	ОФВ ₁	-0,6 (0,05)
НСТс. нф	Евд.	-0,6 (0,01)
	ОЕЛ	-0,6 (0,04)
	ДСЛ	-0,7 (0,02)
НСТи. нф	ООЛ/ОЕЛ	0,6 (0,03)
	ООЛ	0,6 (0,04)
NO ₃ ⁻ мн	РОВыд.	0,7 (0,02)
	Евд.	-0,7 (0,04)
	ДСЛ	-0,7 (0,02)
NO ₂ ⁻ нф	ОФВ ₁ /ФЖЕЛ	0,7 (0,04)
	ЖЕЛ	-0,7 (0,03)

Примечание. ОЕЛ – общая емкость легких; ООЛ – остаточный объем легких; ООЛ%/ОЕЛ – их отношение; ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1 с; Евд. – емкость вдоха; ДСЛ – диффузионная способность легких; РОВыд. – резервный объем выдоха; ЖЕЛ – жизненная емкость легких; ОФВ₁/ФЖЕЛ – индекс Генслера.

Важная роль в модуляции активности фагоцитов и высвобождении ими микробицидных радикалов кислорода и азота отводится аденозину. Проведенное нами исследование показало, что при ХФТЛ имеется значимая корреляция между индексом Генслера, характеризующим проходимость дыхательных путей, и концентрацией eNT5E в сыворотке крови, ферментом, синтезирующим аденозин ($r = 0,5$; $p = 0,02$).

У больных ОФТЛ определены позитивные корреляции между параметрами внешнего дыхания (РОВд., ООЛ) и активностью ферментов (eADA-2 в сыворотке крови, ADA-1 в нейтрофилах), разрушающими аденозин до цитопротекторного инозина ($r = 0,7$; $p = 0,004$; $p = 0,04$ соответственно), а снижение концентрации в мононуклеарах кофакторной для eADA-1 молекулы DPPIV (CD26), было отрицательно связано с показателями ОФВ₁ ($r = -0,7$; $p = 0,04$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Фиброзно-кавернозный туберкулез (ФКТ) определяется как хроническая форма туберкулеза, конечная стадия неблагоприятного исхода инфильтративного ТЛ при его естественном развитии или в результате неэффективного лечения. Необходимо отметить, что даже после микробиологического излечения от туберкулеза, у 50% пациентов сохраняется посттуберкулезная легочная недостаточность (ПТЛН) [22], обусловленная повреждением структуры паренхимы, дыхательных путей, сосудов и средостения, что составляет суть патоморфологических изменений при ФКТ. Причину развития ПТЛН и ее тяжесть связывают с притоком нейтрофилов и их избыточной активностью [23, 24].

Полученные нами данные подтверждают, что в обеих обследованных группах больных ТБ нейтрофилы действительно производили избыточное количество активных радикалов кислорода, способных (при истощении антиоксидантной системы, что характерно для хронического воспаления) повреждать собственные клетки и межклеточные структуры. При этом способность производить важные для микобактериальной микробицидности метаболиты NO была снижена как для нейтрофилов (более выражено у больных ОФТЛ), так и для мононуклеаров больных ТЛ.

Результаты нашего исследования показали, что уровень аденозина (судя по активности экто-5'-нуклеотидазы (eNT5E)) был в равной степени повышен у больных ТЛ, независимо от клинической формы заболевания. При туберкулезном процессе в условиях высокого уровня внеклеточного аденозина из активированных макрофагов высвобождается eADA-2, которую определяют как маркер воспалительного ответа и тяжести туберкулезного процесса [25].

Подтверждением регуляторного воздействия аденозина на показатели внешнего дыхания (опосредовано через контроль активности фагоцитов) является выявленная позитивная ассоциация между активностью eADA-2 в сыворотке крови и резервным объемом выдоха (параметром, характеризующим статические легочные объемы у больных ОФТЛ). Другой значимой корреляционной связью, выявленной нами, была связь активности ADA-1 в нейтрофилах больных ОФТЛ (сниженная в 2,2 раза по сравнению с референтной группой) с показателем функции внешнего дыхания, характеризующем остаточный объем легких.

У больных ОФТЛ снижение внутриклеточной активности ADA-1 может приводить к росту концентрации аденозина в клетке, что определяет повышение экспрессии P1-рецепторов, в частности низкоаффинного A_{2B} рецептора, стимуляция которого сдерживает воспаление и способствует восстановлению тканей [4, 26]. В случае активации иммунных клеток при высоких уровнях аденозина происходит усиление экспрессии рецепторов A_{2A}, A_{2B} и A₃ на макрофагах, и продукция ими оксида азота угнетается [27]. По-видимому, различия в длительности активации иммунных клеток и экспрессии ими P1-рецепторов определяют тот факт, что при острой и хронической форме ТЛ нами выявлены разнонаправленные корреляции между внутриклеточной активностью ADA-1 и уровнем индуцированного респираторного взрыва нейтрофилов.

Известно, что внеклеточный аденозин не только регулирует воспалительный ответ, но и модулирует взаимодействие клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Т. Hashikawa с соавт. (2006) показали, что при воспалении некротические клетки могут стать источником eADA-1, которая впоследствии может образовать комплекс с DPPIV (CD26). В нашем исследовании выявлено снижение экспрессии DPPIV (CD26) мононуклеарами (наиболее выраженное при ОФТЛ) [28]. По-видимому, нарушение взаимодействия моноцит–Т-лимфоцит при снижении экспрессии DPPIV (CD26) мононуклеарами и сниженной активности eADA-1 в сыворотке крови у больных ОФТЛ определяет нарушенную регуляцию воспаления и появление негативной ассоциации между уровнем экспрессии мононуклеарами DPPIV и объемом форсированного выдоха. Показано, что уровень растворимой формы DPPIV при хронических заболеваниях обратно коррелирует с тяжестью заболевания, выраженностью воспаления и распространенностью легочного фиброза [29, 30].

В нашем исследовании у больных ХФТЛ зарегистрирован значимо сниженный уровень растворимой

формы DPPIV (CD26) в сыворотке крови, что определяет снижение компенсаторных возможностей при хроническом течении инфекционно-воспалительного процесса и объясняет выявленное нами снижение показателей внешнего дыхания в этой группе больных ТЛ. При этом у больных ОФТЛ, у которых поддерживается уровень растворимой формы DPPIV в сыворотке крови в пределах референтных значений, функция внешнего дыхания не нарушена (определяемые параметры находятся в пределах референтных значений).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют связать регуляцию внешнего дыхания с показателями пуринового обмена, в частности с концентрацией и активностью ферментов, ответственных за образование и метаболизм аденозина, определяющих его уровень вне клеток и внутри мононуклеаров и нейтрофилов, с экспрессией кофакторных молекул, а также с длительностью активации клеток врожденного иммунитета, нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, определяемой в значительной степени возможностями аденозиновой регуляции. Выявленные закономерности дают возможность наметить новые пути к своевременной диагностике, профилактике и, возможно, терапии формирующейся легочной недостаточности у больных ТЛ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization. URL: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (дата обращения: 20.10.2020).
- Ворончихин Т.А., Аветисян А.О., Васильев И.В., Кудряшов Г.Г., Яблонский П.К. Результаты комплексного лечения ограниченного фиброзно-кавернозного туберкулеза легких. *Медицинский альянс*. 2018;3:56–64.
- Багищева Н.В., Мордык А.В., Гольяпин В.В. Прогнозирование результатов лечения туберкулеза у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Медицинский альянс*. 2019;1:13–19.
- Antonioli L., Csóka B., Fornai M., Colucci R., Kókai E., Dran-dizzi C. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov. Today*. 2014;19(8):1051–1068. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.02.010.
- Ohta A., Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down-regulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*. 2001;414(6866):916–920. DOI: 10.1038/414916a.
- Rivo J., Zeira E., Galun E., Matot I. Activation of A3 adenosine receptors attenuates lung injury after *in vivo* reperfusion. *Anesthesiology*. 2004;101(5):1153–1159. DOI: 10.1097/0000542-200411000-00015.
- Day Y.J., Marshall M.A., Huang L., McDuffie M.J., Okusa M.D., Linden J. Protection from ischemic liver injury by activation of A2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. *Am. J. Physiol.* 2004;286(2):285–293. DOI: 10.1152/ajpgi.00348.203.
- Chunn J.L., Molina J.G., Mi T., Xia Y., Kellems R.E., Blackburn M.R. Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficient mice. *The Journal of Immunology*. 2005;175(3):1937–1946. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1937.
- Antonioli L., Fornai M., Colucci R., Ghisu N., Tuccori M., Del Tacca M. et al. Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2008;14(4):566–574. DOI: 10.1002/ibd.20316.
- Cristalli G., Costanzi S., Lambertucci C., Lupidi G., Vittori S., Volpini R. et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Medicinal Research Reviews*. 2001;21(2):105–128. DOI: 10.1002/1098-1128(200103)21:2<105::aid-med1002>3.0.co;2-u
- Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur. Respir. J.* 1996;9(4):632–633. DOI: 10.1183/09031936.96.09040632.
- Zavialov A.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of t helper cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2010;88(2):279–290. DOI: 10.1189/jlb.1109764.
- Watanabe N., Gao S., Kajigaya S., Diamond C., Alemu L., Ombrello A. et al. Analysis of deficiency of adenosine deaminase 2 pathogenesis based on single cell RNA sequencing of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2021;110(3):409–424. DOI: 10.1002/JLB.3HI0220-119.
- Giusti G. Adenosine deaminase. Methods of enzymatic analysis. H. Bergmeyer (ed.). New York: Academic Press, 1974;2:1092–1099.
- Miller M.R., Hankinson J., Brusasco V., Burgos F., Casaburi R., Coates A. et al. Standardisation of spirometry. *Eur. Respir. J.* 2005;26(2):319–338. DOI: 10.1183/09031936.05.00034805.
- Wanger J., Clausen J.L., Coates A., Pedersen O.F., Brusasco V., Burgos F. et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur. Respir. J.* 2005;26(3):511–522. DOI: 10.1183/09031936.05.00035005.
- Graham B.L., Brusasco V., Burgos F., Cooper B.C., Jensen R., Kendrick A. et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur. Respir. J.* 2017;49(1):1600016. DOI: 10.1183/13993003.00016-2016.
- Функциональная диагностика состояния внешнего дыхания. Функциональная диагностика: национальное руководство. Под ред. Н.Ф. Берестень, В.А. Сандрикова, С.И. Федоровой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019:566–645.
- Quanjer P.H., Tammeling G.J., Cotes J.E., Pedersen O.F., Peslin R., Yennault J.-C. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur. Respir. J.* 1993;6:5–40. URL: https://erj.ersjournals.com/content/erj/6/Suppl_16/5.full.pdf.
- Mishra B.B., Lovewell R.R., Olive A.J., Zhang G., Wang W., Eugenin E. et al. Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. *Nat. Microbiol.* 2017;2:17072. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.72

21. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990:224.
22. Chushkin M.I., Ots O.N. Impaired pulmonary function after treatment for tuberculosis: the end of the disease? *J. Bras. Pneumol.* 2017;43(1):38–43. DOI: 10.1590/s1806-37562016000000053.
23. Gopal R., Monin L., Torres D., Slight S., Mehra S., McKenna K.C. et al. S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188(9):1137–1146. DOI: 10.1164/rccm.201304-0803OC.
24. Pantelev A.V., Nikitina I.Y., Burmistrova I.A., Kosmiadi G.A., Radaeva T.V., Amansahedov R.B. et al. Severe tuberculosis in humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with antigen-specific CD4 T-cell response. *Front. Immunol.* 2017;8:963. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00963.
25. Zavialov A.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2010;88(2):279–290. DOI: 10.1189/jlb.1109764.
26. Sun Y., Huang P. Adenosine A2B Receptor: from cell biology to human diseases. *Front. Chem.* 2016;4:37. DOI: 10.3389/fchem.2016.00037.
27. Antonioli L., Fornai M., Blandizzi C., Pacher P., Haskó G. Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. *Immunology Letters.* 2019;205:9–15. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.04.006.
28. Hashikawa T., Takedachi M., Terakura M., Yamada S., Thompson L.F., Shimabukuro Y., Murakami I. Activation of adenosine receptor on gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.* 2006;85(8):739–744. DOI: 10.1177/154405910608500810.
29. Tamaki Z., Kubo M., Yazawa N., Mimura Y., Ashida R., Tomita M. et al. Serum levels of soluble CD26 in patients with scleroderma. *J. Dermatol. Sci.* 2008;52(1):67–69. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2008.05.004.
30. Somborac-Baćura A., Buljević S., Rumora L., Čulić O., Detel D., Pancirov D. et al. Decreased soluble dipeptidyl peptidase IV activity as a potential serum biomarker for COPD. *Clin. Biochem.* 2012;45(15):1245–1250. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.04.023.

Вклад авторов

Дьякова М.Е. – разработка концепции и дизайна статьи, выполнение биохимических исследований, анализ и интерпретация данных, написание и оформление рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Серебряная Н.Б. – написание и редактирование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Кирюхина Л.Д. – проведение и оценка комплексного исследования функции внешнего дыхания. Эсмедляева Д.С. – выполнение биохимических исследований. Яблонский П.К. – окончательное утверждение рукописи для публикации.

Информация об авторах

Дьякова Марина Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, СПбНИИФ, г. Санкт-Петербург, marinadyakova@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7810-880X>

Серебряная Наталья Борисовна – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией общей иммунологии, ИЭМ; профессор, кафедра цитологии и гистологии, биологический факультет, СПбГУ; профессор, кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, СЗГМУ им. И.М. Мечникова, г. Санкт-Петербург, nbvma@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2418-9368>

Кирюхина Лариса Дмитриевна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, зав. отделением функциональной диагностики, СПбНИИФ, г. Санкт-Петербург, kiruhina_larisa@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6550-817X>

Эсмедляева Диляра Салиевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, СПбНИИФ, г. Санкт-Петербург, diljara-e@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9841-0061>

Яблонский Петр Казимирович – д-р мед. наук, профессор, директор СПбНИИФ; декан медицинского факультета, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, piotr_yablonskii@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4385-9643>

(✉) Дьякова Марина Евгеньевна, marinadyakova@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.12.2021;
одобрена после рецензирования 14.04.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 577.1.08:611.36.018:615.37:616-089.943
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>

Местная биосовместимость и биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов при подкожной имплантации полилактидных матриц

Иванова Е.А., Дзюман А.Н., Дворниченко М.В.

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

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование местной биосовместимости и системных эффектов нетканых полилактидных (PLA) матриц на показатели крови и печени после подкожной имплантации крысам стока Wistar.

Материалы и методы. Биodeградируемые волокнистые PLA матрицы изготовлены методом электро-спиннинга, имели размеры (10×10 мм², толщина не более 0,5 мм; диаметр волокон в матриксе ~1 мкм), пригодные для подкожного введения белым лабораторным крысам. Полимерные изделия стерилизовали в парах этиленоксида. Через 30 сут после имплантации PLA матриц изучены местная биосовместимость согласно ГОСТ ISO 10993-6-2011, клеточные (общее количество лейкоцитов, гемограмма, число эритроцитов, концентрация гемоглобина) и биохимические показатели крови (концентрация лактата, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ)), определена стандартная гистологическая оценка состояния печени. Проведены компьютерная морфометрия цифровых изображений гистологических срезов и статистическая обработка результатов.

Результаты. Образцы PLA матрикса являлись легкими местными раздражителями в шкале 1–1,9 балла согласно критериям ГОСТ ISO 10993-6-2011 через 30 сут после подкожной имплантации. Медианная плотность распределения гигантских многоядерных клеток инородных тел (ГМКИТ) в соединительной ткани вокруг и в структуре PLA матриц составила 1 500 (1 350; 1 550) на 1 мм² среза. Имела место выраженная лейкоцитарная реакция крови, обусловленная лимфоцитозом (в 1,7 раза по сравнению с ложнооперированным (ЛО) контролем, $p < 0,02$). Отсутствие значительного нейтрофилиза крови свидетельствовало об асептическом характере воспаления, протекающего в подкожной клетчатке вокруг PLA материалов. В крови отмечена нормализация маркеров цитолиза гепатоцитов (активности АЛТ и АСТ), повышенных у ЛО животных (АЛТ – до 123% и АСТ – до 142%, $p < 0,001$ в сравнении с интактными значениями), без выраженных изменений структуры печени и числа двуядерных гепатоцитов.

Заключение. Нетканые PLA матрицы биосовместимы с подкожной клетчаткой, подвергаются биорезорбции ГМКИТ, обладают дистантным протекторным действием на функциональное состояние печени у лабораторных животных. Обсуждены гипотезы обнаруженного системного эффекта при подкожной имплантации PLA матриц. Однако конкретные механизмы требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: нетканый матрикс из полимолочной кислоты, крысы, сыворотка крови, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, клетки крови, двуядерные гепатоциты

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

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет – 2030».

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7693/1 от 30.09.2019).

Для цитирования: Иванова Е.А., Дзюман А.Н., Дворниченко М.В. Местная биосовместимость и биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов при подкожной имплантации полилактидных матриц. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):63–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>.

✉ Дворниченко Марина Владимировна, dochic@yandex.ru

Local biocompatibility and biochemical profile of hepatic cytolysis in subcutaneous implantation of polylactide matrices

Ivanova E.A., Dzyuman A.N., Dvornichenko M.V.

Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate local biocompatibility and systemic effects of nonwoven polylactide (PLA) matrices on blood and liver parameters after their subcutaneous implantation in Wistar rats.

Materials and methods. Bioabsorbable fibrous PLA matrices were produced by electrospinning and had dimensions ($10 \times 10 \text{ mm}^2$, thickness of no more than 0.5 mm; fiber diameter in the matrix $\sim 1 \text{ }\mu\text{m}$) appropriate for subcutaneous implantation in white laboratory rats. Polymer implants were sterilized in ethylene oxide vapor. Thirty days after the implantation of PLA matrices, local biocompatibility according to GOST ISO 10993-6-2011, cellular parameters (total leukocyte count, hemogram, erythrocyte count, hemoglobin concentration), and biochemical blood parameters (lactate concentration, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels) were studied, and a standard histologic evaluation of the liver was performed.

Results. PLA matrix samples were mild local irritants on a scale of 1–1.9 points according to GOST ISO 10993-6-2011 criteria 30 days after the subcutaneous implantation. The median density of distribution of multinucleated giant cells (MNGCs) in the connective tissue around and in PLA matrices was 1,500 (1,350; 1,550) per 1 mm^2 of a slice. Pronounced leukocytic reaction due to lymphocytosis was noted (an increase by 1.7 times compared with a sham-operated (SO) control group, $p < 0.02$). The absence of a significant neutrophil count in the blood revealed sterile inflammation proceeding in the subcutaneous tissue around the PLA materials. Normalization of hepatic cytolysis markers (ALT and AST activity) in the blood without pronounced changes in the structure of the liver and the number of binuclear hepatocytes was noted. These markers were increased in SO controls (ALT up to 123% and AST up to 142%, $p < 0.001$ compared with values in the intact group).

Conclusion. Nonwoven PLA matrices are biocompatible with subcutaneous tissue, undergo bioresorption by MNGCs, and have a distant protective effect on the functional state of the liver in laboratory animals. Hypotheses on the detected systemic effect during subcutaneous implantation of PLA matrices were discussed; however, specific mechanisms require further study.

Keywords: nonwoven PLA matrix, rats, blood serum, alanine transaminase, aspartate transaminase, blood cells, binuclear hepatocytes

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

Source of financing. The study was supported by Siberian State Medical University development program “Priority 2030”.

Conformity to the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 7693/1 of 30.09.2019).

For citation: Ivanova E.A., Dzyuman A.N., Dvornichenko M.V. Local biocompatibility and biochemical profile of hepatic cytolysis in subcutaneous implantation of polylactide matrices. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):63–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>

ВВЕДЕНИЕ

Полимолекулярная кислота (полилактид, polylactic acid), PLA) является одним из синтетических биодеградируемых полимеров, состоящих из аналогов природных мономеров и активно используемых в различных приложениях тканевой инженерии [1] в качестве имплантатов [2], а также в виде матриц для доставки лекарств и клеток [3].

PLA материалы разрешены к клиническому применению. Развитая поверхность нетканых волокнистых матриц позволяет использовать различные способы загрузки и высвобождения существенных концентраций лекарственных средств и биологических молекул [4]. Тем не менее накопление лактата, зависящее от скорости деградации PLA имплантата, может провоцировать локальное воспаление и (или) системную токсичность [5].

Электроспиннинг является динамично развивающейся технологией получения нетканых волокнистых скаффолдов, состоящих из наноразмерных (диаметром 5 нм – 1 мкм) взаимосвязанных волокон, образующих микроразмерные (~100 мкм) поры, связанные между собой [6, 7]. С одной стороны, их архитектура позволяет воспроизводить в определенной степени структуру природного внеклеточного матрикса разных биологических тканей. С другой стороны, большая площадь поверхности при низкой плотности [6] способствует усиленной биодеградации волокнистых PLA материалов [8] с выделением высоких доз молочной кислоты, что может приводить к нежелательным побочным эффектам, маскирующим или нивелирующим терапевтическое действие иммобилизованных на имплантате клеток, лекарственных и биологических молекул.

В связи с этим целью исследования было изучение местной биосовместимости и системных эффектов нетканых PLA матриксов на показатели крови и печени после подкожной имплантации крысам стока Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проведено *in vivo* на 20 половозрелых белых самцах крыс стока Wistar массой 280–300 г, содержащихся в стандартных условиях вивария, на базе лаборатории биологических моделей СибГМУ (г. Томск) на обычном пищевом рационе. Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В качестве тестируемых изделий использовали нетканые полилактидные (PLA) матриксы (10 × 10 мм², толщина не более 0,5 мм; средний диаметр волокон в матриксе ~1 мкм), полученные в Томском политехническом университете методом электроспиннинга (как описано ранее) [8]. Исходным сырьем служил поли(DL-лактид) PURASORB компании Corbion (Нидерланды). Стерилизацию нетканых PLA матриксов проводили в парах 100%-го этиленоксида при 37 °C в течение 9 ч в газовом стерилизаторе 3M Steri-Vac Sterilizer/Aerator (3M, США) согласно рекомендациям ГОСТ ISO 11135-2017 (Стерилизация медицинской продукции. Этиленоксид. Требования к разработке, валидации и текущему управлению процессом стерилизации).

Под CO₂-наркозом 10 крысам подкожно (в область живота) вводили по одному матриксу через срединный кожный разрез и сформированный боковой подкожный карман (как описано ранее) [9].

После размещения образцов в подкожном кармане на кожу животных накладывали узловые швы атравматичным шовным материалом, нитью 4.0. Кожа вокруг швов обрабатывалась антисептиком. Контролем служили 10 ложнооперированных (ЛО) крыс, которым выполняли срединный разрез кожи, подкожно вводили пинцет, формировали боковой карман и зашивали рану без введения изделий. Биохимические анализы крови определяли также у 10 интактных животных.

После окончания срока исследования (30 сут после имплантации) выведение животных из эксперимента выполняли при помощи ингаляции углекислым газом с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609/ЕЕС), Хельсинкской декларации и приказов Министерства здравоохранения СССР (№ 742 от 13.11.1984 и № 48 от 23.01.1985).

У декапитированных животных собирали кровь для получения сыворотки в пробирки Vacuette (BD Diagnostics, США), определяли концентрацию лактата, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) с применением наборов к биохимическому анализатору Rendom Access A-25 (BioSystems S.A., Испания) согласно инструкциям фирмы-производителя. Показатели крови (общее количество лейкоцитов (ОКЛ), гемограмма, число эритроцитов, гемоглобин) изучали с помощью стандартных гематологических методов [10].

В соответствии с рекомендациями ГОСТ ISO 10993-6-2011 (Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации) макроскопически оценивали локальную тканевую реакцию (местную биосовместимость *in vivo*) мягких тканей подкожной клетчатки, окружающих зону имплантации: наличие или отсутствие признаков воспаления (альтерация, экссудация, пролиферация), васкуляризации (гиперемии) сосудов рецепиентного ложа и инкапсуляции образцов. Результаты полуколичественной макроскопической оценки локальной реакции на PLA матриксы фиксировали по следующей шкале (в баллах): образцы не имеют раздражающего действия (0–0,9 балла); легкие раздражители (1–1,9 балла); умеренные раздражители (2–2,9 балла); тяжелые раздражители (3–4 балла).

Для проведения микроскопического анализа имплантаты с окружающими тканями аккуратно извлекали из подкожного кармана; после вскрытия брюшной полости у животных забирали часть печени для гистологической оценки ее состояния после подкожной имплантации PLA матриксов. Анализируемые фрагменты фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Обезжизвование проводили в восьми сменах

дегидратирующего раствора на основе изопропанола (IsoPrep, БиоВитрум, Россия) по схеме производителя. Заливали объекты исследования в парафиновую среду ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия), на микротоме готовили тонкие (5–7 мкм) срезы перпендикулярно поверхности тканевых пластинок и исследуемых образцов.

Смонтированные на предметных стеклах срезы окрашивали гематоксилином Джилла (БиоВитрум, Россия) и эозином для гистологических исследований в стандартных условиях. С каждого тканевого образца было получено, окрашено и исследовано по 10 серийных срезов. Микропрепараты изучали в проходящем свете с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer A1 (Германия) с различным увеличением (40–400). Цифровые изображения окрашенных гистологических срезов получали с помощью аппаратно-программного комплекса AxioVision 4.8 (Zeiss, Германия). В 10 случайно выбранных полях зрения на каждом гистологическом препарате определяли интенсивность клеточной резорбции PLA матриц (по числу гигантских многоядерных клеток инородных тел (ГМКИТ)); оценивали активность регенераторных процессов в печени (по числу двуядерных гепатоцитов) при помощи компьютерной морфометрии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, как описано [11].

При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica (версия 13.3). Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Шапиро – Уилка). Вследствие отличия распределения признаков от нормального результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me (Q_1 ; Q_3). Для оценки статистических различий выборок применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Имплантаты помимо выполнения своей основной функции способны активировать местные регенераторные процессы, вызывать системную реакцию организма, опосредованную через систему крови. При этом биodeградируемые изделия, например полилактиды, способны влиять на организм не только за счет свойств своей поверхности, но и продуктов биodeградации и биорезорбции [5]. Исследование локальной биосовместимости PLA матриц показало, что через 30 сут после подкожного введения тестируе-

мых образцов не отмечалось макроскопических признаков воспаления (альтерация, экссудация) тканей, окружающих имплантаты (рис. 1). Выраженность кровенаполнения (гиперемии) кровеносных сосудов реципиентного ложа и инкапсуляции (реакция пролиферации клеток) образцов в исследуемых группах соответствовала, преимущественно, отсутствию реакции (0 баллов), слабой (1 балл) реакции, в редких случаях (при инкапсуляции) – умеренной реакции (2 балла) (табл. 1). Таким образом, исследуемые образцы PLA матрикса являлись легкими раздражителями в шкале 1–1,9 балла согласно критериям ГОСТ ISO 10993-6-2011.

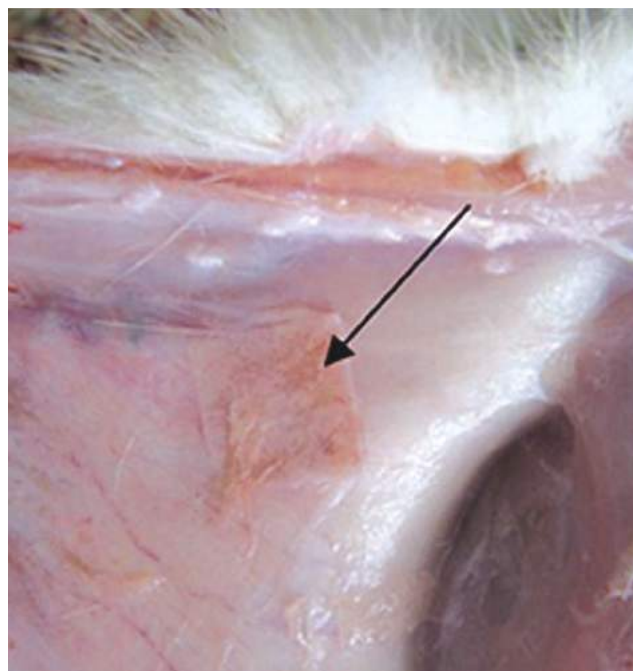


Рис. 1. Состояние тканей, окружающих PLA матрикс в подкожном подкожном кармане, у крыс через 30 сут после имплантации

Таблица 1

Макроскопические признаки изменений в тканях, окружающих PLA матрикс, через 30 сут подкожной имплантации крысам Wistar, баллы, Me (Q_1 ; Q_3)			
Группы исследования	Воспаление	Гиперемия вокруг образца (послеоперационного рубца)	Инкапсуляция матрикса
Ложная операция, $n = 10$	0 (0; 0)	0 (0; 1)	–
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	0 (0; 0)	1 (1; 1,5)	1,5 (1; 1,5)

При изучении микроскопических изменений выявлено наличие хорошо сформированной соединительнотканной капсулы вокруг имплантатов (рис. 2). В капсуле хорошо идентифицировались два

слоя: тонкий (толщина не более 50 мкм) внутренний, контактирующий с PLA матриксом, образованный плотной волокнистой соединительной тканью. Инкапсуляция тонким слоем соединительной ткани характерна для относительно биоинертных искусственных материалов [5]. Тонкие пучки коллагеновых волокон располагались параллельно поверхности имплантата и врастали в структуру имплантатов, преимущественно с торца тестируемых изделий.

Второй слой капсулы располагался снаружи от предыдущего, непосредственно контактировал с окружающими тканями и был образован рыхлой неоформленной соединительной тканью с микрососудами. Пучки коллагеновых волокон расходились в разных направлениях независимо от поверхности имплантата, между ними встречались как фибробласты, так и воспалительные клетки (полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты и макрофаги).

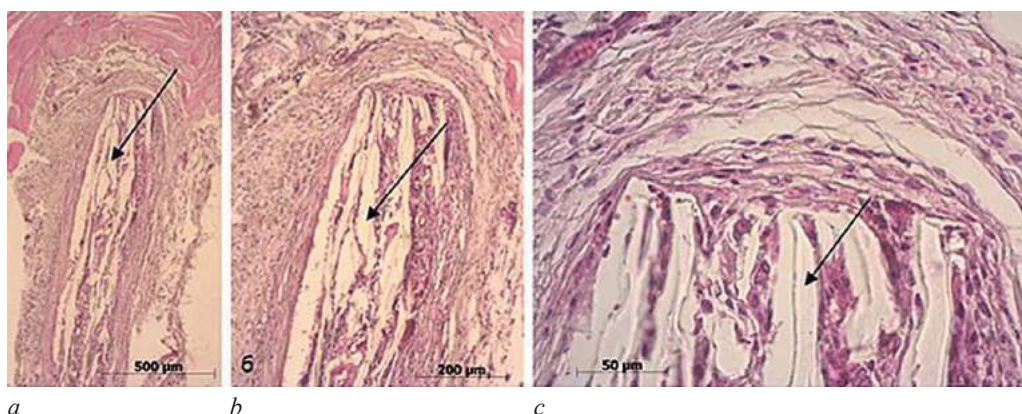


Рис. 2. Состояние соединительнотканной капсулы вокруг и в структуре PLA скаффолда при различном увеличении: *a* – 50, *b* – 100, *c* – 400. Окраска гематоксилином и эозином; стрелками указано прозрачное вещество полимерного скаффолда

Клеточный состав соединительной ткани (рис. 3) представлен, в частности, ГМКИТ. Они часто обнаруживались внутри полости имплантата и располагались одиночно (рис. 3, *a*) либо небольшими скоплениями до трех клеток (рис. 3, *b*). Согласно данным компьютерной морфометрии, медианная плотность распределения ГМКИТ в соединительной ткани вокруг и в структуре PLA матриксов составила 1 500 (1 350; 1 550) на 1 мм² среза. Образование и накопление ГМКИТ в месте введения имплантатов с высо-

ким соотношением площади поверхности к объему является типичной реакцией организма-хозяина и свидетельствует об активной клеточной резорбции вещества матриксов [5].

Между пучками коллагеновых волокон располагались фиброциты и фибробласты (рис. 3, *c*), а также мононуклеарные (лимфоциты, макрофаги) и полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ), которые обнаруживались преимущественно диффузно, но формировали скопления вблизи ГМКИТ (рис. 3, *a*, *b*).

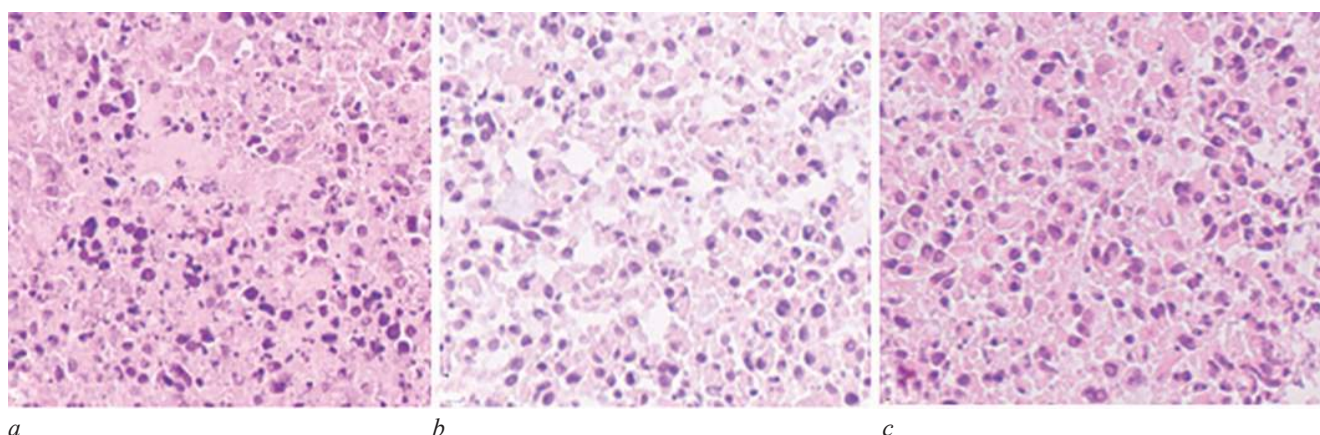


Рис. 3. Тканевая реакция на PLA матрикс через 30 сут после подкожной имплантации крысам Wistar: *a*, *b* – мононуклеарные и полиморфноядерные лейкоциты, гигантские многоядерные клетки инородных тел (отмечены стрелками); *c* – фибробласты между полимерными волокнами имплантата; окраска гематоксилином и эозином

Таким образом, местная реакция на PLA матриксы через 30 сут после подкожной имплантации крысам отражает, по-видимому, переход острого в хроническое продуктивное воспаление со сменой лейкоцитов, инфильтрирующих зону повреждения, с ПЯЛ на мононуклеарные формы. После катаболической фазы, способствующей санации очага воспаления, активируются анаболические процессы [12], обусловленные переключением секреции провоспалительных цитокинов на противовоспалительные (регенераторные) факторы [13–15].

С одной стороны, образование и накопление ГМКИТ в месте имплантации свидетельствует о выраженной клеточной резорбции PLA матриксов. При этом они имеют первостепенное значение в развитии местной гранулематозной воспалительной реакции на имплантат, опосредованной, прежде всего, через секретлируемый ими фактор некроза опухоли TNF α [5]. TNF α является системным цитокином, индуцирующим экспрессию рецепторов к эпидермальному фактору роста (ЭФР) [16], активирующим продукцию соматотропного гормона (СТГ) клетками аденогипофиза [17]. В свою очередь, ЭФР и СТГ оказывают анаболический эффект, усиливают регенераторные процессы в органах и тканях [18, 19].

С другой стороны, утилизация полимерной матрицы сопровождается высвобождением молочной кислоты, которая может оказывать системное влияние на организм. Наряду с почками, печень является органом-мишенью для лактата, циркулирующего в кровотоке [20]. Поэтому оценка биохимических индексов крови активно применяется для определения биологической безопасности продуктов биодеградации полимерных скаффолдов, а также функциональной активности печени.

В случае массивной биодеградации полимолочная основа тестируемых материалов могла привести к росту в крови животных содержания мономеров лактата. Однако через 30 сут после имплантации статистически значимые изменения концентрации молочной кислоты в крови не наблюдались (см. табл. 1). Активное пятикратное увеличение *in vitro* растворения тестируемых PLA матриксов отмечалось к 35-м сут иммерсии в питательную среду [8]. Клеточная резорбция имплантата может ускорить его разрушение *in vivo*, однако плотность распределения ГМКИТ в волокнистой матрице была незначительной (см. рис. 3). В совокупности опосредованный через дистантные (стресс-реализующие) регуляторные системы организма путь влияния имплантатов и продуктов их биодеградации на функцию печени нельзя исключить.

Известно, что подкожная имплантация вызывает у животных стресс-реакцию [21], которая реализуется через локальные (клеточное микроокружение) и дистантные системы жизнеобеспечения организма [19]. В нашем исследовании активность АСТ и АЛТ в крови интактных крыс Wistar (табл. 2) была близка к таковым в других вивариях [22]. Ложная операция через 30 сут после хирургической манипуляции сопровождалась увеличением в сыворотке крови (в сравнении со значениями у интактных животных) активности АЛТ (до 123%) и АСТ (до 142%, $p < 0,001$). Данные функциональные пробы позволяют предполагать повреждение паренхимы печени [23], вызванное послеоперационным стрессом. В то же время подкожное введение PLA матрикса приводило к нормализации (практически до исходного уровня) маркеров цитолиза гепатоцитов, что свидетельствует в пользу дистантного гепатопротекторного эффекта PLA материала при оперативном вмешательстве (см. табл. 2).

Таблица 2

Биохимические показатели крови у крыс Wistar через 30 сут после подкожной имплантации PLA матриксов, Me (Q_1 ; Q_3)			
Группа	Лактат, мМ	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л
Интактные животные, $n = 10$	–	67,14 (60,47; 69,59)	185,14 (174,16; 216,07)
Ложная операция, $n = 10$	4,93 (4,5; 5,71)	82,58* (75,61; 84,36) $p < 0,001$	262,90* (246,60; 304,60) $p < 0,001$
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	4,28 (3,50; 5,40)	67,34# (65,61; 72,95) $p < 0,003$	225,10# (209,10; 250,0) $p < 0,02$

* с исходным уровнем (интактные животные); # с ложнооперированными крысами.

В соответствии с полученными функциональными изменениями следующим вопросом являлось влияние PLA матриц на структуру печени, поскольку подкожная имплантация скаффолдов может приводить к стимуляции регенерации гепатоцитов [24]. Одним из принципиальных показателей регенерации печени является количество (доля) двуядерных гепатоцитов (делящихся и неделящихся). Медленные подпороговые потери гепатоцитов не компенсируются организмом, когда процесс достигает «критического числа» (для печени это число составляет 10% работающих гепатоцитов), что приводит к необратимым процессам и гибели организма вследствие печеночной недостаточности [25].

При исследовании гистологических препаратов печени ложнооперированных крыс наблюдалась умеренная гиперемия центральных вен и синусоидных капилляров, балочное строение и архитектура классических печеночных долек сохранены. Подкожная имплантация PLA матриц не вызвала видимых деструктивных изменений со стороны печени к 30-м сут наблюдения (рис. 4). Однако увеличение числа двуядерных гепатоцитов (см. рис. 4) не достигало статистических различий в сравнении с ЛО контролем (см. табл. 2).

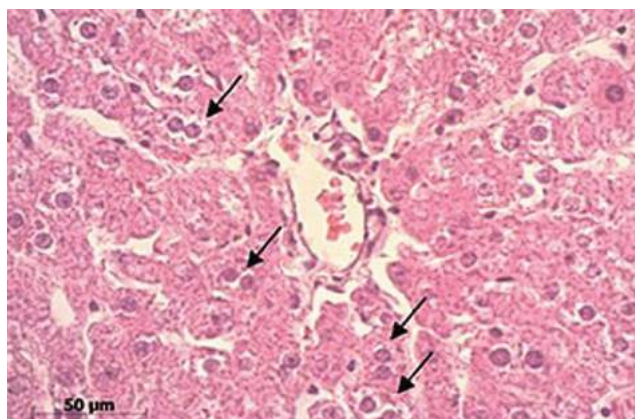


Рис. 4. Гистологическая картина печени крыс Wistar на 30-е сут после подкожной имплантации PLA матрикса: окраска гематоксилином и эозином; стрелками указаны двуядерные гепатоциты

Согласно полученным данным, подкожная имплантация PLA матриц оказывает функциональный гепатопротекторный эффект к 30-м сут после введения лабораторным крысам. Механизмы уста-

новленного феномена не ясны, но имеют, скорее всего, комплексный характер. Могут иметь значение постоперационные репаративные процессы в подкожной жировой клетчатке, приводящие к поступлению в кровь ЭФР и других ростовых факторов, активирующих регенерацию печени [26]. Кроме того, лактат, выделяющийся при деградации PLA матриц, способен оказывать регуляторный эффект на миграцию и активность Т-лимфоцитов [27, 28], которые являются активными участниками и клетками-дирижерами пролиферативного воспаления и последующих регенераторных процессов в паренхиматозных органах [29].

Действительно, после подкожного введения PLA матриц установлена выраженная лейкоцитарная реакция крови, обусловленная увеличением (в 1,7 раза по сравнению с ЛО контролем, $p < 0,02$) содержания лимфоцитов (см. табл. 3). Отсутствие значительного нейтрофилиза крови свидетельствовало об асептическом характере воспаления, протекающего в подкожной клетчатке вокруг PLA материалов.

Таблица 2

Плотность распределения двуядерных гепатоцитов у крыс Wistar через 30 сут после подкожной имплантации PLA матриц, $Me (Q_1; Q_3)$	
Группа	Количество двуядерных клеток на 1 мм ²
Ложная операция, $n = 10$	4600 (4450; 4800) $n_1 = 100$
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	5300 (4700; 5500) $n_1 = 100$

Примечание. Количество подсчитанных полей зрения – n_1 .

Таблица 3

Гемограмма (10 ⁹ /л), число эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови крыс Wistar через 30 сут после подкожной имплантации PLA матриц, $Me (Q_1; Q_3)$						
Группа	Общее количество лейкоцитов	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л
Ложная операция, $n = 10$	6,4 (4,6; 9,2)	3,6 (2,8; 6,1)	0,5 (0,2; 0,7)	2,5 (1,2; 2,8)	9,41 (7,93; 9,52)	146 (123; 147)
Имплантация PLA матрикса, $n = 10$	8,7 (6,7; 13,3)	6,1* (5,2; 9,0) $p < 0,02$	0,4 (0,3; 0,6)	2,2 (1,3; 3,4)	9,43 (7,92; 9,94)	150 (148; 154)

* статистические различия согласно критерию Манна – Уитни.

Системный эффект PLA матриц на биохимические маркеры цитолиза гепатоцитов во многом совпадает с влиянием подкожного введения имплантатов гиалуроновой кислоты здоровым женщинам при косметологических процедурах [30]. Однотипное действие на кровь различных по своей химической природе веществ, находящихся под кожей, предполагает, помимо специфического влияния мономеров (молочная или глюконовая кислота), неспецифический механизм их отдаленных эффектов. Он может

быть обусловлен запуском контролируемого, вяло текущего локального продуктивного воспаления, активизирующего компенсаторно-приспособительные и адаптационные реакции организма-хозяина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодеградируемые скаффолды на основе PLA и сополимеров имеют фундаментальный и клинический интерес для биоинженерии мягких и твердых тканей [31, 32], включая печень [33], перспективны

как носители стволовых клеток [34], а также как средства доставки и высвобождения лекарств и биологических молекул [35].

Согласно полученным экспериментальным результатам, биорезорбируемые нетканые PLA матрицы биосовместимы с подкожной клетчаткой и обладают дистантным протекторным действием в отношении функционального состояния печени лабораторных животных. Они могут найти свое применение в качестве клеточных носителей, в том числе при коррекции цитостатических или лучевых поражений и хронических заболеваний печени. Однако конкретные механизмы выявленного эффекта подкожной имплантации PLA матриц на гепатоциты требуют дальнейшего изучения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Jafari M., Paknejad Z., Rad M.R., Motamedian S.R., Eghbal M.J., Nadjmi N. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2017;105(2):431–459. DOI: 10.1002/jbm.b.33547.
- Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P. et al. 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.
- Zhou J., Han S., Dou Y., Lu J., Wang C., He H. et al. Nanostructured poly(L-lactide) matrix as novel platform for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2013;448(1):175–188. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.038.
- Wulf K., Arbeiter D., Matschegewski C., Teske M., Huling J., Schmitz K.P. et al. Smart releasing electrospun nanofibers-poly: L. lactide fibers as dual drug delivery system for biomedical application. *Biomed. Mater.* 2020;16(1):015022. DOI: 10.1088/1748-605X/abbec8.
- Biomaterials science: an introduction to materials in medicine; 2nd ed.; ed. by B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004:851.
- Do A.V., Khorsand B., Geary S.M., Salem A.K. 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv. Healthc. Mater.* 2015;4(12):1742–1762. DOI: 10.1002/adhm.201500168.
- Daristotle J.L., Behrens A.M., Sandler A.D., Kofinas P.A. Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016;8(51):34951–34963. DOI: 10.1021/acsami.6b12994.
- Tverdokhlebov S.I., Stankevich K.S., Bolbasov E.N., Khlusov I.A., Kulagina I.V., Zaytsev K.V. Nonwoven polylactide scaffolds obtained by solution blow spinning and the *in vitro* degradation dynamics. *Advanced Materials Research.* 2014;872:257–263.
- Bolbasov E.N., Popkov A.V., Popkov D.A., Gorbach E.N., Khlusov I.A., Golovkin A.S. et al. Osteoinductive composite coatings for flexible intramedullary nails. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017;75:207–220. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.073.
- Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник; под ред. В.В. Меньшикова. М.: 1987:368.
- Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия. М.: Медицина; 2006:192.
- Clark D., Nakamura M., Miclau T., Marcucio R. Effects of aging on fracture healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2017;15(6):601–608. DOI: 10.1007/s11914-017-0413-9.
- Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., Lin T.H., Yao Z., Goodman S.B. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 2016;86:119–130. DOI: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
- Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Норкин И.К., Иванов П.А., Хлусов И.А. и др. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. *Цитология.* 2020;62(5):305–315. DOI: 10.31857/S0041377120050090.
- ElHawary H., Baradaran A., Abi-Rafeh J., Vorstenbosch J., Xu L., Efanov J.I. Bone healing and inflammation: Principles of fracture and repair. *Semin. Plast. Surg.* 2021;35(3):198–203. DOI: 10.1055/s-0041-1732334.
- Файерс У. Биологические методы лечения фактором некроза опухолей: преклинические исследования. В кн. Биологические методы лечения онкологических заболеваний: пер. с англ.; под ред. В.Т. ДеВита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. М.: Медицина; 2002:309–343.
- Milenkovic L., Rettori V., Snyder G.D., Beutler B., McCann S.M. Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989;86(7):2418–2422. DOI: 10.1073/pnas.86.7.2418.
- Гормонотерапия: пер. с нем.; под ред. Х. Шамбаха, Г. Кнаппе, В. Карола. М.: Медицина, 1988:416.
- Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Удуд В.В., Наумов С.А., Хлусов И.А. Закономерности структурной организации систем жизнеобеспечения в норме и при развитии патологического процесса. Томск, 1996:283.
- Yang W.H., Park H., Grau M., Heine O. Decreased blood glucose and lactate: Is a useful indicator of recovery ability in athletes? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020;17(15):5470. DOI: 10.3390/ijerph17155470.
- Selye H., Lemire Y., Bajusz E. Induction of bone, cartilage and hemopoietic tissue by subcutaneously implanted tissue diaphragms. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Mech. Org.* 1960;151(5):572–585. DOI: 10.1007/BF00577813.
- Войтенко Н.Г., Макарова М.Н., Зуева А.А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2020;(1):47–53. DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-06.
- Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике: справочник. М.: МИА; 1998:303.
- Хлусов И.А., Хлусова М.Ю. Способ дистантной стимуляции регенерации гепатоцитов: Патент РФ на изобретение № 2590859 от 15.06.2016 (опубликовано 10.07.2016, Бюл. № 19).
- Северин М.В., Юшков Б.Г., Ястребов А.П. Регенерация тканей при экстремальных воздействиях на организм. Екатеринбург: УрГМИ, 1993:187.

26. Бадер А. Способ регенерации ткани: Патент РФ на изобретение № 2392314 от 20.06.2010.
27. Haas R., Smith J., Rocher-Ros V., Nadkarni S., Montero-Melendez T., D'Acquisto F. et al. Lactate regulates metabolic and pro-inflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* 2015;13(7):e1002202. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002202.
28. Pucino V., Bombardieri M., Pitzalis C., Mauro C. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 2017;47(1):14–21. DOI: 10.1002/eji.201646477.
29. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. М.: Медицина; 1985:256.
30. Хлусов И.А., Игумнов В.А., Чухнова Д.Л., Митасова О.Л., Зайцев К.В., Абдуллина Н.Г. и др. Локальные и системные эффекты имплантатов гиалуроновой кислоты при коррекции возрастных изменений кожи. *Бюллетень сибирской медицины.* 2013;12(1):61–68.
31. Grémare A., Guduric V., Bareille R., Heroguez V., Latour S., L'heureux N. et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2018;106(4):887–894. DOI: 10.1002/jbm.a.36289.
32. Gangolphe L., Leon-Valdivieso C.Y., Nottelet B., Déjean S., Bethry A., Pinese C. et al. Electrospun microstructured PLA-based scaffolds featuring relevant anisotropic, mechanical and degradation characteristics for soft tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2021;129:112339. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112339.
33. Wang M., Pei H., Zhang L., Guan L., Zhang R., Jia Y. et al. Hepatogenesis of adipose-derived stem cells on poly-lactide-co-glycolide scaffolds: in vitro and in vivo studies. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2010;16(5):1041–1050. DOI: 10.1089/ten.TEC.2009.0244.
34. Diomedea F., Gugliandolo A., Cardelli P., Merciaro I., Ettorre V., Traini T. et al. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: A new tool for bone defect repair. *Stem. Cell Res. Ther.* 2018;9(1):104. DOI: 10.1186/s13287-018-0850-0.
35. Eğri S., Eczacıoğlu N. Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017;45(2):321–329. DOI: 10.3109/21691401.2016.1147454.

Вклад авторов

Дворниченко М.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста. Иванова Е.А., Дзюман А.Н. – проведение исследования, сбор, перевод и обработка материала.

Информация об авторах

Иванова Екатерина Александровна – ст. преподаватель, кафедра анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии; ассистент, лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0002-4119-7562>

Дзюман Анна Николаевна – канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0002-0795-0987>.

Дворниченко Марина Владимировна – д-р мед. наук, профессор кафедры анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии; науч. сотрудник, лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ, г. Томск, dochic@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9783-0817>

(✉) Дворниченко Марина Владимировна, dochic@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.02.2022;
одобрена после рецензирования 05.03.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 618.39-02:616.127-018.63-002.88]-092.9:599323.4
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-72-78>

Влияние преждевременного рождения крыс на пролиферацию и гиперплазию кардиомиоцитов

Иванова В.В.¹, Мильто И.В.^{1,2}, Серебрякова О.Н.¹, Суходоло И.В.¹

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

² Северский биофизический научный центр (СБН Центр)
Россия, 636013, г. Северск-13, а/я № 130

РЕЗЮМЕ

Цель. Установить влияние преждевременного рождения на процессы пролиферации и гиперплазии кардиомиоцитов в раннем постнатальном периоде онтогенеза у крыс.

Материалы и методы. Преждевременные роды (на 21-е и 21,5-е сут беременности) крыс линии Вистар индуцировали подкожным введением мифепристона. Иммуногистохимически в левом желудочке преждевременно рожденных и доношенных крыс на 1, 2, 3, 4, 5 и 6-е сут постнатального периода онтогенеза выявляли и подсчитывали количество Ki67-позитивных и Mklp2-позитивных кардиомиоцитов. С помощью критерия Шапиро – Уилка и критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони провели статистический анализ морфометрических показателей.

Результаты. Продemonстрировано увеличение количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов в левом желудочке сердца крыс: на 1-е сут постнатального периода онтогенеза (у рожденных на 21-е сут беременности) и на 3–5-е сут постнатального периода онтогенеза (у рожденных на 21,5-е сут беременности). Преждевременное рождение не приводит к изменению количества Mklp2-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс.

Заключение. В раннем постнатальном периоде онтогенеза продемонстрировано изменение паттерна экспрессии Ki67 кардиомиоцитами крыс, рожденных на 12 или 24 ч ранее срока. Изолированное увеличение экспрессии Ki67 без изменения экспрессии Mklp2 кардиомиоцитами в стенке левого желудочка преждевременно рожденных крыс свидетельствует об акселерации гипертрофии кардиомиоцитов. Меньшая продолжительность внутриутробного периода развития ассоциирована с более выраженными морфофункциональными перестройками миокарда крыс.

Ключевые слова: преждевременное рождение, кардиомиоцит, пролиферация, гиперплазия, гипертрофия, эксперимент

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

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет – 2030».

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 8475/1 от 30.11.2020).

Для цитирования: Иванова В.В., Мильто И.В., Серебрякова О.Н., Суходоло И.В. Влияние преждевременного рождения крыс на пролиферацию и гиперплазию кардиомиоцитов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):72–78. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-72-78>.

Effect of preterm birth in rats on proliferation and hyperplasia of cardiomyocytes

Ivanova V.V.¹, Milto I.V.^{1,2}, Serebryakova O.N.¹, Sukhodolo I.V.¹

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Seversk Biophysical Research Center

P.O. Box 130, Seversk-13, 636013, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To identify the effect of preterm birth on proliferation and hyperplasia of cardiomyocytes in the early postnatal period of ontogenesis in rats.

Materials and methods. Preterm birth (on day 21 and 21.5 of gestation) in Wistar rats was induced by subcutaneous administration of mifepristone. Immunohistochemistry was used to identify and calculate the number of Ki67-positive and Mklp2-positive cardiomyocytes in the left ventricle of preterm and full-term rats on days 1, 2, 3, 4, 5, and 6 of postnatal ontogenesis. Statistical analysis of morphometric parameters was performed using the Shapiro – Wilk test and Mann – Whitney test with the Bonferroni correction.

Results. We revealed an increase in the number of Ki67-positive cardiomyocytes in the left ventricle of the rats: on day 1 of postnatal ontogenesis (in the rats born on day 21 of gestation) and on days 3–5 of postnatal ontogenesis (in the rats born on day 21.5 of gestation). Preterm birth in rats did not result in a change in the number of Mklp2-positive cardiomyocytes in the left ventricular wall.

Conclusion. A change in the pattern of Ki67 expression by cardiomyocytes in the rats born 12 or 24 hours before full term was demonstrated in the early postnatal period of ontogenesis. An isolated increase in Ki67 expression without a change in Mklp2 expression by cardiomyocytes in the left ventricular wall of preterm rats indicates acceleration of cardiomyocyte hypertrophy. Shorter duration of prenatal development is associated with more pronounced morphological and functional rearrangements in the rat myocardium.

Keywords: preterm birth; cardiomyocyte; proliferation; hyperplasia; hypertrophy, experiment

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

Source of financing. The study was carried out within the strategic academic leadership program “Priority 2030”.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 8475/1 of 30.11.2020).

For citation: Ivanova V.V., Milto I.V., Serebryakova O.N., Sukhodolo I.V. Effect of preterm birth in rats on proliferation and hyperplasia of cardiomyocytes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):72–78. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-72-78>.

ВВЕДЕНИЕ

Преждевременное рождение (рождение ранее 37 нед беременности) увеличивает риск раннего развития заболеваний сердечно-сосудистой системы [1, 2]: ишемической болезни сердца [3], гипертонической болезни, сердечной недостаточности [4]. Преждевременное рождение ассоциировано со структурной и функциональной незрелостью органов, что является причиной их адаптивного морфогенеза в постнатальном периоде. Показано, что различий в

строении сердца доношенных и преждевременно рожденных детей в пренатальном периоде онтогенеза не наблюдается, начальные структурные изменения сердца у преждевременно рожденных детей формируются в постнатальном периоде [5]. Известно, что морфофункциональные особенности сердца у преждевременно рожденных детей определяются уже на 3-м мес постнатального периода онтогенеза: наблюдается увеличение относительной массы правого и левого желудочков по сравнению с таковыми у доношенных сверстников [5]. С течением времени

структурные особенности сердца преждевременно рожденных детей сохраняются [6] и могут служить предпосылкой для более раннего развития у данной категории лиц заболеваний сердечно-сосудистой системы [7].

Каким образом преждевременное рождение приводит к формированию структурно-функциональных особенностей сердца, остается неясным, несмотря на пристальное внимание исследователей к данной проблеме [8]. Вместе с тем коррекция в раннем постнатальном периоде онтогенеза структурных особенностей сердца у преждевременно рожденных детей может предупредить развитие или уменьшить риск развития у них заболеваний сердечно-сосудистой системы во взрослом возрасте [9–11].

Определение и детальная характеристика морфофункциональных изменений сердца преждевременно рожденных детей в раннем постнатальном периоде являются первоочередной задачей, решение которой осложняется отсутствием гистологических исследований. Единичные работы, посвященные гистологической характеристике миокарда преждевременно рожденных детей, сложны для интерпретации, так как в качестве контроля используются сердца мертворожденных детей [12], в то время как наибольший интерес представляет именно адаптация сердца и кровеносных сосудов к условиям функционирования *ex utero*. В связи с этим актуальным являются установление, изучение динамики и последствий постнатальных морфофункциональных особенностей сердца у преждевременно рожденных животных в эксперименте. Цель исследования: установить влияние преждевременного рождения на процессы пролиферации и гиперплазии кардиомиоцитов в раннем постнатальном периоде онтогенеза у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использованы крысы линии Вистар обоего пола. Полный срок беременности крыс линии Вистар составляет 22 сут. Рожденные за 2 сут до срока крысы являются нежизнеспособными. Крысы, рожденные на 1 сут ранее срока, характеризуются достаточной степенью структурной и функциональной незрелости органов и используются в качестве модели для исследования эффектов преждевременного рождения [13, 14]. На основании клинических данных, согласно которым выраженность морфофункциональных особенностей сердца и сосудов коррелирует со степенью недоношенности [15, 16], а также сведений о том, что даже умеренная степень недоношенности приводит к нарушению функционирования сердечно-сосудистой системы

во взрослом возрасте [17], в исследовании выделено две группы преждевременно рожденных крыс, недоношенных на 12 и 24 ч соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика экспериментальных групп		
Группа	Продолжительность внутриутробного периода экспериментальных животных, сут	Срок инъекции мифепристона самкам, сут беременности
Контрольная группа, $n = 30$	22,0	–
Группа 1, $n = 30$	21,5	20,5
Группа 2, $n = 30$	21,0	20,0

Потомство получали от интактных самцов (2 мес, 180 ± 20 г) и самок (3 мес, 180 ± 20 г) крыс линии Вистар, последних содержали в индивидуальных клетках. У самок ежедневно определяли стадию эстрального цикла. К самкам, находящимся в стадии проэструса эстрального цикла, на ночь подсаживали самца. Утром следующего дня самца отсаживали, у самок анализировали влажалищный мазок для верификации коитуса. Первым днем беременности считали день обнаружения у самок во влажалищном мазке сперматозоидов. Беременных самок содержали в индивидуальных клетках и кормили кормом для беременных лабораторных грызунов ЛБК 120 Р-22 (Дельта Фидс, Россия). Индукцию преждевременных родов на 21-е и 21,5-е сут беременности осуществляли подкожным введением крысам мифепристона (1 мл, 10 мг/кг массы тела, Sigma-Aldrich, США) [18].

Выведение крыс из эксперимента осуществляли на 1, 2, 4, 5 и 6-е сут постнатального периода онтогенеза асфиксией CO_2 . Сердце крыс фиксировали в забуференном (рН 7,4) формалине (БиоВитрум, Россия) в течение 24 ч, после чего промывали в проточной воде, обезживали в Isoper (БиоВитрум, Россия) и заливали в парафиновую смесь HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). Срезы, полученные на автоматическом микротоме (HM355S, Thermo Fisher Scientific, Китай), использовали для постановки иммуногистохимической реакции. На срезах непрямым пероксидазным методом выявляли Ki67 (маркер пролиферации) и Mklp2 (маркер цитотомии). Показано, что такой маркер пролиферации, как Ki67, неспецифичен для определения истинного митоза и экспрессируется при эндомитозе [19]. Напротив, Mklp2 (mitotic kinesin-like protein 2) является маркером цитокинеза – заключительной стадии митоза. Таким образом, Mklp2 позволяет выявить клетки, проходящие завершающие стадии митоза [20].

Для демаскировки антигенов депарафинизированные срезы подвергали высокотемпературному

воздействию в цитратном буфере (0,01 М; pH 6,0). В качестве первичных антител использовали ab16667 (Anti-Ki67 antibody [SP6], 1 : 300) и bs-7750r (Anti-Mklp2 antibody, 1 : 500). Для визуализации первичных антител использовали Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer (Abcam, Великобритания). После постановки иммуногистохимической реакции срезы докрашивали гематоксилином Джилла.

Исследование иммуногистохимических препаратов проводили с помощью светового микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Германия) и цифровой камеры CanonG5 (Canon, Китай). Для определения локализации иммунопозитивных кардиомиоцитов толщину миокарда левого желудочка условно делили на трети: субэпикардальную, среднюю и субэндокардальную. Подсчитывали количество Ki67-позитивных и Mklp2-позитивных кардиомиоцитов в 1 мм² площади среза стенки левого желудочка.

Статистический анализ проведен с помощью SPSS 16.0 (IBM, США). Использованы критерий Шапиро – Уилка и критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. Результаты морфометрического исследования представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$, уровень статистической значимости различий принят как $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В миокарде левого желудочка крыс Ki67 и Mklp-2 выявляются в цитоплазме различных клеток: эндотелиоцитов, фибробластов, кардиомиоцитов (рис.). В наблюдаемые сроки в сердце крыс всех экспериментальных групп Ki67-позитивные кардиомиоциты диффузно локализованы в миокарде левого желудочка, тогда как Mklp2-позитивные кардиомиоциты имеют преимущественно субэндокардальную локализацию.

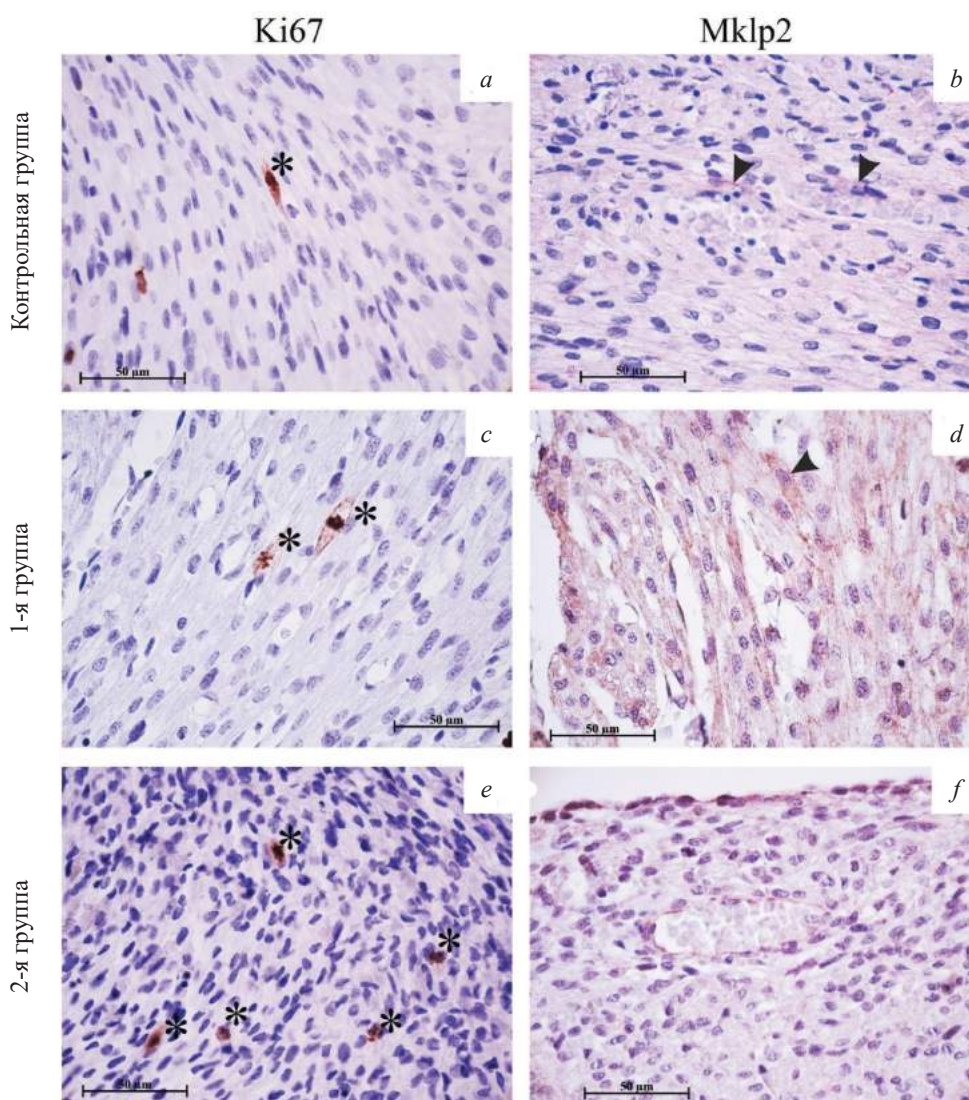


Рисунок. Миокард левого желудочка крысы: контрольной группы (доношенные животные) (a, b), группы 1 – крысы, рожденные на 21,5-е сут беременности (c, d), группы 2 – крысы, рожденные на 21-е сут беременности (e, f), на 1-е сут постнатального периода онтогенеза. Звездочки указывают на Ki67-позитивные кардиомиоциты (a, c, f), головки стрелок указывают на Mklp2-позитивные кардиомиоциты (b, d, f). Окраска: иммуногистохимическая реакция с докраской гематоксилином Джилла

В миокарде левого желудочка крыс всех исследуемых групп на протяжении эксперимента количество Ki67-позитивных кардиомиоцитов превышает количество Mklp2-позитивных кардиомиоцитов

(табл. 2). Динамика количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов и Mklp2-позитивных кардиомиоцитов в 1 мм² среза левого желудочка крыс отражена в табл. 2.

Таблица 2

Динамика количества иммунопозитивных кардиомиоцитов в левом желудочке крыс, количество кардиомиоцитов в 1 мм ² , Me (Q ₁ ; Q ₃)						
Группа	Постнатальный период онтогенеза, сут					
	1	2	3	4	5	6
Ki67-позитивные кардиомиоциты						
Контрольная группа	43,8 (37,5; 50,0)	87,5 (68,8; 98,4)	68,8 (62,5; 85,9)	43,8 (25,0; 50,0)	46,9 (37,5; 50,0)	34,4 (20,3; 48,4)
	–	$p_2 = 0,000$	–	$p_2 = 0,001$	–	–
Группа 1	28,1 (14,1; 42,2)	78,1 (68,8; 115,6)	96,9 (71,9; 123,4)	78,1 (57,8; 93,8)	62,5 (51,6; 75,0)	50,0 (37,5; 67,2)
	$p = 0,007$	$p_2 = 0,000$	$p = 0,008$	$p = 0,000$	$p = 0,001$	
Группа 2	71,9 (56,3; 81,3)	84,4 (75,0; 100,0)	65,6 (51,6; 95,3)	43,8 (37,5; 68,8)	46,9 (31,3; 62,3)	43,8 (31,3; 56,3)
	$p_1 = 0,000$	$p_2 = 0,000$	–	$p_1 = 0,000$	–	–
	$p_1 = 0,000$			$p_2 = 0,002$		
Mklp2-позитивные кардиомиоциты						
Контрольная группа	25,0 (0; 50,0)	12,5 (0; 50,0)	12,5 (0; 31,3)	0 (0; 25,0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
	$p_3 = 0,002$	$p_{33} = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$
Группа 1	25,0 (0; 50,0)	0 (0; 31,3)	0 (0; 31,3)	0 (0; 25,0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
	$p_3 = 0,009$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$
Группа 2	12,5 (0; 31,3)	0 (0; 31,3)	0 (0; 25,0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$	$p_3 = 0,000$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению с показателем контрольной группы (p), показателем группы 1 (p_1) с соответствующим показателем на предыдущий срок (p_2). Уровень статистической значимости различий количества Ki67-позитивных и Mklp2-позитивных кардиомиоцитов в 1 мм² среза левого желудочка крыс аналогичных групп в соответствующие сроки (p_3).

Во всех экспериментальных группах количество Ki67-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс максимально на 2–3-е сут постнатального периода онтогенеза, после чего прогрессивно снижается. У крыс группы 1 наблюдается более позднее увеличение количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка по сравнению с таковым у животных контрольной группы. Продemonстрировано увеличение количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов в левом желудочке сердца крыс группы 1 на 3–5-е сут постнатального периода онтогенеза. Напротив, у крыс группы 2 количество Ki67-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка превышает показатель крыс группы 1 и контрольной группы и на 1-е сут постнатального периода онтогенеза.

Количество Mklp2-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс всех исследуемых групп в ходе эксперимента прогрессивно снижается. Преждевременное рождение не приводит к изменению количества Mklp2-позитивных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании применена общепризнанная модель индукции преждевременных родов у крыс [21–23]. У крыс перед родами наблюдается снижение

концентрации прогестерона в плазме крови. Известно, что морфофункциональные изменения в матке и плаценте крыс, вызванные инъекцией конкурентного антагониста прогестерона мифепристона, идентичны таковым, развивающимся перед родами при доношенной беременности [21–23]. Мифепристон не угнетает лактацию [24], не оказывает токсического эффекта и не вызывает гибели плодов и новорожденного потомства [18, 25, 26].

За последние сутки пренатального периода онтогенеза масса сердца крыс возрастает с 15,8 до 25,9 мг [27]; объем левого желудочка увеличивается с 4,14 до 6,72 мм³ [28]. Увеличение размеров сердца крыс в плодном периоде, а также в раннем постнатальном периоде онтогенеза обусловлено пролиферацией кардиомиоцитов. Продemonстрировано, что в 1–2-е сут постнатального периода онтогенеза продолжается увеличение пула кардиомиоцитов (гиперплазия кардиомиоцитов), что согласуется с данными F. Li и соавт. [29]. Продemonстрировано, что гиперпластический тип роста миокарда в постнатальном периоде онтогенеза затрагивает, в основном, субэндокардиальную зону миокарда. На 3–4-е сут постнатального периода онтогенеза кардиомиоциты крыс теряют способность завершать цитокинез: полноценные митозы полностью сменяются эндомитозом (гипертрофия кардиомиоцитов). Чтобы оценить, при-

ведет ли преждевременное рождение к изменению времени перехода миокарда с гиперпластического типа роста на гипертрофический тип, изучали динамику количества Ki67- и Mklp2-позитивных кардиомиоцитов у преждевременно рожденных крыс с 1-е по 6-е сут постнатального периода онтогенеза.

Преждевременное рождение не сопровождается компенсаторным увеличением количества Mklp2-позитивных кардиомиоцитов или изменением временного паттерна экспрессии Mklp2 в миокарде левого желудочка крыс. Изолированное увеличение экспрессии Ki67 без изменения экспрессии Mklp2 кардиомиоцитами в стенке левого желудочка преждевременно рожденных крыс свидетельствует об акселерации гипертрофии кардиомиоцитов, что может быть причиной снижения миокардиального резерва. Вероятно, увеличение экспрессии Ki67 кардиомиоцитами стенки левого желудочка преждевременно рожденных крыс является отражением так называемого догоняющего роста, а также адаптивной реакцией структурно незрелого сердца на увеличение гемодинамической нагрузки в связи с рождением и ростом животного.

Стоит отметить, что увеличение количества Ki67-позитивных кардиомиоцитов левого желудочка у крыс, рожденных на 21-е сут беременности, относительно такового у животных контрольной группы и животных, рожденных на 21,5-е сут беременности, наблюдается уже на 1-е сут постнатального периода онтогенеза. Вероятно, большая структурная незрелость сердца является причиной более выраженных морфофункциональных перестроек органа в результате рождения. Учитывая короткую продолжительность плодного этапа пренатального периода онтогенеза крыс (для крыс линии Вистар с 18-х по 22-е сут эмбриогенеза) и высокую интенсивность органогенеза в этот период, вероятно, что разница в продолжительности беременности в 0,5 сут может быть причиной отличного эффекта преждевременного рождения на морфофункциональное состояние миокарда крыс. Для детального понимания причин наблюдаемых отличий эффекта преждевременного рождения на пролиферацию кардиомиоцитов крыс, недоношенных на 12 и 24 ч, необходимы дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В раннем постнатальном периоде онтогенеза продемонстрировано изменение паттерна экспрессии Ki67 кардиомиоцитами крыс, рожденных на 12 или 24 ч ранее срока. Изолированное увеличение экспрессии Ki67 без изменения экспрессии Mklp2 кардиомиоцитами в стенке левого желудочка преж-

девременно рожденных крыс свидетельствует об акселерации гипертрофии кардиомиоцитов. Меньшая продолжительность внутриутробного периода развития ассоциирована с более выраженными морфофункциональными перестройками миокарда крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lewandowski A.J., Levy P.T., Bates M.L., McNamara P.J., Nuyt A.M., Goss K.N. Impact of the vulnerable preterm heart and circulation on adult cardiovascular disease risk. *Hypertension*. 2020;76 (4):1028–1037. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15574.
2. Huckstep O.J., Burchert H., Williamson W., Telles F., Tan C., Bertagnolli M. et al. Impaired myocardial reserve underlies reduced exercise capacity and heart rate recovery in preterm-born young adults. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*. 2021;22(5):572–580. DOI: 10.1093/ehjci/jeaa060.
3. Crump C., Howell E.A., Stroustrup A., McLaughlin M.A., Sundquist J., Sundquist K. Association of preterm birth with risk of ischemic heart disease in adulthood. *JAMA Pediatr*. 2019;173 (8):736–743. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2019.1327.
4. Carr H., Cnattingius S., Granath F., Ludvigsson J.F., Edstedt Bonamy A.K. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2017;69(21):2634–2642. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.03.572.
5. Aye C., Lewandowski A.J., Lamata P., Upton R., Davis E., Ohuma E.O. et al. Disproportionate cardiac hypertrophy during early postnatal development in infants born preterm. *Pediatr. Res*. 2017;82(1):36–46. DOI: 10.1038/pr.2017.96.
6. Mohlert L.A., Hallberg J., Broberg O., Rydberg A., Halvorsen C.P., Liuba P. et al. The preterm heart in childhood: Left ventricular structure, geometry, and function assessed by echocardiography in 6-year-old survivors of periviable births. *J. Am. Heart Assoc*. 2018;7(2):e007742. DOI: 10.1161/JAHA.117.007742.
7. Burchert H., Lewandowski A.J. Preterm birth is a novel, independent risk factor for altered cardiac remodeling and early heart failure: Is it time for a new cardiomyopathy? *Curr. Treat. Options Cardio. Med*. 2019;21(2):8. DOI: 10.1007/s11936-019-0712-9.
8. Goss K.N., Haraldsdottir K., Beshish A.G., Barton G.P., Watson A.M., Palta M. et al. Association between preterm birth and arrested cardiac growth in adolescents and young adults. *JAMA Cardiol*. 2020;5(8):910–919. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1511.
9. Alsaied T., Omar K., James J.F., Hinton R.B., Crombleholme T.M., Habli M. Fetal origins of adult cardiac disease: a novel approach to prevent fetal growth restriction induced cardiac dysfunction using insulin like growth factor. *Pediatr. Res*. 2017;81(6):919–925. DOI: 10.1038/pr.2017.18.
10. Vrselja A., Pillow J.J., Black M.J. Effect of preterm birth on cardiac and cardiomyocyte growth and the consequences of antenatal and postnatal glucocorticoid treatment. *J. Clin. Med*. 2021;10(17):3896. DOI: 10.3390/jcm10173896.
11. Lewandowski A.J., Lamata P., Francis J.M., Piechnik S.K., Ferreira V.M., Boardman H et al. Breast milk consumption in

- preterm neonates and cardiac shape in adulthood. *Pediatrics*. 2016;138 (1): e20160050. DOI: 10.1542/peds.2016-0050.
12. Bensley J.G., Moore L., De Matteo R., Harding R., Black M.J. Impact of preterm birth on the developing myocardium of the neonate. *Pediatr. Res.* 2018;83(4):880–888. DOI: 10.1038/pr.2017.324.
 13. Tanswell A.K., Wong L., Possmayer F., Freeman B.A. The preterm rat: a model for studies of acute and chronic neonatal lung disease. *Pediatr. Res.* 1989;25(5):525–529. DOI: 10.1203/00006450-198905000-00020.
 14. Grases-Pintó B., Torres-Castro P., Abril-Gil M., Castell M., Rodríguez-Lagunas M.J., Pérez-Cano F.J. et al. A preterm rat model for Immunonutritional studies. *Nutrients*. 2009;11(5):999. DOI: 10.3390/nul1050999.
 15. Bensley J.G., De Matteo R., Harding R., Black M.J. The effects of preterm birth and its antecedents on the cardiovascular system. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2016;95(6) 652–663. DOI: 10.1111/aogs.12880.
 16. Telles F., McNamara N., Nanayakkara S., Doyle M.P., Williams M., Yaeger L. et al. Changes in the preterm heart from birth to young adulthood: A meta-analysis. *Pediatrics*. 2020;146(2):e20200146. DOI: 10.1542/peds.2020-0146.
 17. Allison B.J., Nguyen V., Yiallourou S.R., Nitsos I., Black M.J., Polglase G.R. The effect of sex and prematurity on the cardiovascular baroreflex response in sheep. *Exp. Physiol.* 2018;103(1):9–18. DOI: 10.1113/EP086494.
 18. Dudley D.J., Branch D.W., Edwin S.S., Mitchell M.D. Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol. Reprod.* 1996;55(5):992–995. DOI: 10.1095/biolreprod55.5.992.
 19. Alvarez R. Jr., Wang B.J., Quijada P.J., Avitabile D., Ho T., Shaitrit M et al. Cardiomyocyte cell cycle dynamics and proliferation revealed through cardiac-specific transgenesis of fluorescent ubiquitinated cell cycle indicator (FUCCI). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2019;127:154–164. DOI: 10.1016/j.jmcc.2018.12.007.
 20. Jiang Y.H., Zhu Y., Chen S., Wang H.L., Zhou Y., Tang F.Q. et al. Re-enforcing hypoxia-induced polyploid cardiomyocytes enter cytokinesis through activation of β -catenin. *Sci. Rep.* 2019;9:17865. DOI: 10.1038/s41598-019-54334-4.
 21. Rechberger T., Abramson S.R., Woessner J.F. Jr. Onapristone and prostaglandin E2 induction of delivery in the rat in late pregnancy: a model for the analysis of cervical softening. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996;175(3):719–723. DOI: 10.1053/ob.1996.v175.a74254.
 22. Fang X., Wong S., Mitchell B.F. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their Receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology*. 1997;138(7):2763–2768. DOI: 10.1210/endo.138.7.5247.
 23. Li Y., Je H.D., Malek S., Morgan K.G. Role of ERK1/2 in uterine contractility and preterm labor in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.* 2004;287(2):R328–R335. DOI: 10.1152/ajpregu.00042.2004.
 24. Кузьминых Т.У., Петросян М.А. Сравнительная оценка влияния синтетических антигестагенов на сроки наступления родовой деятельности крыс и постнатальное развитие потомства. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2009;2:34–39.
 25. Cadepond F., Ulmann A., Baulieu E.E. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu. Rev. Med.* 1997;48:129–156. DOI: 10.1146/annurev.med.48.1.129. PMID: 9046951.
 26. Nielsen B.W., Bonney E.A., Pearce B.D., Donahue L.R., Sarkar I.N., Preterm Birth International Collaborative (PRE-BIC). A cross-species analysis of animal models for the investigation of preterm birth mechanisms. *Reprod. Sci.* 2016;23(4):482–491. DOI: 10.1177/1933719115604729.
 27. Clark C.M. Jr. Characterization of glucose metabolism in the isolated rat heart during fetal and early neonatal development. *Diabetes*. 1973;22(1):41–49. DOI: 10.2337/diab.22.1.41.
 28. Ito T., Harada K., Takada G. In situ morphometric analysis of left and right ventricles in fetal rats: changes in ventricular volume, mass, wall thickness, and valvular size. *Tohoku J. Exp. Med.* 2001;193(1):37–44. DOI: 10.1620/tjem.193.37.
 29. Li F., Wang X., Bunker P.C., Gerdes A.M. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997;29(6):1541–1551. DOI: 10.1006/jmcc.1997.0381.

Информация об авторах

Иванова Вера Владимировна – канд. биол. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, ivvera92@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2530-1112>

Мильто Иван Васильевич – д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск; зам. директора по научной работе СБН Центр, г. Северск-13, milto_bio@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9764-4392>

Серебрякова Ольга Николаевна – ассистент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, oserebryakovan@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2924-0724>

Суходоло Ирина Владимировна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, staranie@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9848-2068>

(✉) **Иванова Вера Владимировна**, ivvera92@rambler.ru

Поступила в редакцию 09.11.2021;
одобрена после рецензирования 18.01.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 575.174.015.3:577.34

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-79-87>

Поиск полиморфных вариантов кандидатных генов индивидуальной радиочувствительности

Исубакова Д.С.¹, Литвяков Н.В.^{1,2}, Цымбал О.С.¹, Усова Т.В.¹, Цыпленкова М.Ю.¹,
Мильто И.В.^{1,3}, Тахауов Р.М.^{1,3}

¹ Северский биофизический научный центр (СБН Центр)
Россия, 636013, Томская обл., г. Северск-13, а/я 130

² Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Цитогенетические нарушения (ЦН) лимфоцитов, индуцированные «малыми» дозами (до 100 мЗв) ионизирующего излучения (ИИ), являются основными цитогенетическими признаками индивидуальной радиочувствительности организма человека. Помимо репарации ДНК и гибели клеток, которые влияют на формирование ЦН и их элиминацию, вклад в последствия воздействия ИИ на клетку может реализоваться за счет изменений пролиферации клеток с нерепарированными дефектами ДНК. Определяющую роль в регуляции пролиферации клеток играет система циклинов и циклин-зависимых киназ, которые обеспечивают координацию митотических событий при прохождении клеточного цикла.

Цель. Оценить связь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов клеточного цикла с повышенной частотой ЦН, возникших у персонала объекта использования атомной энергии, под действием длительного техногенного профессионального облучения ИИ в диапазоне доз 100–500 мЗв.

Материалы и методы. Объектом исследования служила кровь 55 условно здоровых работников Сибирского химического комбината (СХК), подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности длительного техногенному радиационному воздействию (γ -излучение) в дозах 100–500 мЗв. Для всех обследованных лиц проводили стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов крови. Геномную ДНК из крови работников выделяли с помощью набора QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen, Германия). Генотипировали ДНК по 257 ОНП генов циклинов и межгенных областей вблизи генов циклинов с помощью ДНК-чипов высокой плотности CytoScan HD Array (Affymetrix, США).

Результаты. Установлено, что с учетом поправки Бонферрони имеются только статистически значимые связи ОНП с высокой частотой дицентрических хромосом, все остальные типы изученных ЦН не показали достоверных отличий. С повышенной частотой дицентрических хромосом, возникающих под действием длительного техногенного профессионального облучения ИИ, ассоциирован rs803054 CCN2.

Заключение. Обнаруженный ОНП (rs803054), рецессивный генотип которого ассоциирован с повышенной частотой дицентрических хромосом у работников СХК, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности длительного техногенному радиационному воздействию (γ -излучение) в дозах 100–500 мЗв, можно рассматривать в качестве потенциального маркера индивидуальной радиочувствительности. Для подтверждения выявленных ассоциаций необходимы дальнейшие валидационные исследования на расширенной выборке людей, подвергавшихся длительному техногенному профессиональному облучению ИИ.

✉ Исубакова Дарья Сергеевна, isubakova.daria@yandex.ru

Ключевые слова: ионизирующее излучение, индивидуальная радиочувствительность, хромосомные аберрации, полиморфизм генов, микроматричный анализ

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

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания № 388-00162-22-00 от 01.03.2022.

Соответствие принципам этики. Все доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Для цитирования: Исубакова Д.С., Литвяков Н.В., Цымбал О.С., Усова Т.В., Цыпленкова М.Ю., Мильто И.В., Тахауов Р.М. Поиск полиморфных вариантов кандидатных генов индивидуальной радиочувствительности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):79–87. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-79-87>.

Search for polymorphic variants of candidate genes contributing to individual radiosensitivity

Isubakova D.S.¹, Litviakov N.V.^{1,2}, Tsymbal O.S.¹, Usova T.V.¹, Tsyplenkova M.Yu.¹, Milto I.V.^{1,3}, Takhauov R.M.^{1,3}

¹ Seversk Biophysical Research Center
P.O. Box-130, Seversk-13, 636013, Russian Federation

² Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center (NRMС), Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny Lane, Tomsk, 634009, Russian Federation

³ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Cytogenetic damage (CD) in lymphocytes induced by low doses (up to 0.1 Sv) of ionizing radiation (IR) is the main cytogenetic sign of individual radiosensitivity of the human body. In addition to DNA repair and cell death, which affect the formation of CD and its elimination, IR effects on the cell can be manifested through changes in proliferation of cells with unrepaired DNA damage. The system of cyclins and cyclin-dependent kinases (CDK), which provide coordination of mitotic events during passage of a cell through the cell cycle, plays a crucial role in regulation of cell proliferation.

Aim To evaluate the relationship of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of cell cycle genes with an increased frequency of CD in workers of a nuclear power plant affected by chronic occupational radiation exposure in the dose range of 100–500 mSv.

Materials and methods. The object of the study was blood of 55 conditionally healthy workers of Siberian Chemical Plant (SCP) who were affected by chronic occupational radiation exposure (gamma radiation) in the dose range of 100–500 mSv. A standard cytogenetic analysis of blood lymphocytes was performed for all examined individuals. Genomic DNA was isolated from the blood of the workers using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany). DNA was genotyped using 257 SNPs of cyclin genes and neighboring intergenic regions using DNA microarrays from the high-density CytoScan HD Array (Affymetrix, USA).

Results. Taking into account the Bonferroni correction, only statistically significant associations of SNPs with the frequency of dicentric chromosomes were found; all other types of chromosomal aberrations did not show statistical significance. The rs803054 *CCN12* was associated with an increased frequency of dicentric chromosomes arising under the influence of chronic occupational radiation exposure.

Conclusion. The discovered SNP (rs803054), whose recessive genotype is associated with an increased frequency of dicentric chromosomes in workers of SCP exposed to radiation at doses of 100–500 mSv over a long time, can

be considered as a potential marker of individual radiosensitivity. To confirm the identified associations, further validation studies are needed on an expanded sample of people affected by chronic occupational radiation exposure.

Keywords: ionizing radiation, individual radiosensitivity, chromosomal aberrations, gene polymorphism, microarray analysis

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

Source of financing. The study was carried out within the framework of state assignment No. 388-00162-22-00 dated 01.03.2022.

Conformity with the principles of ethics. All donors signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at Cancer Research Institute of Tomsk NRMC.

For citation: Isubakova D.S., Litviakov N.V., Tsymbal O.S., Usova T.V., Tsyplenkova M.Yu., Milto I.V., Takhaouov R.M. Search for polymorphic variants of candidate genes contributing to individual radiosensitivity. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):79–87. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-79-87>.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из цитогенетических признаков индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ) организма человека считают частоту индуцированных цитогенетических нарушений (ЦН), а также формирование радиогенной патологии, среди которой лидирующие позиции занимают опухолевые заболевания [1–3]. Лимфоциты являются клетками организма человека, наиболее чувствительными к действию ионизирующего излучения (ИИ). Лимфоциты крови с индуцированными ЦН элиминируются из организма посредством различных форм гибели, таких как апоптоз, некроз, некроптоз, аутофагическая гибель, митотическая катастрофа и ускоренное старение облученных клеток [4–6], однако при нарушении этих механизмов гибели или снижении их активности за счет нормальной вариабельности генома лимфоциты с ЦН могут накапливаться, что проявляется в увеличении частоты ЦН даже при «малых» дозах ИИ.

Еще одним механизмом накопления частоты ЦН является пролиферация лимфоцитов, поскольку хорошо известно, что в процессе пролиферации элиминируются aberrации хромосомного типа [1, 2]. Определяющую роль в регуляции пролиферации играет система циклинов, которые функционируют как регуляторы циклин-зависимых киназ и способствуют временной координации каждого митотического события. Таким образом, помимо вариабельности механизмов репарации и гибели клеток, оказывающих прямое действие на формирование ЦН и их элиминацию, опосредованное действие может быть обусловлено и вариабельностью механизмов пролиферации поврежденных клеток с нерепарированными ЦН.

С помощью технологии микроматриц (microarray) проведено широкогеномное исследование ассоциации 162 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов системы циклинов (*CCNA1*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCNB3*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *CCNE1*, *CCNE2*, *CCNF*, *CCNG1*, *CCNH*, *CCNI*, *CCNI2*, *CCNJ*, *CCNJL*, *CCNK*, *CCNY*), а также 95 межгенных ОНП, находящихся вблизи генов циклинов, с высокой частотой ЦН у персонала Сибирского химического комбината (СХК, 55 человек), подвергавшегося профессиональному облучению в диапазоне доз 100–500 мЗв. В предварительном исследовании при изучении зависимости «доза–эффект» наблюдается плато, т.е. частота цитогенетических нарушений не изменяется с ростом дозы [7, 8], и именно в этом диапазоне доз следует изучать ассоциацию ОНП с повышенной частотой ЦН для оценки ИРЧ.

Цель исследования – оценить связь ОНП генов циклинов и их промоторов с повышенной частотой ЦН, возникших у работников объекта использования атомной энергии (СХК) под действием долговременного техногенного профессионального облучения ИИ в диапазоне доз 100–500 мЗв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали цельную венозную кровь 38 условно здоровых работников СХК, не подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности облучению ИИ – группа контроля, и 55 условно здоровых работников СХК, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному техногенному облучению ИИ (γ-излучение) в дозах 100–500 мЗв – группа исследования. Характеристика обследованных групп представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика обследованных групп работников СХК			
Показатель		Группа контроля, $n = 38$	Группа исследования, $n = 55$
Мужчины/женщины		38/0	55/0
Возраст, лет	Me	52,00	59,00
	L-R	37,00–58,00	54,00–69,00
Стаж работы, лет	Me	20,00	34,00
	L-R	12,00–34,00	29,00–42,00
Доза внешнего облучения, мЗв	Me	–	203,35
	L-R	–	164,00–276,15

Сбор и уточнение информации о донорах биологического материала выполнены с использованием базы данных регионального медико-дозиметрического регистра и архива медицинской документации Северского биофизического научного центра, содержащих сведения обо всех работниках СХК [9]. В соответствии с Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» каждый донор подписал информированное добровольное согласие.

Взятие крови для исследования у доноров проводили из локтевой вены. Кровь забирали в объеме 9 мл в пробирки Vacuette с ЭДТА К3 (Greiner Bio-one, Австрия) и иглой Visio Plus для системы Vacuette, 38 × 0,8 мм, 21G × 11/2 (Greiner Bio-one, Австрия) для последующего выделения ДНК и проведения микроматричного анализа. Для приготовления цитогенетических суспензий кровь забирали в объеме 9 мл в пробирки Vacuette с Li-гепарином (Greiner Bio-one, Австрия) с иглой Visio Plus для системы Vacuette, 38 × 0,8 мм, 21G × 11/2 (Greiner Bio-one, Австрия).

Лицам, включенным в исследование, проводили цитогенетический анализ мононуклеарных лейкоцитов крови. Для культивирования лимфоцитов брали цельную венозную кровь, которую смешивали с питательной средой (15% эмбриональной телячьей сыворотки и 8% среды RPMI 1640, включающей глутамин, фитогемагглютинин, пенициллин) и инкубировали (37 °C) в культуральных флаконах (Corning, США) в суховоздушном шейкере-инкубаторе (Biosan, Латвия). Цитогенетическое исследование проводили на микроскопе Leica DM2500 (Leica, Германия). Анализировали не менее 300 метафазных пластинок у каждого человека. Результаты приводили как частоту ЦН на 100 метафазных пластинок. Определяли следующие виды ЦН: aberrantные клетки, полиплоидные клетки, мультиабберантные клетки (более пяти хромосомных aberrаций), хромосомные и хроматидные фрагменты, кольцевые и дицентрические хромосомы, хроматидные обмены (фигуры типа «крест») и транслокации.

С использованием набора QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen, Германия) из мононуклеарных лейкоцитов крови выделяли ДНК. Чистоту ($A_{260}/A_{280} = 1,80–2,00$, $A_{260}/A_{230} = 1,90–2,15$) и концентрацию (50–150 нг/мкл) ДНК устанавливали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США). Целостность ДНК определяли при помощи капиллярного электрофореза – фрагменты ДНК имели размер более 48 кб.

Изученные ОНП генотипированы на ДНК-чипах Cyto Scan HD Array (Affymetrix, США). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя. Обработку результатов микрочипирования осуществляли с применением программы Chromosome Analysis Suite 4.3 (Affymetrix, США). Для уточнения и идентификации ОНП и генов, к которым они принадлежат, в работе были использованы базы данных Affymetrix DataBases genotypes, NCBI, OMIM и GWAS Catalog, SNPedia.

Изученные ОНП генов циклинов (CCN) и межгенных областей вблизи генов циклинов ($n = 257$):

- CCNA1 (*cyclin A1*): rs7997378, rs3814803, rs17188012;
- CCNA2 (*cyclin A2*): rs3217753, rs3217772, rs3217771;
- CCNB1 (*cyclin B1*): rs1128761;
- CCNB2 (*cyclin B2*): rs28383518, rs28383514, rs75767699, rs169410487, rs16941042, rs16941046, rs28383551;
- CCNB3 (*cyclin B3*): rs12848359, rs12009873, rs7063886, rs6614336, rs12007902, rs17003332;
- CCND1 (*cyclin D1*): rs3212869, rs649392;
- CCND2 (*cyclin D2*): rs3217805, rs4765775, rs3217916, rs3217812, rs3217848, rs3217830, rs11063072, rs3217882, rs3217898, rs3217933;
- CCND3 (*cyclin D3*): rs9369318;
- CCNE1 (*cyclin E1*): rs3218071, rs3218035, rs3218036, rs41520849, rs3218038, rs3218068, rs3218042, rs3218064, rs3218066, rs3218044;
- CCNE2 (*cyclin E2*): rs2467670, rs16893774, rs2278891;
- CCNF (*cyclin F*): rs8052046;
- CCNG1 (*cyclin G1*): rs299322, rs2069345, rs2069347;
- CCNH (*cyclin H*): rs6879293, rs3752862, rs74582239, rs16902635, rs16902632, rs75949864, rs6891010, rs10067098, rs115516306, rs114916935, rs3827607, rs16902623, rs16902625, rs11745338, rs16902631, rs77996308, rs1062035;
- CCNI (*cyclin I*): rs803054, rs803057, rs10006033, rs62302339;

– *CCNJ (cyclin J)*: rs4921132, rs57334361, rs17057562, rs6875660, rs4921270, rs74734346, rs17057596, rs78444213, rs17111275, rs2303059, rs915506, rs6874570, rs6556488, rs11949221, rs17057577, rs6899125, rs754112, rs2421777, rs2421778, rs17057631, rs10052876, rs2421779, rs2421780, rs10038395, rs28595384, rs72814336, rs12657051, rs17057641, rs9313842, rs11596126;

– *CCNK (cyclin K)*: rs10144895, rs3918051, rs3918094, rs2069492, rs2069493, rs3918139, rs3918048;

– *CCNY (cyclin Y)*: rs12261552, rs113182825, rs115589270, rs11816866, rs111374708, rs2295417, rs115469285, rs2504352, rs2504350, rs2474533, rs4934749, rs35745247, rs17593103, rs75954134, rs16936030, rs3003980, rs16936032, rs3013364, rs114206731, rs12241755, rs16936035, rs74979754, rs10508817, rs10827506, rs11010151, rs4934753, rs112496700, rs11591533, rs4934754, rs1345561, rs12248732, rs10508818, rs116338411, rs75609581, rs11010178, rs74866156, rs2086153, rs12242002, rs10827509, rs112818779, rs11595699, rs11010213, rs16936102, rs3003981, rs7067539, rs61449529, rs10827512, rs4934551, rs11010225, rs7910421, rs17500653, rs116009947, rs12249814, rs112091952;

– межгенные области вблизи генов циклинов: rs6817626, rs2138940, rs9566153, rs13153588, rs6509615, rs9547604, rs4865924, rs73537845, rs79959089, rs79226566, rs17053967, rs12508668, rs4241604, rs413127, rs11097684, rs115693938, rs9315437, rs2323125, rs12902628, rs5961171, rs59776629, rs6887755, rs6826342, rs4557282, rs375299, rs4502705, rs6818356, rs7682171, rs13133761, rs4518274, rs6849124, rs6849534, rs6871154, rs323746, rs112520532, rs9603050, rs114501411, rs323758, rs323757, rs1441709, rs2919902, rs984026, rs34383364, rs17285919, rs9547632, rs73770251, rs35556022, rs1517886, rs35000040, rs6892636, rs11749408, rs11749439, rs3909481, rs7250135, rs4805497, rs10422957, rs17002403, rs35204615, rs16963260, rs4998568, rs11882235, rs56400371, rs28582702, rs11881322, rs255259, rs1811302, rs255263, rs77475690, rs11084309, rs410468, rs17053969, rs10514840, rs17053994, rs76165140, rs74045329, rs17054069, rs12866109, rs1517893, rs9315426, rs7489996, rs7692898, rs9594152, rs9603064, rs1474085, rs6822060, rs17054113, rs9603072, rs4943389, rs7317651, rs17191516, rs17054217, rs9547595, rs660005, rs16963219, rs594452.

Анализ данных генотипирования на каждый из изученных ОНП проводили по четырем моделям: доминантной, рецессивной, аддитивной и сверхдо-

минантной. По доминантной модели определяли различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по рецессивному аллелю и гетерозиготными носителями, с одной стороны, и носителями гомозиготными по доминантному аллелю – с другой. По рецессивной модели устанавливали различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по доминантному аллелю и гетерозиготными носителями, с одной стороны, и носителями гомозиготными по рецессивному аллелю – с другой. По аддитивной модели оценивали различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по доминантному аллелю, носителями гомозиготными по рецессивному аллелю и гетерозиготными носителями. При сверхдоминантной модели устанавливали различия в частоте ЦН между носителями гомозиготными по доминантному и рецессивному аллелю, с одной стороны, и гетерозиготными носителями – с другой.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха $Me (L-R)$.

Соответствие распределения генотипов в выборке равновесию Харди – Вайнберга оценивали с помощью программы Court lab HW calculator в формате Excel. Для установления значимости различий между выборками по частоте ЦН применяли критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе проведено цитогенетическое исследование частоты ЦН у работников СХК обеих групп для подтверждения повышенной частоты ЦН у работников группы исследования. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, частота большинства типов ЦН, которые не являются маркерами радиационного воздействия, в обеих группах работников СХК не отличается. Возможно, это является следствием того, что все работники СХК, включенные в данное исследование, проживают и работают в приблизительно идентичных условиях, т.е. выборки тщательно стратифицированы, а группа контроля и группа исследования, на которой была изучена ассоциация высокой частоты ЦН с ОНП, не различаются существенным образом, за исключением маркеров радиационного воздействия – кольцевых и дицентрических хромосом.

Известно, что серьезный вклад в повышение частоты ЦН у человека может вносить образ жизни, например курение, употребление алкоголя и другие вредные привычки, в меньшей степени – экологические условия, а также контакт на производстве с вредными химическими факторами.

Таблица 2

Сравнение частот ЦН у работников СХК группы контроля и группы исследования, на 100 клеток, $Me (L-R)$			
Показатель	Группа контроля, $n = 38$	Группа исследования, $n = 55$	p
Количество aberrантных клеток	1,0000 (0,3333–2,3333)	2,5641 (1,4285–3,3333)	0,0002
Хроматидные фрагменты	0,3316 (0,0000–0,6666)	0,6269 (0,0000–1,3071)	0,1294
Хромосомные фрагменты	0,3268 (0,0000–0,6557)	0,3225 (0,0000–0,9118)	0,5140
Кольцевые хромосомы	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,2724 (0,0000–0,3333)	0,0050
Дицентрические хромосомы	0,3322 (0,0000–0,9493)	0,7712 (0,0000–1,2578)	0,0280
Мультиабберрантные клетки	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,8819
Хроматидные обмены	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,2687
Транслокации	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,8819
Полиплоидные клетки	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,8820

Примечание. Здесь и в табл. 3 полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Отсутствие различий по частоте хроматидных и хромосомных фрагментов, мультиабберрантных клеток, хроматидных обменов, транслокаций и полиплоидных клеток говорит об отсутствии вышеуказанных различий у работников изучаемых групп. Тем не менее частота маркеров радиационного воздействия – кольцевых и дицентрических хромосом, а также частота абберрантных клеток (из-за кольцевых и дицентрических хромосом) статистически выше у работников, подвергавшихся в процессе своей профессиональной деятельности долговременному радиационному воздействию.

На втором этапе исследования проведена оценка ассоциации частоты радиационно-индуцирован-

ных ЦН в зависимости от полиморфных вариантов изученных генов у работников группы исследования. При анализе данных исключены ОНП любого генотипа при $n < 5$, поскольку в условиях малочисленной выборки это увеличивает вероятность ошибки первого рода. Затем исключили ОНП, не соответствующие равновесию Харди – Вайнберга. В результате из 257 ОНП в окончательный статистический анализ было включено 58 ОНП. Далее выявляли их ассоциацию с высокой частотой установленных ЦН.

На рисунке представлены уровни значимости для 58 отобранных ОНП (см. выше) по дицентрическим хромосомам.

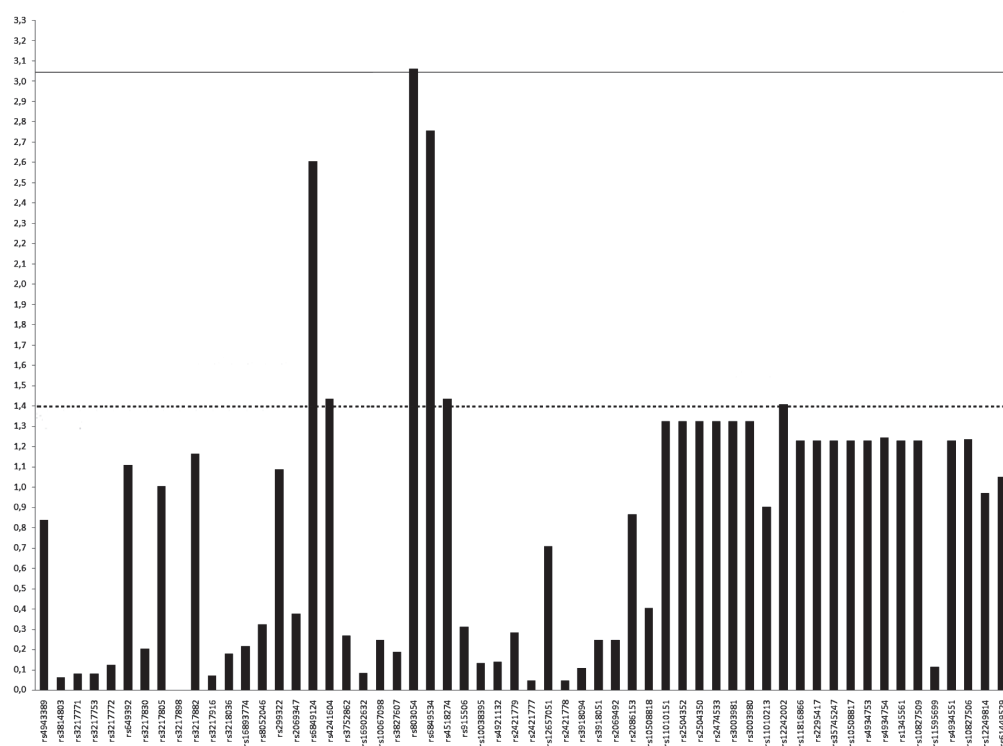


Рисунок. Уровни значимости для рецессивной модели по частоте дицентрических хромосом. Ось ординат – значение p в логарифмических координатах – $(\log_{10})$; пунктирная линия – уровень значимости $p < 0,05$, рассчитанный по критерию Манна – Уитни, сплошная линия – уровень поправки Бонферрони

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые выявлен ОНП rs803054, который можно рассматривать в качестве потенциального маркера ИРЧ. Показано, что работники СХК, гомозиготные по рецессивному аллелю rs803054, имеют повышенную частоту дицентрических хромосом в лимфоцитах крови при хроническом профессиональном облучении ИИ в диапазоне доз 100–500 мЗв. Идентифицированный кандидатный маркер ИРЧ может использоваться при разработке тест-системы для определения генетически детерминированной ИРЧ при помощи ПЦР-системы в режиме реального времени.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Елисова Т.В. Стабильные и нестабильные aberrации хромосом у человека и других млекопитающих в связи с вопросами биологической дозиметрии. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008;48(1):14–27.
2. Балаева Л.С., Сипягина А.Е. Предикторы риска формирования радиационно-индуцированных стохастических заболеваний в поколениях детей из семей облученных родителей – актуальная проблема современности. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019;64(1):7–14. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-1-7-14.
3. Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H. et al. Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(11):26880–26913. DOI: 10.3390/ijms161125991.
4. Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(1):102. DOI: 10.3390/ijms17010102.
5. Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.* 2012;9(3):193–199. DOI: 10.7150/ijms.3635.
6. Freidin M.B., Vasilyeva E.O., Skobelskaya E.V., Goncharova I.A., Karpov A.B., Takhauov R.M. The prevalence and spectrum of chromosomal aberrations in workers of the Siberian Group of Chemical Enterprises. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2005;(2):75–81.
7. Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В., Сазонов А.Э., Васильева Е.О., Альбах Е.Н. и др. Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014;54(3):283–296. DOI: 10.7868/S0869803114030084.
8. Исубакова Д.С., Халюзова М.В., Литвяков Н.В., Брониковская Е.В., Усова Т.В., Тахауов Р.М. и др. Цитогенетические нарушения в лимфоцитах крови у работников Сибирского химического комбината, подвергавшихся профессиональному облучению. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2021;61(4):353–366. DOI: 10.31857/S0869803121040056.
9. Takhauov R.M., Karpov A.B., Albach E.N., Khalyuzova M.V., Freidin M.B., Litviakov N.V. et al. The bank of biological samples representing individuals exposed to long-term ionizing radiation at various doses. *Biopreserv Biobank*. 2015;13(2):72–78. DOI: 10.1089/bio.2014.0035.
10. Choudhry S., Taub M., Mei R., Rodriguez-Santana J., Rodriguez-Cintron W., Shriver M.D. et al. Genome-wide screen for asthma in Puerto Ricans: evidence for association with 5q23 region. *Hum. Genet.* 2008;123(5):455–468. DOI: 10.1007/s00439-008-0495-7.
10. Снигирева Г.П. Последствия воздействий ионизирующих излучений: цитогенетические изменения в лимфоцитах крови человека. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2009:402.
11. Liu C., Zhai X., Zhao B., Wang Y., Xu Z. Cyclin I-like (CCN12) is a cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) activator and is involved in cell cycle regulation. *Sci. Rep.* 2017;7:40979. DOI: 10.1038/srep40979.
12. Taneera J., Fadista J., Ahlqvist E., Zhang M., Wierup N., Renström E. et al. Expression profiling of cell cycle genes in human pancreatic islets with and without type 2 diabetes. *Mol. Cell Endocrinol.* 2013;375(1-2):35–42. DOI: 10.1016/j.mce.2013.05.003.
13. Lai D.M., Bi J.J., Chen Y.H., Wu Y.D., Huang Q.W., Li H.J. et al. CCN12 plays a promoting role in the progression of colorectal cancer. *Cancer Med.* 2021;10(6):1913–1924. DOI: 10.1002/cam4.3504.
14. Chen W., Zhou Y., Wu G., Sun P. CCN12 promotes the progression of human gastric cancer through HDGF. *Cancer Cell Int.* 2021;21:661–673. DOI: 10.1186/s12935-021-02352-6.

Вклад авторов

Исубакова Д.С. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи. Литвяков Н.В. – разработка концепции и дизайна исследования. Цымбал О.С., Усова Т.В., Цыпленкова М.Ю. – сбор и обработка материала, выполнение исследований. Мильто И.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование. Тахауов Р.М. – проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи.

Информация об авторах

Исубакова Дарья Сергеевна – науч. сотрудник, СБН Центр, г. Северск, isubakova.daria@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5032-9096>

Литвяков Николай Васильевич – д-р биол. наук, профессор РАН, вед. науч. сотрудник, СБН Центр, г. Северск; зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, nvlitv72@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Цымбал Ольга Сергеевна – науч. сотрудник, СБН Центр, г. Северск, olga-tsymbal@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2311-0451>

Усова Татьяна Валерьевна – мл. науч. сотрудник, СБН Центр, г. Северск, vishnevskaya_seversk@mail.ru.

Цыпленкова Мария Юрьевна – мл. науч. сотрудник, СБН Центр, г. Северск, mariatsypchenkova@yandex.ru.

Мильто Иван Васильевич – д-р биол. наук, доцент, зам. директора по научной работе, СБН Центр, г. Северск; профессор кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, milto_bio@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9764-4392>

Тахауов Равиль Манихович – заслуженный врач Российской Федерации, д-р мед. наук, профессор, директор, СБН Центр, г. Северск; профессор кафедры организации здравоохранения и общественного здоровья, СибГМУ, г. Томск, niirm2007@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1994-957X>

(✉) **Исубакова Дарья Сергеевна**, isubakova.daria@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.09.2022;
одобрена после рецензирования 24.10.2022;
принята к публикации 26.10.2022

УДК 616.12-008.46:612.172

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-88-97>

Сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса: роль микроваскулярной дисфункции

Копьева К.В., Мочула А.В., Мальцева А.Н., Гракова Е.В., Шипулин В.В., Гусакова А.М., Завадовский К.В.

Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, Томск, ул. Киевская, 111а

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить взаимосвязь между коронарной микроваскулярной дисфункцией (КМД), биомаркерами фиброза и миокардиального ремоделирования (растворимый ST2 (sST2) и фактор роста фибробластов 23 (FGF-23), матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9), тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 (ТИМП-1), NT-proBNP), параметрами диастолической дисфункции (ДД) и наличием сердечной недостаточности с сохраненной фракцией (СНсФВ) у симптоматичных пациентов.

Материалы и методы. В исследование включены 59 пациентов с необструктивным поражением коронарных артерий (КА) и сохраненной фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) 62 (56; 67)%. Необструктивное поражение КА было подтверждено компьютерной коронарной ангиографией. С помощью динамической CZT-SPECT оценивали параметры миокардиального кровотока в состоянии покоя (rest-MBF) и стресса (stress-MFR) и резерва коронарного кровотока (CFR). Сывороточные уровни сердечных биомаркеров измеряли с помощью иммуноферментного анализа. Всем пациентам проводилась двухмерная трансторакальная эхокардиография для оценки параметров ДД.

Результаты. Сниженный CFR определяли как $CFR \leq 2$. Таким образом, КМД диагностировали на основании сниженного CFR при отсутствии окклюзирующего поражения КА. Распределение пациентов проводилось по значениям CFR: группа 1 включала больных с сохраненным CFR (>2 , $n = 35$), группа 2 – со сниженным CFR (≤ 2 , $n = 24$). В 87,5% случаев у больных с КМД была диагностирована СНсФВ, тогда как у больных без КМД – только в 51,4% ($p < 0,0001$). Значения CFR коррелировали с объемом левого предсердия ($r = -0,527$; $p = 0,001$), отношением E/A ($r = -0,321$; $p = 0,012$) и E/e' ($r = -0,307$; $p = 0,021$). На основании ROC-анализа уровни $sST2 \geq 31,304$ нг/мл ($AUC = 0,730$; $p = 0,004$) и $NT-proBNP \geq 0,034$ пг/мл ($AUC = 0,815$; $p = 0,034$) были определены как пороговые значения для диагностики КМД у пациентов с необструктивным поражением КА.

Закключение. КМД может играть важную роль в патогенезе развития СНсФВ. Значения CFR коррелировали с параметрами ДД, а снижение CFR было связано с гиперэкспрессией сердечных биомаркеров фиброза и ремоделирования. Уровни sST2 и NT-proBNP могут использоваться в качестве маркеров неинвазивной диагностики КМД.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, сохраненная фракция выброса левого желудочка, диастолическая дисфункция, коронарный резерв, миокардиальный кровоток, микрососудистая дисфункция

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

Источник финансирования. Исследование поддержано грантом президента Российской Федерации (МК-4257.2022.3).

Соответствие принципам этики. Информированное письменное согласие было получено от всех пациентов до их включения в данное исследование. Исследование одобрено локальным комитетом по этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 204 от 18.11.2020).

Для цитирования: Копьева К.В., Мочула А.В., Мальцева А.Н., Гракова Е.В., Шипулин В.В., Гусакова А.М., Завадовский К.В. Сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса: роль микроваскулярной дисфункции. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):88–97. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-88-97>.

Heart failure with preserved ejection fraction: the role of microvascular dysfunction

Kopeva K.V., Mochula A.V., Maltseva A.N., Grakova E.V., Shipulin V.V., Gusakova A.M., Zavadovsky K.V.

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Sciences 111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the relationship between coronary microvascular dysfunction (CMD), biomarkers of cardiac fibrosis and cardiac remodeling (soluble ST2 (sST2), fibroblast growth factor-23 (FGF-23), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and NT-proBNP), parameters of diastolic dysfunction (DD), and the presence of heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) in symptomatic patients.

Materials and methods. Study participants were 59 patients with non-obstructive coronary artery disease (CAD) and preserved left ventricular ejection fraction (LVEF) of 62 (56; 67) %. Non-obstructive CAD was verified by coronary computed tomography angiography. Stress- and rest-myocardial blood flow (MBF) and coronary flow reserve (CFR) parameters were evaluated by CZT SPECT. Serum levels of cardiac biomarkers were measured by the enzyme immunoassay. Two-dimensional transthoracic echocardiography was used to assess DD parameters.

Results. Decreased CFR was defined as $CFR \leq 2$. Therefore, CMD was defined as the presence of decreased CFR in the absence of flow-limiting CAD. Distribution of patients was performed by CFR values: group 1 included patients with preserved CFR (>2 , $n = 35$), and group 2 encompassed patients with decreased CFR (≤ 2 , $n = 24$). In 87.5% of cases, patients with CMD were diagnosed with HFpEF, whereas in patients with preserved CFR, heart failure was diagnosed only in 51.4% of cases ($p < 0.0001$). CFR values were correlated with the left atrial volume ($r = -0.527$; $p = 0.001$), E / A ratio ($r = -0.321$, $p = 0.012$), and E / e' ($r = -0.307$; $p = 0.021$). Following the ROC analysis, the levels of $sST2 \geq 31.304$ ng / ml (AUC = 0.730; $p = 0.004$) and $NT-proBNP \geq 0.034$ pg / ml (AUC = 0.815; $p = 0.034$) were identified as cut-off values for the presence of CMD in patients with non-obstructive CAD.

Conclusion. The obtained data suggest that CMD may play an essential role in HFpEF. The values of CFR were correlated with DD parameters, and decreased CFR was associated with overexpression of biomarkers of cardiac fibrosis and cardiac remodeling. Serum levels of sST2 and NT-proBNP were identified as cut-off values for the presence of CMD in patients with non-obstructive CAD.

Keywords: heart failure, preserved left ventricular ejection fraction, diastolic dysfunction, coronary flow reserve, myocardial blood flow, microvascular dysfunction

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

Source of financing. The study was supported by the grant awarded by the President of the Russian Federation MK-4257.2022.3.

Conformity with 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 Cardiology Research Institute of Tomsk NRMC (Protocol No. 204 of 18.11.2020).

For citation: Kopeva K.V., Mochula A.V., Maltseva A.N., Grakova E.V., Shipulin V.V., Gusakova A.M., Zavadovsky K.V. Heart failure with preserved ejection fraction: the role of microvascular dysfunction. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):88–97. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-88-97>.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса (СНсФВ) остается малоизученным клиническим синдромом, несмотря на ее растущую распространенность во всем мире [1, 2]. При этом недостаточное понимание патофизиологии данного состояния отражает отсутствие эффективной таргетной терапии [3, 4]. Недавние исследования показали, что коронарная микроваскулярная дисфункция (КМД) может являться одной из возможных причин развития и прогрессирования СНсФВ [5, 6].

Резерв коронарного кровотока (CFR), определяемый как количественное отношение кровотока гиперемизированного миокарда к кровотоку в покое, отражает функциональную ишемию крупных и мелких сосудов, а при отсутствии обструктивного поражения коронарных артерий (КА) является маркером КМД [7]. С недавним появлением нового класса гамма-камер, оснащенных кадмий-цинк-теллурид (cadmium-zinc-telluride, CZT) полупроводниковыми детекторами, стали доступны измерения CFR с помощью неинвазивной динамической однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) [8, 9]. Этот метод измерения кровотока достаточно протестирован и валидизирован, и может быть более доступным способом визуализации коронарных микроциркуляторных изменений [10] помимо комплексной клинической оценки и традиционных тестов для оценки стресс-индуцированной ишемии [11].

Потенциальные механизмы КМД являются гетерогенными и включают нарушение функции эндотелия, системное воспаление, митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс и т.д. [12–16]. Более того, все эти процессы вызывают адгезию и инфильтрацию моноцитов и стимуляцию интегрированных макрофагов, которые способствуют дифференцировке миофибробластов и в конечном итоге секреции коллагена, что приводит к внеклеточному фиброзу и ремоделированию сердца [10, 11, 13–15]. Таким образом, КМД может играть важную роль в повышенном давлении наполнения левого желудочка (ЛЖ), развитии диастолической дисфункции и патофизиологии СНсФВ в целом [7, 16].

Целью исследования являлась оценка взаимосвязи КМД с биомаркерами фиброза и миокардиального ремоделирования (растворимый ST2 (sST2) и фактор роста фибробластов 23 (FGF-23), матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9), тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 (ТИМП-1), NT-proBNP), параметрами диастолической дисфункции (ДД) и наличием СНсФВ у симптоматичных пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и одобрено локальным комитетом по этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 204 от 18.11.2020). Информированное письменное согласие было получено от всех пациентов до их включения в данное исследование.

Исследуемая популяция. С декабря 2020 г. по январь 2022 г. в исследование были включены 59 пациентов (39 мужчин, средний возраст 65,0 [58,0; 69,0] лет). Все пациенты до включения в исследование не получали оптимального медикаментозного лечения. Критерии включения: 1) необструктивное (<50%) поражение КА; 2) фракция выброса ЛЖ $\geq 50\%$, измеренная с помощью эхокардиографии; 3) ДД ЛЖ/повышенное давление наполнения левого желудочка по данным эхокардиографии; 4) синусовый ритм; 5) подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: 1) перенесенный ранее инфаркт миокарда; 2) плановая коронарная реваскуляризация и (или) предшествующая реваскуляризация КА; 3) систолическое АД > 160 мм рт. ст.; 4) симптоматическая гипотензия со средним систолическим АД менее 90 мм рт. ст.; 5) атриовентрикулярная блокада II–III степени, синдром слабости синусового узла; 6) персистирующая или хроническая фибрилляция и (или) трепетание предсердий; 7) недостаточность или стеноз клапанов сердца 2-й и более степени; 8) гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатия; 9) перенесенная ранее тромбоэмболия легочной артерии с высокой легочной гипертензией 45 мм рт. ст. и более; 10) тяжелая форма бронхиальной астмы и (или) хроническая обструктивная болезнь легких; 11) патология щитовидной железы; 12) скорость клубочковой фильтрации (СКД-EPI) менее 30 мл/мин/м²; 13) печеночная недостаточность класса C по Чайлду – Пью; 14) острые и хронические воспалительные заболевания сердца; 15) уровень гемоглобина менее 100 г/дл; 16) инсульт или транзиторная ишемическая церебральная атака в течение 90 сут до включения в исследование; 17) ожирение (индекс массы тела (ИМТ) более 35 кг/м²); 18) жизнеугрожающие неконтролируемые аритмии.

Эхокардиография. Для выполнения двухмерной трансторакальной эхокардиографии использовался ультразвуковой аппарат Philips Affiniti 70. Все исследования проводились одним высококвалифицированным специалистом. Оценка диастолической дисфункции левого желудочка основывалась на показателях: волна E, отношение E/A, septal e', среднее отношение E/e', индексированный объем левого

предсердия и пиковая скорость трикуспидальной регургитации [17].

Компьютерная коронарная ангиография и динамическая ОФЭКТ. Динамическая CZT-ОФЭКТ и компьютерная коронарная томографическая ангиография (ККА) проводились с использованием гибридной системы (GE Discovery NM/CT 570C; GE Healthcare, США), оснащенной специальной кардиальной CZT гамма-камерой и 64-срезовым компьютерным томографом.

Динамическая ОФЭКТ. Подготовка пациентов, протокол исследования, запись и обработка статистических и динамических скинтиграфических данных изложены в предыдущих работах [9, 10]. Важно отметить, что за 24 ч до исследования пациентам отменяли прием бета-адреноблокаторов, нитратов, антагонистов кальциевых каналов, кофеина и производных метилксантина. Исследования выполняли в утренние часы, натощак, на фоне синусового ритма, по двухдневному протоколу «покой – нагрузка» с использованием радиофармпрепарата «99mTc-метокси-изобутил-изонитрил» (99mTc-МИБИ), который вводили внутривенно болюсно в дозировке 260–444 МБк [18]. Перед первым динамическим исследованием была проведена низкодозовая компьютерная томография (напряжение трубки 100 кВ, ток трубки 20 мА, время вращения 0,8 с, шаг спирали 0,969 : 1, толщина среза 5 мм) для оценки расположения сердца.

Фармакологический стресс-тест проводили по стандартному 4-минутному протоколу [18]. Для выполнения исследования в состоянии нагрузки использовали стресс-агент аденозинтрифосфат, который вводили внутривенно при помощи инфузомата в дозировке 160 мкг/кг/мин в течение 4 мин. Во время исследования после 2-минутного внутривенного введения аденозина вводили дозу 99mTc-Sestamibi ($3 \text{ МБк} \times \text{кг}^{-1}$) и начинали сбор динамических данных в режиме сканирования за 610 с непосредственно перед введением радиофармпрепарата. Инфузию аденозина продолжали еще в течение 2 мин.

Для коррекции аттенуации выполняли низкодозную компьютерную томографию органов грудной клетки. Все исследования были выполнены на гибридном компьютерном томографе Discovery NM/CT 570c (GE Healthcare, Milwaukee, WI, США), оснащенный гамма-камерой с высокочувствительными полупроводниковыми кадмий-цинк-теллуридными детекторами. Общая эффективная лучевая нагрузка исследования (покой и фармакологический стресс-тест) составила ~6,25 мЗв.

Полученные скинтиграфические изображения обрабатывали на специализированной рабочей станции Xeleris II (GE Healthcare, Naifa, Израиль). Оценку

миокардиальной перфузии, кровотока и резерва осуществляли с использованием специализированного программного обеспечения Corridor 4DM SPECT и 4DM Reserve v.2015 (INVIA, Ann Arbor, MI, США). Для обработки количественных характеристик применяли модель Net Retention с использованием коррекции аттенуации [19].

По данным ОФЭКТ миокарда определяли стандартные полуколичественные индексы нарушения миокардиальной перфузии: Summed Stress Score (SSS) – сумма баллов при нагрузке, Summed Rest Score (SRS) – сумма баллов в покое, Summed Difference Score (SDS) – разница между нагрузкой и покоем, а также количественные показатели: Stress Myocardial Blood Flow (stress-MBF) – миокардиальный кровоток при нагрузке, Rest Myocardial Blood Flow (rest-MBF) – миокардиальный кровоток в покое, Coronary Flow Reserve (CFR) – резерв коронарного кровотока.

Компьютерная коронарная ангиография. Подготовка к ККА проводилась по стандартному протоколу и включала прием бета-адреноблокаторов и преднизолона, отказ от напитков и пищи с кофеином, исключался прием глюкофажа (метформин), виагры, обезболивающих и других препаратов (адвил или мотрин). Кроме того, пациенты были проинструктированы о противопоказаниях процедуры, связанными с аллергическими реакциями, беременностью и заболеванием почек. Перед каждым сканированием оценивали частоту сердечных сокращений и артериальное давление. Все пациенты получали 0,5 мг нитроглицерина сублингвально.

Для сканирования с контрастным усилением 70–90 мл неионогенного контрастного вещества (йопамидол 370 мг, Bracco Diagnostics, Италия) вводили внутривенно через кубитальный катетер 18G со скоростью 5–5,5 мл/с с последующим введением 60 мл 0,9% NaCl.

У пациентов с частотой сердечных сокращений 55 ударов в минуту и более использовалось спиральное сканирование с протоколом ретроспективной регистрации электрокардиограммы (ЭКГ), а у пациентов с частотой сердечных сокращений менее 55 – проспективный протокол регистрации ЭКГ. Параметры регистрации были следующими: напряжение трубки 120 кВ, ток трубки 300–600 мА с использованием модуляции ЭКГ с максимальным током трубки между фазами 40–80% и минимальным током трубки в остальных фазах.

Для анализа набора данных использовались осевые изображения, криволинейные многоплоскостные и поперечные преобразования, а также проекции максимальной интенсивности тонких плит. Все исследования анализировались на гибридном компью-

терном томографе (Advantage Workstation 4.6, GE Healthcare, США).

В случае ретроспективных сканов ККТА изображения были реконструированы на 75% сердечного цикла с толщиной среза 0,625 мм. В случаях артефактов сердечного ритма использовали другие окна реконструкции (10–90% цикла R-R). Согласно модифицированной классификации Ассоциации кардиологов, коронарные артерии подразделяются на 16 сегментов [20, 21].

Забор крови и биохимический анализ. Образцы были получены путем венопункции, адекватные образцы центрифугировались, отделялась сыворотка, которая хранилась при температуре -24°C с одним циклом замораживания-оттаивания. Сывороточные уровни sST2, NT-proBNP, FGF-23, MMP-9, TIMP-1 анализировали из того же образца крови с помощью иммуноферментного анализа (NT-proBNP, FGF-23 и TIMP-1, Biomedica, Австрия; Presage® Анализ ST2, Critical Diagnostics, Сан-Диего, Калифорния, США; MMP-9; eBioscience, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 10.0 пакета R, версия 2. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха Me (Q_{25} ; Q_{75}). Для проверки статистических гипотез при анализе количественных показателей использовали критерий Манна – Уитни при сравнении двух независимых групп. При ана-

лизе качественных признаков проводили анализ таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 Пирсона. Если имелись ячейки с ожидаемой частотой меньше 5, то применяли двусторонний точный критерий Фишера или поправку Йетса (для таблиц 2×2). Для поиска взаимосвязей между переменными применяли корреляционный анализ с расчетом коэффициентов корреляции Спирмена. ROC-анализ использовали для определения значений cut off для диагностики КМД. Критический уровень значимости p -value для всех используемых процедур статистического анализа принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сниженный CFR определяли как $\text{CFR} \leq 2$. Таким образом, КМД диагностировали на основании сниженного CFR при отсутствии окклюзирующего поражения КА. Распределение пациентов проводилось по значениям CFR: группа 1 включала больных с сохраненным CFR (>2 , $n = 35$), группа 2 – со сниженным CFR ($\text{CFR} \leq 2$, $n = 24$). СНсФВ диагностировали в соответствии с рекомендациями ESC (2021) по диагностике и лечению острой и хронической СН [22]. Исходные демографические и клинические характеристики пациентов не различались (табл. 1). Однако в 87,5% случаев у больных с КМД была диагностирована СНсФВ, тогда как у больных без КМД – только в 51,4% ($p < 0,0001$). Эхокардиографические параметры значимо не различались между группами (табл. 2).

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика пациентов, Me (Q_{25} ; Q_{75})			
Показатель	Пациенты с КМД, $n = 24$	Пациенты без КМД, $n = 35$	p
Возраст, годы	60 (52; 66)	62 (59; 67,5)	0,451
Пол/мужчины, n (%)	14 (58,3)	23 (65,7)	0,767
ИМТ, $\text{кг}/\text{м}^2$	29,55 (27,1; 30,7)	31,2 (28,0; 33,41)	0,180
Гипертоническая болезнь, n (%)	20 (83,3)	32 (91,4)	0,812
Сахарный диабет, n (%)	6 (25,0)	10 (28,6)	0,761
ХОБЛ, n (%)	3 (12,5)	5 (14,3)	0,824
Курение, n (%)	6 (25,0)	9 (25,8)	0,998
ХСН, n (%)	21 (87,5)	18 (51,5)	$<0,0001$
СКФ, $\text{мл}/\text{мин}/1,73 \text{ м}^2$	73,5 (59; 81)	69 (65; 79)	0,775
Общий холестерин, $\text{ммоль}/\text{л}$	4,15 (3,2; 5,98)	4,4 (3,6; 5,4)	0,874
ЛПНП, $\text{ммоль}/\text{л}$	1,79 (1,3; 3,34)	2,6 (1,8; 3,42)	0,606
ЛПВП, $\text{ммоль}/\text{л}$	1,36 (1,29; 1,78)	1,23 (1,06; 1,3)	0,239
Триглицериды, $\text{ммоль}/\text{л}$	1,5 (1,14; 2,23)	1,6 (1,25; 2,2)	0,815
Гемоглобин, $\text{г}/\text{дл}$	152 (144; 159)	143 (137; 153,5)	0,121
Калий, $\text{ммоль}/\text{л}$	4,3 (4,0; 5,2)	4,2 (3,9; 5,1)	0,981
HbA1c, %	5,8 (5,5; 7,6)	5,6 (5,3; 7,5)	0,091
СРБ, $\text{г}/\text{л}$	4,1 (3,6; 4,7)	5,2 (2,7; 10,1)	0,998
Фибриноген, $\text{г}/\text{л}$	3,3 (2,9; 3,4)	3,2 (2,7; 3,4)	0,934
Растворимый ST2, $\text{нг}/\text{мл}$	31,03 (27,03; 35,5)	25,0 (21,45; 31,15)	$<0,001$
NT-proBNP, $\text{пг}/\text{мл}$	318,0 (169,7; 2106,2)	196,8 (68,1; 510,4)	0,045
ММР-9, $\text{нг}/\text{мл}$	1538 (945,4; 1982)	1183 (720,9; 1725)	0,023
TIMP-1, $\text{нг}/\text{мл}$	230,2 (107,38; 285,8)	160,78 (58,66; 213,2)	0,012
FGF-23, $\text{нг}/\text{мл}$	0,683 (0,383; 0,999)	0,649 (0,5; 0,965)	0,565

Примечание. HbA1c – гликированный гемоглобин; FGF-23 – фактор роста фибробластов-23; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; СРБ – С-реактивный белок; СКФ – скорость клубочковой фильтрации (СКД-ЕП); TIMP-1 – тканевой ингибитор металлопротеиназы-1; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь.

Таблица 2

Эхокардиографические параметры, Me (Q_{25} ; Q_{75})			
Показатель	Пациенты с КМД, n = 24	Пациенты без КМД, n = 35	p-value
Фракция выброса левого желудочка, %	65 (63; 66)	65 (64; 67)	0,531
Конечный диастолический размер, мм	32 (30; 33)	32 (31; 33)	0,886
Конечный систолический размер, мм	50,5 (48; 51)	50,5 (49; 51)	0,752
ИММ ЛЖ, г/м ²	91 (88; 95)	84 (79; 90)	0,159
Межжелудочковая перегородка, мм	10,2 (10; 11)	10,5 (10,5; 11)	0,371
Задняя стенка левого желудочка, мм	10 (10; 11)	10 (9,5; 10)	0,154
Е/А отношение	0,98 (0,73; 1,38)	1,02 (0,86; 1,29)	0,829
Septal e'	5,89 (4,8; 6,45)	5,66 (5,35; 6,25)	0,949
СТР, м/с	2,89 (2,8; 3,11)	2,91 (2,87; 2,99)	0,852
Е/е'	14,75 (13,5; 15,1)	14 (13,3; 14)	0,181
ЛПОИ	33 (29; 37)	32 (29; 33)	0,284
ДД 1-й тип, n (%)	19 (79,2)	26 (74,3)	0,761
ДД 2-й тип, n (%)	5 (20,8)	25,7	0,817

Примечание. ДД – диастолическая дисфункция; ЛПОИ – индексированный объем левого предсердия; ИММ ЛЖ – индекс массы миокарда ЛЖ; СТР – пиковая скорость трикуспидальной регургитации.

У больных с КМД значения CFR были ниже на 47,8% ($p < 0,0001$), чем у больных без КМД (1,41 [1,23; 1,55] против 2,6 [2,49; 3,38], соответственно). В группе 1 rest-MBF составлял 0,74 (0,56; 0,93) мл/мин/г, а группе 2 – 0,48 (0,37; 0,67) мл/мин/г ($p = 0,045$), при этом в группе 1 stress-MBF был 1,06 (0,91; 1,24) мл/мин/г, а группе 2 – 1,59 (1,19;

1,74) мл/мин/г ($p = 0,012$). Остальные показатели статистически значимо не различались (табл. 3).

Значения CFR коррелировали с объемом левого предсердия ($r = -0,527$; $p = 0,001$), отношением Е/А ($r = -0,321$, $p = 0,012$) и Е/е' ($r = -0,307$; $p = 0,021$), а также с уровнем NT-proBNP ($r = -0,290$; $p = 0,04$) и sST2 ($r = -0,330$; $p = 0,012$).

Таблица 3

Параметры динамической ОФЭКТ и стандартные полуколичественные индексы нарушения миокардиальной перфузии, Me (Q_{25} ; Q_{75})			
Показатель	Пациенты с КМД, n = 24	Пациенты без КМД, n = 35	p-value
<i>Параметры динамической ОФЭКТ</i>			
Stress-MBF, мл/мин/г	1,06 (0,91; 1,24)	1,59 (1,19; 1,74)	0,012
Rest-MBF, мл/мин/г	0,74 (0,56; 0,93)	0,48 (0,37; 0,67)	0,045
CFR	1,41 (1,23; 1,55)	2,6 (2,49; 3,38)	<0,0001
<i>Стандартные полуколичественные индексы нарушения миокардиальной перфузии</i>			
SSS	2,0 (1,0; 4,0)	2,0 (0; 4,0)	0,566
SRS	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0,926
SDS	0,5 (0; 3,0)	2 (0; 3,0)	0,364
<i>Стандартные полуколичественные индексы нарушения миокардиальной функции</i>			
Stress-KCO, мл	37,0 (30,0; 46,0)	33,5 (25,5; 40,0)	0,158
Stress-KДО, мл	115,5 (97,0; 123,0)	106,5 (99,0; 122,5)	0,404
Stress-ФВ, %	68,0 (61,0; 74,0)	70,0 (66,0; 73,5)	0,244
Rest-KCO, мл	32,0 (28,0; 41,0)	32,5 (24,5; 36,0)	0,364
Rest-KДО, мл	108,5 (100; 117)	102,5 (89,5; 121,5)	0,250
Rest-ФВ, %	70,5 (62,0; 72,0)	69,5 (65,5; 72,5)	0,698

Примечание. CFR – резерв коронарного кровотока; stress-MBF – миокардиальный кровоток при нагрузке; rest-MBF – миокардиальный кровоток в покое; SSS – сумма баллов при нагрузке; SRS – сумма баллов в покое; SDS – разница между нагрузкой и покоем; KCO – конечный систолический объем; KДО – конечный диастолический объем; ФВ – фракция выброса.

Уровень NT-proBNP был выше в группе 1 на 36,4% ($p = 0,045$), чем в группе 2 (318,0 [169,7; 2106,2] и 196,8 [68,1; 510,4] пг/мл соответственно). Уровень sST2 был выше у больных со сниженным CFR на 19,4% ($p > 0,001$), чем у больных с сохраненным CFR (31,03 [27,03; 35,5] и 25,0 [21,45;

31,15] нг/мл соответственно). Уровень ММПИ-9 в сыворотке крови в группе 1 составил 1538 (945,4; 1982) пг/мл, в группе 2 – 1183 (720,9; 1725) нг/мл ($p = 0,023$). Уровень ТИМПИ-1 был выше на 30,1% ($p = 0,012$) в группе 1, чем в группе 2 (230,2 [107,38; 285,8] и 160,78 [58,66; 213,2] нг/мл соответственно).

Концентрация FGF-23 в сыворотке не различалась между группами.

По данным ROC-анализа, показатели $sST2 \geq 31,304$ нг/мл (чувствительность 55,0%, специфичность 90,3%; $AUC = 0,730$; $p = 0,004$) (рис. 1) и NT-proBNP $\geq 977,2$ пг/мл (чувствительность 64,9%, специфичность 84,6%; $AUC = 0,815$; $p = 0,034$) были определены как пороговые значения для диагностики КМД у пациентов с необструктивным поражением КА (рис. 2). При сравнении ROC-кривых $sST2$ и NT-proBNP в диагностике КМД достоверных различий ($p = 0,761$) не выявлено (рис. 3).

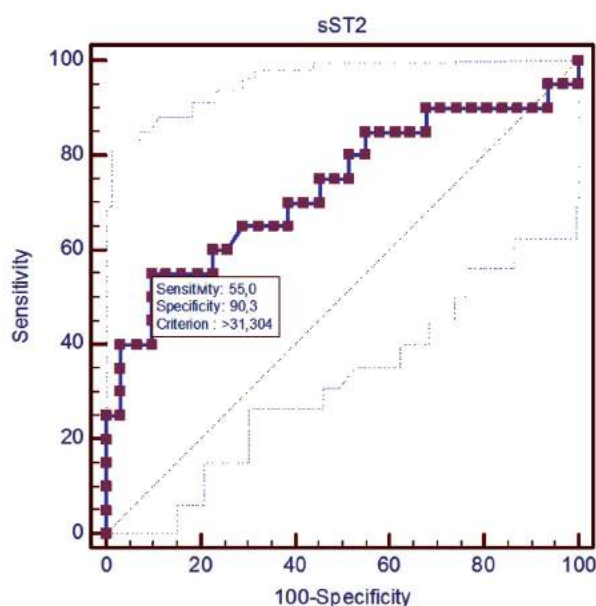


Рис. 1. Чувствительность и специфичность уровня растворимого ST2 в диагностике КМД (ROC-анализ)

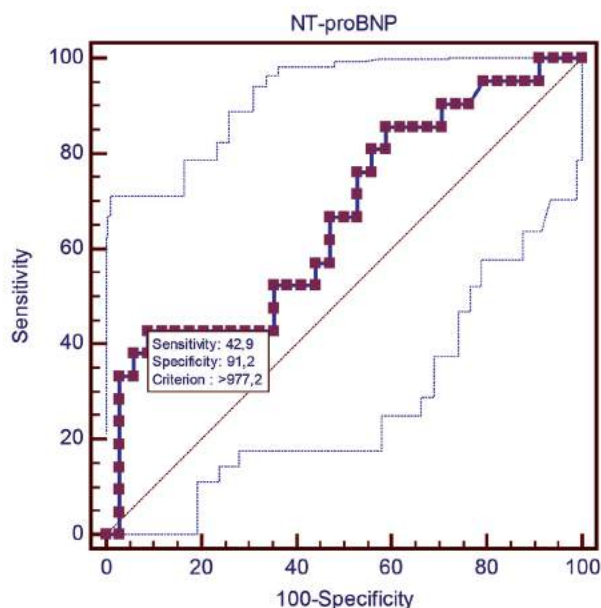


Рис. 2. Чувствительность и специфичность уровня NT-proBNP в диагностике КМД (ROC-анализ)

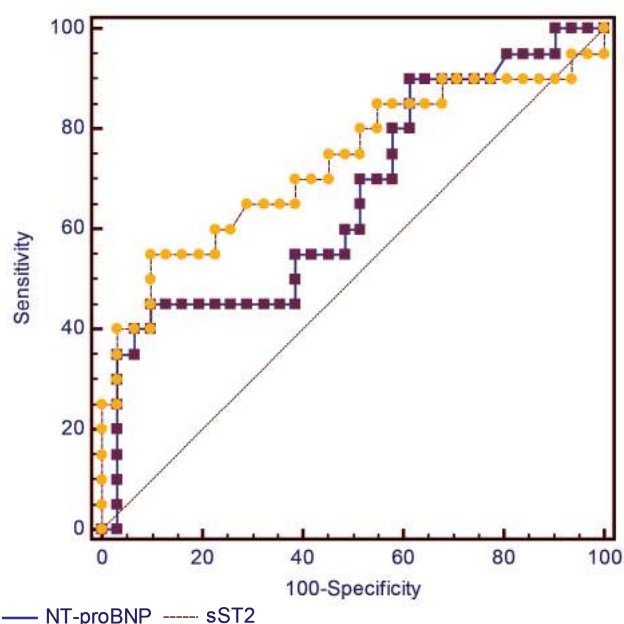


Рис. 3. Сравнение чувствительности и специфичности уровня NT-proBNP и растворимого ST2 в диагностике КМД (ROC-анализ)

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании было показано, что у пациентов с необструктивным поражением КА и КМД частота СНсФВ была выше, чем у пациентов без КМД. Значения CFR коррелировали с параметрами ДД, концентрациями NT-proBNP и $sST2$. Показатели $sST2 \geq 31,304$ нг/мл и NT-proBNP $\geq 977,2$ пг/мл были идентифицированы как пороговые значения для диагностики КМД у пациентов с необструктивным поражением КА.

СНсФВ является одной из самых больших проблем современной кардиологии. В США примерно из 5 млн пациентов с СН 50% имеют сохраненную ФВЛЖ [22], а в Европе этот показатель варьирует от 22 до 73% [1]. Растет понимание того, что СНсФВ представляет собой гетерогенный синдром с различными фенотипами и сопутствующими заболеваниями [23]. Результаты ряда международных исследований с использованием инвазивных или неинвазивных методов диагностики подтверждают предположение о том, что КМД встречается значительно чаще, чем было установлено ранее, в том числе у пациентов с СНсФВ. V.L. Murthy и соавт. установили, что у 53% пациентов с необструктивной ишемической болезнью сердца (ИБС) и болевым синдромом были диагностированы признаки индуцируемой ишемии миокарда [11]. Согласно последним данным метаанализа 56 исследований с участием 14 427 пациентов, доля пациентов с КМД составила 41% в общей популяции [15]. Более того, при анализе распространенности КМД у пациентов с СНсФВ пропорция возрастала до 75–85%

[13, 14]. Поэтому недавно была предложена инновационная теория, в которой КМД выступает в качестве «общей почвы» для возникновения как микрососудистой стенокардии, так и СНсФВ [4, 14, 24]. Важно, что пациенты с необструктивной ИБС, несмотря на сохраненную ФВ ЛЖ, не менее часто подвержены госпитализации в связи с декомпенсацией СН [11].

КМД является типом необструктивной ИБС, при которой мелкие кровеносные сосуды, питающие сердечную мышцу, не справляются с нагрузкой [14]. Однако потенциальные механизмы развития КМД до сих пор не изучены и включают нарушения клеточного метаболизма, системное воспаление, образование активных форм кислорода, усиление коронарной вазоконстрикторной реактивности на микроциркуляторном уровне, нарушение эндотелийзависимой и независимой вазодилатирующей способности, гормональный и электролитный дисбаланс и т.д., что приводит к развитию фиброза и повышению жесткости миокарда и коронарного микрососудистого сопротивления [12, 14–16, 25]. Наиболее вероятно, что первые структурные аномалии КМД связаны с повреждением эндотелиальных митохондрий и включают их гиперплазию, уменьшение размера или фрагментацию органелл, а также структурные повреждения: потерю электронно-плотного матрикса и нарушение целостности внутренней и внешней мембран [16, 23, 24]. Сопутствующие заболевания (сахарный диабет, гипертония, ожирение и др.) не только активируют гиперэкспрессию супероксида с помощью митохондриальной электрон-транспортной цепи и НАДФН-оксидазы, которые частично способствуют нарушению функции эндотелиальных клеток, но и контролируют параллельные пути, вызывая развитие эндотелиальной дисфункции [22]. Следует отметить, что эндотелиальная дисфункция является одним из ключевых механизмов развития и прогрессирования КМД при СНсФВ [18].

Эндотелий играет ключевую роль в предотвращении агрегации тромбоцитов и адгезии лейкоцитов, регулировании пролиферации клеток и модулировании сосудистого тонуса путем синтеза и высвобождения эндотелиальных вазодилатирующих факторов, включая простагландины, оксид азота и факторы эндотелий-зависимой гиперполяризации (ЭЗГ) в различных формах в зависимости от размера сосуда. Оксид азота преимущественно опосредует вазодилатацию относительно крупных коронарных сосудов, в то время как факторы ЭЗГ влияют на резистентность микроциркуляторного русла. Таким образом, нарушения как в миоцитарном, так и немиеоцитарном компартментах могут приводить к развитию фиброза миокарда и ремоделированию

экстрацеллюлярного матрикса и увеличивать диастолическую жесткость, которая способствует прогрессированию СНсФВ [25, 26].

В условиях повышенной потребности в кислороде снижение CFR, даже при отсутствии обструктивной ИБС, отражает ишемию миокарда на микроциркуляторном уровне из-за нарушения соотношения потребности и доставки кислорода к миокарду, что может приводить к повреждению и ухудшению общей механики и дисфункции сердца [7]. Наши данные показывают, что КМД была независимо связана с параметрами диастолической дисфункции и наличием СНсФВ. Это свидетельствует о том, что факторы, склоняющие «чашу весов» в сторону ишемии кардиомиоцитов у пациентов с имеющейся КМД, могут ухудшать функцию ЛЖ и повышать риск развития СНсФВ даже при отсутствии явных структурных аномалий или обструктивной ИБС. Так, в исследовании с участием 385 пациентов с необструктивной ИБС КМД также была достоверно связана с эхокардиографическими параметрами диастолической дисфункции [27]. У пациентов с систолической дисфункцией (ФВ ЛЖ < 35%) и необструктивной ИБС параметры CFR коррелировали со значениями E/e' [28]. В частности, микрососудистая эндотелиальная дисфункция, снижение биодоступности оксида азота и повышенная передача сигналов профиброзных цитокинов могут способствовать снижению коронарной плотности или разрежению микрососудистого русла и усилению миокардиального фиброза, наблюдаемому при СНсФВ [7, 13, 14]. Корреляция CFR с биохимическими маркерами объемной перегрузки ЛЖ NT-proBNP ($r = -0,290$; $p = 0,04$) и фиброзом sST2 ($r = -0,331$; $p = 0,012$) демонстрирует тесную связь между этими процессами в патогенезе СНсФВ у больных без окклюзирующей ИБС.

В нашем исследовании в качестве пороговых значений для диагностики КМД у пациентов с необструктивной ИБС значимыми оказались только уровни sST2 и NT-proBNP, но не ММП-9 и TIMP-1. Возможно, в этой популяции с необструктивной ИБС уровни sST2 отражают периаартериолярный фиброз, который может возникать при микрососудистой эндотелиальной дисфункции [29]. В частности, КМД, связанная с хроническим системным воспалением, может способствовать развитию периаартериолярного фиброза и микроваскулярному разрежению, приводя к снижению CFR и гиперэкспрессии sST2, а также к развитию симптомов СН и(или) стенокардии при «нормальных» КА [30]. В исследовании на мышцах выявлено снижение передачи сигналов ST2 с прогрессированием микрососудистых изменений при перегрузке давлением, что было ассоциировано

с усилением и поддержанием ремоделирования артериол и периартериолярного фиброза миокарда [29]. Кроме того, G. Aslan и соавт. установили, что уровни sST2 в сыворотке были значительно выше у пациентов с микрососудистой стенокардией по сравнению с контрольной группой [31]. В дальнейшем хроническое системное воспаление вызывает адгезию и инфильтрацию моноцитов и стимуляцию интегрированных макрофагов, что способствует дифференцировке миофибробластов и, в конечном итоге, секреции коллагена. Это приводит к внеклеточному фиброзу и ремоделированию сердца [10, 11, 32]. Таким образом, коронарная микроваскулярная ишемия может играть важную роль в повышении давления наполнения ЛЖ, развитии диастолической дисфункции и патофизиологии СНсФВ [8]. В подтверждение этого факта было обнаружено, что у пациентов с КМД были более высокие уровни ММП-9 и ТИМП-1, чем у пациентов без нее. Но, скорее всего, этот процесс вторичен по отношению к КМД и является следствием прогрессирования непосредственно СНсФВ, а не КМД; следовательно, эти биомаркеры не показали значимости в диагностике КМД, в отличие от sST2 и NT-proBNP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что КМД может играть важную роль в патогенезе развития СНсФВ. Значения CFR коррелировали с параметрами ДД, а снижение CFR было связано с гиперэкспрессией сердечных биомаркеров фиброза и ремоделирования. Уровни sST2 и NT-proBNP могут использоваться в качестве маркеров неинвазивной диагностики КМД.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ponikowski P., Voors A.A., Anker S.D., Bueno H., Cleland J.G., Coats A.J. et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* 2016;18(8):891–975. DOI: 10.1002/ehf.592.
2. Groenewegen A., Rutten F.H., Mosterd A., Hoes A.W. Epidemiology of heart failure. 2020;22(8):1342–1356. DOI: 10.1002/ehf.1858.
3. McDonagh T.A., Metra M., Adamo M., Gardner R.S. et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* 2021;42(36): 3599–3726. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368.
4. Tona F., Montisci R., Iop L., Civieri G. Role of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2021;22(1):97–104. DOI: 10.31083/j.rcm.2021.01.277.
5. Vancheri F., Longo G., Vancheri S., Henein M. Coronary microvascular dysfunction. *J. Clin. Med.* 2020;9(9):2880. DOI: 10.3390/jcm9092880.
6. Crea F., Bairey Merz C.N., Beltrame J.F., Kaski J.C. et al. The parallel tales of microvascular angina and heart failure with preserved ejection fraction: a paradigm shift. *Eur. Heart J.* 2017;38(7):473–477. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw461.
7. Taqueti V.R., Solomon S.D., Shah A.M., Desai A.S. et al. Coronary microvascular dysfunction and future risk of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.* 2018;39(10):840–849. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx721.
8. Rahman H., Scannell C.M., Demir O.M., Ryan M. et al. High-resolution cardiac magnetic resonance imaging techniques for the identification of coronary microvascular dysfunction. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 2021 14(5):978–986. DOI: 10.1016/j.jcmg.2020.10.015.
9. Zavadovsky K.V., Mochula A.V., Boshchenko A.A. et al. Absolute myocardial blood flows derived by dynamic CZT scan vs invasive fractional flow reserve: Correlation and accuracy. *J. Nucl. Cardiol.* 2021;28(1):249–259. DOI: 10.1007/s12350-019-01678-z.
10. Zavadovsky K.V., Mochula A.V., Maltseva A.N., Boshchenko A.A. et al. The diagnostic value of SPECT CZT quantitative myocardial blood flow in high-risk patients. *J. Nucl. Cardiol.* 2022; 29(3):1051–1063. DOI: 10.1007/s12350-020-02395-8.
11. Murthy V.L., Naya M., Foster C.R., Hainer J. et al. Improved cardiac risk assessment with noninvasive measures of coronary flow reserve. *Circulation.* 2011;124(20):2215–2224. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.050427.
12. Agostini D., Roule V., Nganoa C. et al. First validation of myocardial flow reserve assessed by dynamic 99mTc-sestamibi CZT-SPECT camera: head to head comparison with 15O-water PET and fractional flow reserve in patients with suspected coronary artery disease. The WATERDAY study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2018;45(7):1079–1090. DOI: 10.1007/s00259-018-3958-7.
13. Paulus W.J., Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62(4):263–271. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.02.092.
14. Godo S., Suda A., Takahashi J., Yasuda S., Shimokawa H. Coronary microvascular dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2021;41(5):1625–1637. DOI: 10.1161/ATVBAHA.121.316025.
15. Mileva N., Nagumo S., Mizukami T., Sonck J. et al. Prevalence of Coronary Microvascular Disease and Coronary Vasospasm in Patients With Nonobstructive Coronary Artery Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Amer. Heart Ass.* 2022;11(7):e023207. DOI: 10.1161/JAHA.121.023207.
16. Zhou H., Toan S. Pathological roles of mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dynamics in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury. *Biomolecules.* 2020;10(1):85. DOI: 10.3390/biom10010085.

17. Nagueh S.F., Smiseth O.A., Appleton C.P. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*. 2016;17(12):1321–1360. DOI: 10.1093/ehjci/jew082.
18. Henzlova M.J., Duvall W.L., Einstein A.J., Travin M.I., Verberne H.J. ASNC imaging guidelines for SPECT nuclear cardiology procedures: Stress, protocols, and tracers. *J. Nucl. Cardiol.* 2016;23 (3):606–639. DOI: 10.1007/s12350-015-0387-x.
19. Leppo J.A., Meerdink D.J. Comparison of the myocardial uptake of a technetium-labeled isonitrite analogue and thallium. *Circ. Res.* 1989;65(3):632–639. DOI: 10.1161/01.res.65.3.632.
20. Cerqueira M.D., Weissman N.J., Dilsizian V., Jacobs A.K. et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: A statement for health-care professionals from the cardiac imaging. *Circulation*. 2002;105(4):539–542. DOI: 10.1161/hc0402.102975.
21. Austen W.G., Edwards J.E., Frye R.L., Gensini G.G. et al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the Ad Hoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease, Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association. *Circulation*. 1975;51(4):5–40. DOI: 10.1161/01.cir.51.4.5.
22. Clark K.A.A., Velazquez E.J. Heart failure with preserved ejection fraction: time for a Reset. *JAMA*. 2020;324(15):1506–1508. DOI: 10.1001/jama.2020.15566.
23. Triposkiadis F., Butler J., Abboud F.M., Armstrong P.W., Adamopoulos S., Atherton J.J. et al. The continuous heart failure spectrum: moving beyond an ejection fraction classification. *Eur. Heart J.* 2019;40(26):2155–2163. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz158.
24. Graziani F., Varone F., Crea F., Richeldi L. Treating heart failure with preserved ejection fraction: learning from pulmonary fibrosis. *Eur. J. Heart Fail.* 2018;20(10):1385–1391. DOI: 10.1002/ehf.1286.
25. Zile M.R., Baicu C.F., Ikonomidis J.S., Stroud R.E., Nietert P.J. et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*. 2015;131(14):1247–1259. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215.
26. Rahman H., Ryan M., Lumley M., Modi B. et al. Coronary microvascular dysfunction is associated with myocardial ischemia and abnormal coronary perfusion during exercise. *Circulation*. 2019;140:1805–1816. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041595.
27. Kim I.C., Hwang J., Lee C.H., Cho Y.K. et al. Correlation of coronary microvascular function and diastolic dysfunction. *Eur. Heart J.* 2020;41(2):ehaa946.0903. DOI: 10.1093/ehjci/ehaa946.0903.
28. Snoer M., Monk-Hansen T., Olsen R.H., Pedersen L.R., Nielsen O.W. et al. Coronary flow reserve as a link between diastolic and systolic function and exercise capacity in heart failure. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*. 2013;14(7):677–683. DOI: 10.1093/ehjci/jes269.
29. Garbern J.C., Williams J., Kristl A.C., Malick A., Rachmin I. et al. Dysregulation of IL-33/ST2 signaling and myocardial periarteriol fibrosis. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2019;128:179–186. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.01.018.
30. Lewis G.A., Schelbert E.B., Williams S.G., Cunningham C., Ahmed F., McDonagh T.A. et al. Biological phenotypes of heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017;70(17):2186–2200. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.09.006.
31. Aslan G., Polat V., Bozcali E., Opan S., Çetin N., Ural D. Evaluation of serum sST2 and sCD40L values in patients with microvascular angina. *Microvasc. Res.* 2019;122:85–93. DOI: 10.1016/j.mvr.2018.11.009.
32. Гракова Е.В., Копьева К.В., Тепляков А.Т., Огуркова О.Н., Солдатенко М.В., Гарганеева А.А. Возможности клинического применения нового биомаркера ST2 у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемического генеза: тест с физической нагрузкой. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2019;18(4):12–18. DOI: 10.15829/1728-8800-2019-4-12-18.

Информация об авторах

Копьева Кристина Васильевна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, отделение патологии миокарда, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, Kristin-kop@inbox.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2285-6438>

Мальцева Алина Николаевна – аспирант, лаборатория радионуклидных методов исследования, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, maltseva.alina.93@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-1311-0378>

Мочула Андрей Викторович – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория радионуклидных методов исследования, НИИ кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0003-0883-466X>

Гракова Елена Викторовна – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение патологии миокарда, НИИ кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0003-4019-3735>

Шипулин Владимир Владимирович – канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория радионуклидных методов исследования, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0001-9887-8214>

Гусакова Анна Михайловна – канд. биол. наук, науч. сотрудник клинической лабораторной диагностики, НИИ кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0003-0883-466X>

Завадовский Константин Валерьевич – д-р мед. наук, зав. лабораторией радионуклидных методов исследования, НИИ кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, <http://orcid.org/0000-0002-1513-8614>

(✉) **Копьева Кристина Васильевна**, Kristin-kop@inbox.ru

Поступила в редакцию 17.03.2022;
одобрена после рецензирования 30.06.2022;
принята к публикации 08.09.2022

УДК 613.2.038-02:617.735]-092.4:599.233.4
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-98-104>

Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на сетчатку молодых и старых крыс

Логвинов С.В.¹, Мустафина Л.Р.¹, Курбатов Б.К.², Нарыжная Н.В.², Варакута Е.Ю.¹,
Потапов А.В.¹

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

² Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

РЕЗЮМЕ

Цель: изучить в эксперименте влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на сетчатку в молодом и старческом возрасте.

Материалы и методы. Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар в возрасте 60 и 450 сут в начале эксперимента. Животных распределяли на четыре группы: 1-я ($n = 14$) – интактные крысы в возрасте 150 сут на момент окончания исследования; 2-я ($n = 14$) – 150-суточные крысы на момент окончания 90 сут высокоуглеводной высокожировой диеты (ВУВЖД); 3-я ($n = 14$) – интактные крысы 540-суточного возраста на момент окончания исследования; 4-я ($n = 14$) – 540-суточные крысы после окончания 90 сут ВУВЖД. В работе использовали иммуноферментный и гистологический методы исследования.

Результаты. ВУВЖД приводила к повышению концентрации глюкозы у животных обеих возрастных групп, а у старых животных вызывала выраженное увеличение содержания инсулина, TGF β и фибронектина в сыворотке крови, неоваскуляризацию наружных слоев сетчатки, кариопикноз и массовую гибель нейросенсорных клеток, влекущую за собой разрушение слоя палочек и колбочек, резкое истончение наружного ядерного и наружного сетчатого слоев. У молодых крыс, содержащихся на ВУВЖД, не было отмечено выраженных гистологических нарушений сетчатки.

Заключение. ВУВЖД усиливает возрастные изменения сетчатки у старых (450-суточных) крыс.

Ключевые слова: ретинопатия, возрастные изменения сетчатки, высокоуглеводная высокожировая диета

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 201 от 30.07.2020).

Для цитирования: Логвинов С.В., Мустафина Л.Р., Курбатов Б.К., Нарыжная Н.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В. Влияние высокоуглеводной высокожировой диеты на сетчатку молодых и старых крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):98–104. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-98-104>.

Effects of a high-fat, high-carbohydrate diet on the retina of young and old rats

Logvinov S.V.¹, Mustafina L.R.¹, Kurbatov B.K.², Naryzhnaya N.V.², Varakuta E.Yu.¹, Potapov A.V.¹

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

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences
111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the effect of a high-fat, high-carbohydrate diet on retinal morphology of young and old rats in the experiment.

Materials and methods. The study was carried out on male Wistar rats aged 60 and 450 days at the beginning of the experiment. The animals were divided into 4 groups: group 1 ($n = 14$) included intact rats aged 150 days at the end of the experiment; group 2 ($n = 14$) encompassed rats (60 days old) fed with a high-fat, high-carbohydrate diet (HFHCD) for 90 days; group 3 ($n = 14$) included intact rats (450 days old) receiving a standard diet for 90 days; group 4 ($n = 14$) included rats (450 days old) fed with HFHCD for 90 days. Immunoassay and histology were used in the work.

Results. HFHCD resulted in an increase in glucose concentration in animals of both age groups. In old animals, it caused a pronounced increase in the content of insulin, TGF β , and fibronectin in the blood serum, neovascularization of outer retinal layers, as well as karyopyknosis and death of neurosensory cells, leading to destruction of photoreceptors and drastic thinning of the outer nuclear and outer plexiform layers. In young rats fed with HFHCD, no pronounced histologic disorders of the retina were noted.

Conclusion. HFHCD enhances age-related retinal changes in old (450-day-old) rats.

Keywords: retinopathy, age-related changes in the retina, high-fat, high-carbohydrate diet

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Cardiology Research Institute of Tomsk NRMC (Protocol No. 201 of 30.07.2020).

For citation: Logvinov S.V., Mustafina L.R., Kurbatov B.K., Naryzhnaya N.V., Varakuta E.Yu., Potapov A.V. Effects of a high-fat, high-carbohydrate diet on the retina of young and old rats. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):98–104. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-98-104>.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастные изменения сетчатки, в частности дегенерация желтого пятна, вызывают потерю зрения у миллионов людей во всем мире. В то же время чрезмерное потребление калорийной пищи, особенно в развитых странах, приводит к диабетической ретинопатии, которая является основной причиной слепоты у взрослых людей трудоспособного возраста [1, 2]. Механизмы развития старческой и диабетической

ретинопатии имеют некоторые общие черты [3]. Многочисленные исследования посвящены старению сетчатки [4–6], так же как и патологии сетчатки при метаболическом синдроме, диабете 2-го типа [7–9], в том числе на моделях с использованием жировых и углеводных диет [3, 10, 11]. Однако влияние высококалорийных диет на развитие возрастных нарушений сетчатки, структурные основы ретинопатии, вызванной высокоуглеводной высокожировой диетой (ВУВЖД) в различных возрастных группах,

еще далеки от исчерпывающего понимания. Знания о взаимодействии этих патогенетических факторов – старения и ВУВЖД – крайне необходимы для разработки профилактики и лечения возрастных и диабетических ретинопатий.

Целью нашей работы было экспериментальное изучение влияния ВУВЖД на сетчатку в молодом и старческом возрасте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на самцах крыс линии Вистар в возрасте 60 и 450 сут. Все процедуры соответствовали Директиве Европейского парламента 2010/63/EU и заявлению FASEB о принципах использования животных в исследованиях и образовании. Экспериментальные группы формировали следующим образом: 1-я ($n = 14$) – интактные 150-суточные крысы, содержащиеся на стандартном рационе в течение 90 сут (с 60-суточного возраста); 2-я ($n = 14$) – 150-суточные крысы, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 60-суточного возраста); 3-я ($n = 14$) – интактные 540-суточные крысы, содержащиеся на стандартном рационе в течение 90 сут (с 450-суточного возраста); 4-я ($n = 14$) – 540-суточные крысы, содержащиеся на ВУВЖД в течение 90 сут (с 450-суточного возраста).

ВУВЖД включала 16% белков, 21% жиров, 46% углеводов, в том числе 17% фруктозы, 0,125% холестерина. Вода была заменена 20%-м раствором фруктозы. Крысам 1-й и 3-й групп (интактным животным) давали стандартный корм для грызунов (белки 24%, жиры 6%, углеводы 44%) и чистую воду *ad libitum*. Из эксперимента животных выводили путем декапитации с предварительной анестезией хлоралозой (100 мг/кг внутривенно).

Перед декапитацией забирали образцы крови, которые центрифугировали (15 мин 3 000 об/мин), образцы сыворотки хранили в морозильной камере при -70°C . Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли ферментативным колориметрическим методом с помощью наборов В-8054 (компания «Вектор-Бест», Россия). Иммуноферментным методом в сыворотке крови определяли концентрацию инсулина (ab100578, Abcam), фибронектина (ab108850, Abcam), трансформирующего фактора роста бета (tissue growth factor beta, TGF β) (ab119558, Abcam). Образцы измеряли с помощью микропланшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan GmbH, Австрия). Гомеостатическую модель оценки инсулинорезистентности (НОМА-IR) рассчитывали как соотношение $\text{инсулин} \cdot \text{глюкоза} / 22,5$. Для гистологического исследования глазные яблоки фикси-

ровали в 10%-м растворе забуференного формалина (ООО «БиоВитрум», Россия) и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы задней стенки глаз окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «БиоВитрум», Россия).

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на световом микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 400 и 1000 раз. В 10 случайных полях зрения срезов каждой сетчатки подсчитывали пикноморфные ядра (%) в наружном ядерном слое (НЯС), внутреннем ядерном слое (ВЯС) и ганглиозном слое, в НЯС и ВЯС высчитывали количество рядов ядер.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13.0 (StatSoft Inc., США). Полученные данные прошли проверку на согласие распределения с нормальным законом с помощью критерия Шапиро – Уилка. Данные, соответствовавшие нормальному распределению, представляли в виде среднего и стандартной ошибки $M \pm SEM$; при распределении, отличающемся от нормального, – в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$. Проверку на гомогенность дисперсий проводили с использованием критерия Левене. При сравнении нескольких независимых выборок количественных данных использовали two-way ANOVA с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони для нормально распределенных признаков. Непараметрический критерий Краскела – Уоллиса был применен для сравнения выборок, распределение которых отличалось от нормального. Пороговое значение достигнутого уровня значимости p было принято равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание на ВУВЖД приводило к повышению концентрации глюкозы в сыворотке крови у крыс обеих возрастных групп (табл. 1), а также интегрального индекса инсулинорезистентности НОМА-IR. Однако лишь у старых животных ВУВЖД оказала влияние на содержание инсулина, что привело к более выраженному увеличению НОМА-IR, чем у молодых крыс (см. табл. 1). Назначение ВУВЖД способствовало повышению уровня TGF β и фибронектина у животных в группе 4.

Гистологическое исследование показало, что сетчатки крыс групп 1 и 2 имели нормальную архитектуру слоев (рис. 1, а), однако в НЯС было выявлено небольшое количество пикноморфных ядер, характеризующихся диффузным гиперхромным прокрашиванием и сморщиванием (см. рис. 1, б).

Таблица 1

Концентрация глюкозы и инсулина в сыворотке крови крыс различного возраста при содержании на ВУВЖД, $M \pm SEM$				
Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Глюкоза, мМ/л	$5,4 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,2^1$	$6,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,2^{1,3}$
Инсулин, пМ/л	$12,2 \pm 0,8$	$18,35 \pm 2,57$	$19,99 \pm 2,3$	$34,7 \pm 8,6^1$
Индекс инсулинорезистентности HOMA-IR	$2,94 \pm 0,28$	$5,97 \pm 0,85^1$	$5,36 \pm 0,61^1$	$12,05 \pm 3,29^{1,2,3}$
Фибронектин, мг/дл	$21,23 \pm 1,55$	$27,58 \pm 1,78$	$29,89 \pm 2,38$	$43,00 \pm 3,12^{1,2,3}$
Трансформирующий фактор роста β , нг/мл	$14,0 \pm 3,0$	$19,1 \pm 2,6$	$35,3 \pm 5,2^1$	$31,9 \pm 4,1^1$

Примечание. Значимость различий по сравнению с: ¹ 1-й группой; ² 2-й группой; ³ 3-й группой; ⁴ 4-й группой; two-way ANOVA, с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони.

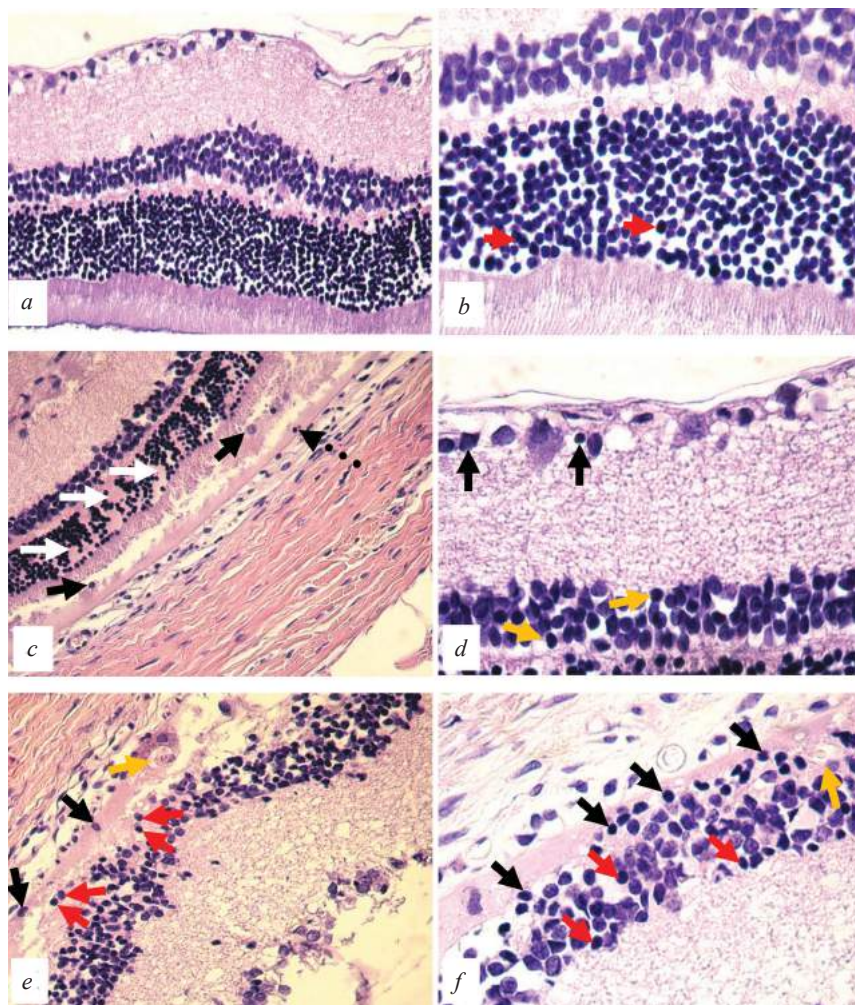


Рисунок. Гистологические изменения сетчатки крыс, связанные с возрастом и ВУВЖД: *a* – обычная архитектура слоев сетчатки, группа 2; *b* – единичные пикноморфные ядра палочек и колбочек (указаны стрелками) в НЯС, группа 2; *c* – разрежение ядер в НЯС и замещение их отростками радиальной глии (белые стрелки), наличие ядер в субретинальном пространстве (черные стрелки), пикноморфное ядро в пигментном слое (пунктирная стрелка), группа 3; *d* – пикноморфные клетки в ВЯС (желтые стрелки) и ганглиозном слое (черные стрелки), группа 3; *e* – кровеносный сосуд в пигментном эпителии (желтая стрелка), пикноз ядер пигментцитов (черные стрелки), единичные пикноморфные ядра на месте НЯС (черные стрелки) и в ганглиозном слое (красные стрелки), группа 4; *f* – ядра палочковых и колбочковых нейронов (черные стрелки), располагающиеся в один неполный ряд, вплотную к пигментному слою, кровеносный капилляр в субретинальном пространстве (желтая стрелка), пикноморфные клетки в ВЯС (красные стрелки), группа 4. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$ (*a*, *c*, *e*); $\times 1\,000$ (*b*, *d*, *f*)

В сетчатках крыс группы 3 ядра в НЯС были разрежены, в местах с отсутствием ядер – замещены отростками радиальных глиоцитов. Некоторые из наружных и внутренних сегментов палочек и колбочек были фрагментированы. В субретинальном пространстве обнаруживались фрагменты наружных отростков палочковых и колбочковых нейронов, а также мелкие пикноморфные ядра, возможно, сместившиеся сюда из НЯС. Единичные более крупные ядра в субретинальном пространстве принадлежали

макрофагам. В пигментном слое выявлялся карипикноз (см. рис. 1, *c*).

Пикноморфные клетки были обнаружены не только в НЯС, но и во ВЯС и слое ганглиозных клеток (см. рис. 1, *d*). Наиболее выраженными были изменения сетчаток крыс группы 4. Так, НЯС был почти полностью разрушен и содержал немногочисленные ядра, располагавшиеся в один неполный ряд. Большинство из этих ядер были пикноморфны и на некоторых участках вплотную приближены к пиг-

ментному слою, поскольку слой палочек и колбочек отсутствовал по причине его полного разрушения. Пигментный слой был неравномерно изменен, часто имел пикнотичные ядра, на некоторых участках был сильно истончен и подвержен деструкции. Среди пигментцитов обнаруживались гемокапилляры, содержавшие клетки крови в просвете, также гемокапилляры выявлялись в НЯС, что свидетельствует о процессах неоваскулогенеза. В тех участках, где пигментный слой и слой палочек и колбочек были разрушены, ядра палочковых и колбочковых нейронов прилегали непосредственно к мембране Бруха. В этих местах хориокапилляры были немногочисленны и сужены. ВЯС и ганглиозный слой содержали пикноморфные клетки (см. рис. 1, *e, f*). Количественная оценка не выявила значимых различий между группами 1 и 2 у 150-суточных животных, однако содержание пикноморфных ядер НЯС в группе 2 имеет отчетливую тенденцию к увеличению по сравнению с таковым в группе 1 (см. табл. 1).

У крыс 3-й группы значимо возросло количество пикноморфных клеток в НЯС, ВЯС и ганглиозном слое по сравнению с аналогичными показателями в группах 1 и 2, причем наиболее выраженным было увеличение доли пикноморфных ядер палочковых и колбочковых нейронов. Значимым было уменьшение количества рядов ядер НЯС в группе 3 по сравнению с группами 1 и 2. Количество рядов ядер в ВЯС не различалось во всех четырех группах животных. В группе 4 количественные изменения были сходны по направленности с таковыми в группе 3, но существенно более выражены. Обращало на себя внимание резкое уменьшение количества слоев ядер в НЯС, а также рост доли пикноморфных ядер среди оставшихся, что свидетельствует о массовой гибели палочек и колбочек. Количество пикноморфных клеток в ВЯС и ганглиозном слое значимо возросло в группе 4 по сравнению с показателями в группе 3, но в существенно меньшей степени, чем доля пикноморфных ядер в НЯС.

Таблица 2

Количественные гистологические изменения сетчатки белых крыс, связанные с возрастом и использованием ВУВЖД, $Me (Q_1; Q_3)$				
Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Пикноморфные ядра НЯС, %	0,25 (0,20; 0,40)	0,80 (0,70; 0,90)	15,05 ¹ (13,65; 16,65)	88,30 ^{1,2} (72,80; 92,40)
Количество рядов ядер НЯС	10,65 (9,70; 11,90)	10,20 (9,30; 10,40)	5,90 ¹ (4,85; 7,85)	1,40 ^{1,2} (1,10; 4,90)
Пикноморфные ядра ВЯС, %	0,15 (0,10; 0,20)	0,10 (0,10; 0,20)	1,95 (1,65; 2,80)	8,10 ^{1,2} (7,00; 9,30)
Количество рядов ядер ВЯС	4,65 (4,20; 4,90)	4,70 (4,60; 5,40)	4,20 (4,05; 4,90)	4,30 (3,70; 5,20)
Пикноморфные ганглиозные нейроны	0,50 (0,25; 0,50)	0,75 (0,25; 1,00)	3,00 ¹ (1,50; 4,00)	9,50 ^{1,2} (9,00; 11,50)

Примечание. Значимость различий по сравнению с: ¹ 1-й группой; ² 2-й группой; ³ 3-й группой; ⁴ 4-й группой; критерий Краскела – Уоллиса.

ОБСУЖДЕНИЕ

Важнейшую роль в тканевых механизмах ретинопатии у старых крыс на ВУВЖД, на наш взгляд, играли выявленные процессы неоваскулогенеза. Как было показано, кровеносные сосуды с клетками крови в просвете появлялись в необычных местах – среди пигментных клеток, в слое наружных и внутренних сегментов, в НЯС. Как известно, прорастание гемокапилляров в указанные слои, где в норме их нет, приводит к окислительному стрессу и, как следствие, гибели пигментцитов, палочковых и колбочковых нейронов, например, при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и яркого света [12]. При световом воздействии новые сосуды вторгались в слой наружных и внутренних сегментов, что было обусловлено экспрессией VEGF и влекло дегенеративные нарушения сетчатки [13].

В работе С. Тома и соавт. подчеркивается связь окислительного стресса и неоваскуляризации с изме-

нениями хориоидального кровотока, дегенерацией пигментного слоя, палочковых и колбочковых нейронов при возрастной ретинопатии [14]. Патологический ангиогенез сетчатки связывают с экспрессией фактора роста эндотелия VEGF при диабетической ретинопатии [15]. Проведенные группой авторов исследования [16] показали, что использованная в нашей работе ВУВЖД вызывает биохимические нарушения, характерные для метаболического синдрома.

В настоящее время патогенез диабетической ретинопатии охарактеризован в контексте передачи сигналов глюкозы, инсулина, VEGF и других ростовых факторов, среди которых TGF β придается важное значение [17]. На ранней стадии диабетической ретинопатии TGF β играет защитную роль для сосудов сетчатки, а на поздних стадиях способствует прогрессированию сосудистых нарушений, в том числе пролиферативных [18]. Известно, что TGF β контролирует пролиферацию эндотелиальных клеток, адгезию, отложение внеклеточного матрикса и

имеет ключевое значение в развитии диабетической ретинопатии [19, 20]. В нашем исследовании повышение концентрации TGF β было выявлено у старых крыс, что сопровождалось пролиферативными изменениями в сетчатке в виде неоваскулогенеза при использовании ВУВЖД. Это происходило на фоне повышения содержания глюкозы, инсулина в крови и роста индекса инсулинорезистентности. У старых крыс на ВУВЖД также возрастало содержание фибронектина в плазме крови. Известно, что активацию фибронектина в эндотелиоцитах и перицитах сетчатки вызывает TGF β . Это приводит к утолщению базальных мембран капилляров и нарушению проницаемости гематоретинального барьера при диабетической ретинопатии [21, 22]. Следовательно, динамика ростовых факторов, изученных в настоящей работе и вовлеченных в патогенез ретинопатии, соответствовала процессам неоваскулогенеза и другим сосудистым нарушениям, играющим ключевую роль в возрастных и связанных с ВУВЖД структурных нарушениях сетчатки. Исходя из этого, следует подчеркнуть важное клиническое значение определения указанных биохимических показателей в диагностике и лечении старческих и диабетических ретинопатий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что ВУВЖД усиливает возрастные изменения сетчатки у старых крыс. Старение и ВУВЖД проявляют синергизм в поражении палочковых и колбочковых нейронов, вызывая их кариопикноз и массовую гибель, влекущую разрушение слоя наружных и внутренних сегментов, резкое истончение НЯС до 1–2 рядов ядер, истончение наружного сетчатого слоя. Поражение палочек и колбочек сетчатки сопровождаются очаговыми деструктивными изменениями пигментцитов, уменьшением содержания хориокапилляров в очагах деструкции. ВУВЖД вызывает увеличение содержания TGF β и фибронектина в сыворотке крови, неоваскуляризацию в наружных слоях сетчатки, что, по нашему мнению, играет ключевую роль в механизмах их деструкции. Внутренние слои сетчатки страдали в меньшей степени, чем слои, образованные палочковыми и колбочковыми нейронами, а также пигментными клетками у старых крыс на ВУВЖД. У молодых крыс ВУВЖД не вызывала выраженных гистологических нарушений сетчатки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Dai W., Dierschke S.K., Toro A.L., Dennis M.D. Consumption of a high fat diet promotes protein O-GlcNAcylation in mouse retina via NR4A1-dependent GFAT2 expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018;1864(12):3568–3576. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.09.006.
2. Hammoum I., Mbarek S., Dellaa A., Dubus E., Baccouche B., Azaiz R. et al. Study of retinal alterations in a high fat diet-induced type ii diabetes rodent: Meriones shawi. *Acta Histochem.* 2017;119(1):1–9. DOI: 10.1016/j.acthis.2016.05.005.
3. Vidal E., Lalarme E., Maire M.-A., Febvret V., Grégoire S., Gambert S. et al. Early impairments in the retina of rats fed with high fructose/high fat diet are associated with glucose metabolism deregulation but not dyslipidaemia. *Sci. Rep.* 2019;9(1):5997. DOI: 10.1038/s41598-019-42528-9.
4. Lee K.S., Lin S., Copland D.A., Dick A.D., Liu J. Cellular senescence in the aging retina and developments of senotherapies for age-related macular degeneration. *J. Neuroinflammation.* 2021;18(1):32. DOI: 10.1186/s12974-021-02088-0.
5. Nag T.C., Wadhwa S. Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states. *Micron.* 2012;43(7):759–781. DOI: 10.1016/j.micron.2012.01.011.
6. Kovács-Valasek A., Etelka Pöstyéni E., Dénes V., Mester A., Sétáló G.Jr., Gábor R. Age-related alterations of proteins in albino Wistar rat retina. *Cells Tissues Organs.* 2021;210(2): 135–150. DOI: 10.1159/000515447.
7. Karaca C., Karaca Z. Beyond hyperglycemia, evidence for retinal neurodegeneration in metabolic syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018;59(3):1360–1367. DOI: 10.1167/iovs.17-23376.
8. Godisela K.K., Reddy S.S., Kumar C.U., Saravanan N., Reddy P.Y., Jablonski M.M. et al. Impact of obesity with impaired glucose tolerance on retinal degeneration in a rat model of metabolic syndrome. *Mol. Vis.* 2017;23:263–274.
9. Yau P.L., Kim M., Tirsi A., Convit A. Retinal vessel alterations and cerebral white matter microstructural damage in obese adolescents with metabolic syndrome. *JAMA Pediatr.* 2014;168(12):e142815. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2014.2815.
10. Thierry M., Pasquis B., Buteau B., Fourgeux C., Dembele D., Leclerc L. et al. Early adaptive response of the retina to a pro-diabetogenic diet: Impairment of cone response and gene expression changes in high-fructose fed rats. *Exp. Eye. Res.* 2015;135:37–46. DOI: 10.1016/j.exer.2015.04.012.
11. Paz M.C., Barcelona P.F., Subirada P.V., Ridano M.E., Chiabrando G.A., Castro C. et al. Metabolic syndrome triggered by fructose diet impairs neuronal function and vascular integrity in ApoE-KO mouse retinas: Implications of autophagy deficient activation. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:573987. DOI: 10.3389/fcell.2020.573987.
12. Логвинов С.В., Потапов А.В. Структурные изменения сетчатки при комбинированном воздействии света и рентгеновских лучей. *Морфология.* 2000;117(1):19–23.
13. Tisi A., Parete G., Flati V., Maccarone R. Up-regulation of pro-angiogenic pathways and induction of neovascularization by an acute retinal light damage. *Sci. Rep.* 2020;10(1):6376. DOI: 10.1038/s41598-020-63449-y.
14. Toma C., De Cilla S., Palumbo A., Garhwal D.P., Grossini E. Oxidative and Nitrosative Stress in Age-Related Macular Degeneration: A Review of Their Role in Different Stages of Disease. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(5):653. DOI: 10.3390/antiox10050653.

15. Rezzola S., Loda A., Corsini M., Semeraro F., Annesse T., Presta M. et al. Angiogenesis-Inflammation Cross Talk in Diabetic Retinopathy: Novel Insights From the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane/Human Vitreous Platform. *Front. Immunol.* 2020;11:581288. DOI: 10.3389/fimmu.2020.581288.
16. Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Трубаева О.А., Петрова И.В., Гречишников А.Ю. и др. Влияние высокожировой и высокоуглеводной диеты на клетки крови крыс. *Бюллетень сибирской медицины.* 2021;20(3):6–12. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-3-6-12.
17. Wheeler S.E., Lee N.Y. Emerging roles of transforming growth factor β signaling in diabetic retinopathy. *J. Cell. Physiol.* 2017;232(3):486–489. DOI: 10.1002/jcp.25506.
18. Huang H. Pericyte-endothelial interactions in the retinal microvasculature. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(19):7413. DOI: 10.3390/ijms21197413.
19. Goumans M.-J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P., Ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J.* 2002;21(7):1743–1753. DOI: 10.1093/emboj/21.7.1743.
20. Gacka M., Adamiec J. The role of transforming growth factor- β in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Przegl. Lek.* 2006;63(5):296–298. (In Polish).
21. Van Geest R.J., Klaassen I., Vogels I.M., Van Noorden C.J., Schlingemann R.O. Differential TGF- β signaling in retinal vascular cells: a role in diabetic retinopathy? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51(4):1857–1865. DOI: 10.1167/iov.09-4181.
22. Chaqour B., Karrasch C. Eyeing the extracellular matrix in vascular development and microvascular diseases and bridging the divide between vascular mechanics and function. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(10):3487. DOI: 10.3390/ijms21103487.

Вклад авторов

Логвинов С.В. – разработка концепции, подготовка морфологической части текста статьи, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации. Мустафина Л.Р. – проведение морфологического исследования, иллюстративного материала интерпретация морфологических данных. Курбатов Б.К. – разработка дизайна исследования, проведение исследования, статистический анализ и интерпретация данных. Нарыжная Н.В. – разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, статистическая обработка и подготовка текста статьи, обоснование рукописи. Варакута Е.Ю. – проведение морфологического исследования, интерпретация данных. Потапов А.В. – разработка концепции, подготовка текста статьи, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания.

Информация об авторах

Логвинов Сергей Валентинович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, СибГМУ, г. Томск, s_logvinov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9876-6957>

Мустафина Лилия Рамильевна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, СибГМУ, г. Томск, lrmustafina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3526-7875>

Курбатов Борис Константинович – мл. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, bobersanker@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9603-822X>

Нарыжная Наталья Владимировна – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск, natalynar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2264-1928>

Варакута Елена Юрьевна – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии, СибГМУ, г. Томск, varelen@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3173-5336>

Потапов Алексей Валерьевич – д-р мед. наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, д-р мед. наук, potalex@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0468-3959>

(✉) **Мустафина Лилия Рамильевна**, lrmustafina@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.01.2022;
одобрена после рецензирования 25.02.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616.858-056.7-092

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-105-113>

Средовые и генетические факторы риска болезни Паркинсона

Никитина М.А.¹, Алифирова В.М.¹, Брагина Е.Ю.², Бабушкина Н.П.², Гомбоева Д.Е.², Назаренко М.С.^{1,2}

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, ул. Набережная реки Ушайки, 10

РЕЗЮМЕ

Цель. Проанализировать факторы риска в группе пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и сопоставить их с литературными данными.

Материалы и методы. В исследование были включены 439 пациентов с БП и 354 индивида группы контроля, сопоставимых по полу и возрасту. На каждого индивида заполнена регистрационная карта, содержащая информацию о демографических, эпидемиологических, клинических и нейропсихологических данных. Тяжесть заболевания исследовалась по шкале MDS-UPDRS; стадия БП – согласно шкале Hoehn – Yahr. Когнитивные функции оценивались по MoCA-тесту и MMSE. Длину (CAG)_n-повтора в гене *HTT* определяли с помощью фрагментного анализа на платформе ABI Genetic Analyzer 3730. Анализ полученных результатов проводился с помощью GeneMapper Software v4.1 (Applied Biosystems, США).

Результаты. При сравнении пациентов с БП и контрольной выборки отношение шансов развития БП у индивидов с травмой головы составило 3,13 (95% CI: 2,27–4,34; $p = 4,94 \times 10^{-13}$), показав значимость этого фактора риска БП. Употребление в анамнезе кофе отличает группу пациентов с БП от группы контроля (OR = 0,41 (95% CI: 0,30–0,56); $p < 0,0001$), подтверждая его нейропротективное действие. Анализ вариабельности длины (CAG)_n-повторов в гене *HTT* показал, что пациенты, в генотипе которых присутствует аллель, содержащий 17 повторов в сочетании с любым другим аллелем, кроме аллеля, содержащего 18 повторов, обладает протективным эффектом (OR = 0,50 (95% CI: 0,27–0,92); $p = 0,025$). Все генотипы, содержащие аллель с 18 повторами, предрасполагают к БП (OR = 2,57 (95% CI: 1,66–4,28); $p = 0,007$). Предрасполагающий эффект аллеля, не связанный с экспансией CAG-повторов гена *HTT*, к БП выявлен впервые.

Заключение. Черепно-мозговая травма и аллель (CAG)₁₈-повторов гена *HTT* являются факторами риска для развития БП. Употребление кофе можно отнести к протективным факторам в отношении БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, факторы риска, кофе, черепно-мозговая травма, *HTT*

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при частичной грантовой поддержке научно-исследовательских проектов, выполняемых молодыми учеными («Роль генов репарации в патогенезе болезни Паркинсона, болезни Гентингтона и нормального (здорового) старения», 2021–2023 гг.). Работа выполнена при частичном финансировании Министерства науки и высшего образования (госзадание № 122020300041-7).

Соответствие принципам этики. Обследование, нейропсихологическое тестирование и забор венозной крови всех лиц проводились только после подписания информированного согласия. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7813 от 27.05.2019).

✉ Никитина Мария Анатольевна, nikitina_ma@mail.ru

Для цитирования: Никитина М.А., Алифиров В.М., Брагина Е.Ю., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е., Назаренко М.С. Средовые и генетические факторы риска болезни Паркинсона. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):105–113. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-105-113>.

Environmental and genetic risk factors for Parkinson's disease

Nikitina M.A.¹, Alifirova V.M.¹, Bragina E.Yu.², Babushkina N.P.², Gomboeva D.E.², Nazarenko M.S.^{1,2}

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Sciences

10, Ushaika Embankment, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To analyze risk factors in the group of patients with Parkinson's disease (PD) and compare them with the literature data.

Materials and methods. The study included 439 patients with PD and 354 controls, comparable by gender and age. For each individual, a registration card was filled in containing demographic, epidemiological, clinical, and neuropsychological data. The severity of the disease was studied according to the MDS-UPDRS scale; the stage of PD was determined according to the Hoehn and Yahr scale. Cognitive functions were assessed by the MoCA test and MMSE. The length of the (CAG)_n repeat region in the *HTT* gene was determined using fragment analysis on the ABI 3730 DNA analyzer. The obtained results were analyzed using GeneMapper Software v4.1 (Applied Biosystems, USA).

Results. When comparing patients with PD and the control group, the odds ratio (OR) for PD in individuals with traumatic brain injury was 3.13 (95% confidence interval (CI): 2.27–4.34; $p = 4.94 \times 10^{-13}$), which showed the significance of this risk factor for PD. Consumption of coffee in the anamnesis distinguished the group of PD patients from the control group (OR = 0.41 (95% CI: 0.30–0.56); $p < 0.0001$), confirming its neuroprotective effect. Analysis of the variability in the length of the (CAG)_n repeat regions in the *HTT* gene showed that patients whose genotype contained an allele with 17 repeats in combination with any allele other than an allele containing 18 repeats had a protective effect (OR = 0.50 (95% CI: 0.27–0.92); $p = 0.025$). All genotypes containing an allele with 18 repeats were predisposed to PD (OR = 2.57 (95% CI: 1.66–4.28); $p = 0.007$). The predisposing effect of the allele to PD, unrelated to the expansion of CAG repeats in the *HTT* gene, was revealed for the first time.

Conclusion. Traumatic brain injury and the allele with 18 CAG repeats in the *HTT* gene are risk factors for PD. Coffee consumption can be attributed to protective factors in relation to PD.

Keywords: Parkinson's disease, risk factors, coffee, traumatic brain injury, *HTT* gene

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

Source of financing. The study was partially supported by the research grants for young scientists ("The role of repair genes in the pathogenesis of Parkinson's disease, Huntington's disease, and healthy ageing" 2021–2023). The study was partially supported by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education No.122020300041-7.

Conformity with the principles of ethics. The patients gave an informed consent to examination, neuropsychological testing, and sampling of venous blood. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 7813 of 27.05.2019).

For citation: Nikitina M.A., Alifirova V.M., Bragina E.Yu., Babushkina N.P., Gomboeva D.E., Nazarenko M.S. Environmental and genetic risk factors for Parkinson's disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):105–113. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-105-113>.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – это хроническое, прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, описанное Дж. Паркинсоном в его публикации 1817 г. «Эссе о дрожательном параличе» [1]. Патологическими маркерами БП являются дегенерация дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга и появление телец Леви, представляющих собой цитоплазматические включения, содержащие нерастворимые агрегаты α -синуклеина [2]. Тем не менее патологический процесс не ограничивается черной субстанцией, а является более распространенным, затрагивая другие области мозга и вовлекая недофаминергические нейроны.

Болезнь Паркинсона имеет многофакторную этиологию, включающую средовую и генетическую компоненты. Так, образ жизни и факторы окружающей среды [3], а также многочисленные генетические варианты оказывают модифицирующее влияние как на предрасположенность к БП [4], так и на темп прогрессирования заболевания [5–7]. Такие факторы, как возраст, мужской пол [8], работа с пестицидами [9], травмы головы, депрессия, остеопороз, лечение бета-блокаторами или меланомы в анамнезе [10] связаны с повышенным риском БП, тогда как физическая активность [11], употребление кофе [12], длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов, блокаторов кальциевых каналов и статинов связаны со снижением риска болезни [3]. В некоторых исследованиях отмечается более низкая частота встречаемости пациентов с БП среди лиц, злоупотребляющих алкоголем [11], и у курящих индивидов [13]. Последние две ассоциации спорные и могут быть связаны с особенностями формирования исследуемых групп.

Примерно в 5–10% случаев можно говорить о моногенных формах, к настоящему времени описано не менее 18 различных генов, мутации которых приводят к БП [14]. Основные патогенные варианты сосредоточены в генах, кодирующих альфа-синуклеин (SNCA), киназу с лейцин-богатыми повторами (LRRK2), глюкоцереброзидазу (GBA), паркин убиквитин-протеинлигазу E3 (PRKN) [15]. Однако у большинства пациентов с БП заболевание носит спорадический характер и мутации в этих генах отсутствуют [2, 16].

Более того, наиболее распространенные генетические мутации, связанные с БП, обладают неполной пенетрантностью, что указывает на наличие модифицирующих факторов. Так, исследование, сравнивающее уровень конкордантности у монозиготных и дизиготных близнецов, показало, что наследуе-

мость БП составляет всего 30%, и это свидетельствует о большой части риска развития БП, связанной с факторами окружающей среды и образа жизни [17]. Одним из возможных генов-модификаторов является ген *HTT*, экспансия (CAG) n -повторов (от 36 и выше) в котором приводит к болезни Гентингтона (БГ). Предполагается, что длина повторов является физиологическим модификатором соотношения АДФ/АТФ, что определяет наличие общей патологической компоненты в обоих заболеваниях (БГ и БП). Кроме того, в литературе описаны единичные случаи пациентов с атипичным течением БП: у пациентов с БП при выраженной клинической картине наблюдаются некоторые нейрофизиологические признаки, характерные для БГ. У данных пациентов в гене *HTT* были выявлены аллели промежуточной длины – (CAG) $_{27}$ и (CAG) $_{29}$, не связанные с патологической для БГ экспансией [18, 19]. Соответственно, в качестве еще одного фактора риска БП нами была рассмотрена длина (CAG) n -повторов в гене *HTT*.

Цель исследования – оценка роли средовых и молекулярно-генетических факторов в развитии БП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группа пациентов с БП была сформирована на кафедре неврологии СибГМУ, диагноз устанавливался в соответствии с Клиническими диагностическими критериями БП Общества двигательных расстройств [20]. Нами было обследовано и включено в исследование 439 пациентов с БП (179 мужчин и 260 женщин) и 354 индивида из группы контроля (143 мужчины и 211 женщин). Контрольная группа включала в себя здоровых людей без нейродегенеративной патологии. Обследуемые группы были сопоставимы по полу (1 : 1,45 и 1 : 1,47 соответственно) и возрасту ($66,3 \pm 7,3$ и $66,2 \pm 9,1$ лет, $p > 0,05$).

Все участники исследования проходили клиническое неврологическое обследование и нейропсихологическое тестирование. На каждого индивидуума была заполнена индивидуальная регистрационная карта (ИРК), содержащая информацию о демографических, эпидемиологических и клинических данных. Информация о факторах риска БП (травма головы, токсическое воздействие химических веществ, курение, употребление кофе) была получена со слов обследуемых лиц и их близких (в исследование не были включены индивидуумы с выраженными когнитивными нарушениями). Перечисленные факторы учитывали только в том случае, если они предшествовали симптомам БП.

Тяжесть заболевания была исследована с помощью единой шкалы оценки БП, MDS-UPDRS; уточнение стадии заболевания – с помощью шкалы Hoehn –

Yahr (1967) [21]. Нарушение когнитивных функций оценивалось по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA-тест) [22] и MMSE [23].

План и проведение исследования соответствуют принципам Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice – GCP) и Хельсинкской декларации. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7813 от 27.05.2019).

Молекулярно-генетическое исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Длину (CAG)*n*-повтора в гене *HTT* определяли с помощью фрагментного анализа на платформе ABI Genetic Analyzer 3730 по методике, описанной ранее [24]. Анализ полученных результатов проводился с помощью программного обеспечения GeneMapper Software v4.1 (Applied Biosystems). Статистическая обработка была проведена с помощью программы Statistica 10. Расчет отношения шансов (OR) и 95%-го доверительного интервала (95% CI) выполнен с помощью онлайн-инструмента https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ассоциация черепно-мозговой травмы (ЧМТ) с БП. Согласно литературным данным, травма головы исследовалась как фактор риска ряда нейродегенеративных заболеваний [25]. Несколько исследований показали, что травма головы способна вызывать нейровоспаление, повреждая либо нейроны непосредственно [26, 27], либо оказывая неблагоприятное действие опосредованно через нарушение гематоэнцефалического барьера [28, 29].

Среди обследованных 439 пациентов с БП о положительном анамнезе по поводу травмы головы сообщили 208 (47,4%) индивидуумов (42 женщины и 166 мужчин), средний возраст которых составил $66,2 \pm 9,2$ лет, и только 79 (22,3 %) здоровых пациентов (18 женщин и 61 мужчина), средний возраст $65,5 \pm 8,8$ лет (рис. 1). При сравнении пациентов и контрольной выборки по частоте ЧМТ отношение шансов развития БП у индивидов с травмой головы составило 3,13 (95% CI: 2,27–4,34; $p = 4,94 \times 10^{-13}$). Таким образом, травма головы является значимым фактором развития БП. О травме головы с потерей сознания сообщили 63 (14,3%) пациента с БП и 17 (4,8%) индивидов из группы контроля соответственно. Вероятность развития БП возрастает у индивидов с более тяжелой ЧМТ (сопровождавшейся потерей сознания (ЧМТ + ПС)). Так, отношение шансов

развития патологии у лиц с ЧМТ + ПС по сравнению с индивидами без ЧМТ составило 4,41 (95% CI: 2,44–8,07; $p = 7,39 \times 10^{-8}$). При этом данный фактор преобладал у мужчин с акинетико-ригидной формой БП. Средний возраст дебюта заболевания существенно не отличался между пациентами с БП с положительным анамнезом черепно-мозговой травмы и пациентами с БП без такого анамнеза ($66,2 \pm 9,2$ лет против $67,8 \pm 11,8$ лет; $p = 0,82$).

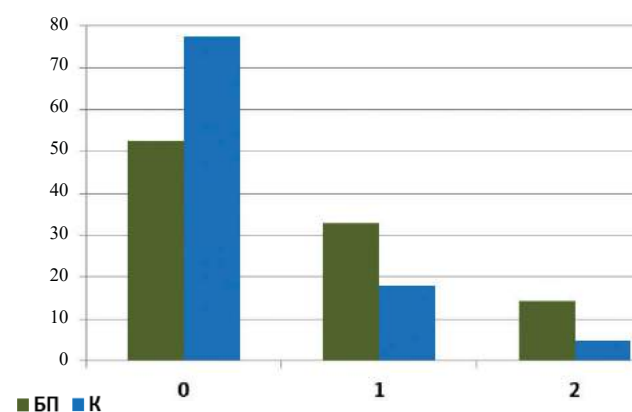


Рис. 1. Частоты черепно-мозговых травм в анамнезе у пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе (К), %: 0 – отсутствие ЧМТ; 1 – наличие ЧМТ, не сопровождавшейся потерей сознания; 2 – наличие ЧМТ, сопровождавшейся потерей сознания

Токсическое воздействие химических веществ. Согласно многочисленным исследованиям, охватывающим популяции по всему миру, воздействие пестицидов, работа на ферме или проживание в сельской местности также считаются факторами риска БП [16]. Профессиональные вредности, а также случайное воздействие вследствие проживания вблизи полей, обработанных такими пестицидами, как паракват, ротенон, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота и некоторые дитиокарбаматы и органохлорины, связаны с повышенным риском развития БП [30]. Генетически обусловленные нарушения у лиц, контактирующих с химическими токсинами, могут оказать влияние, увеличивая риск развития проявлений данного нейродегенеративного заболевания [31]. И наоборот, соблюдение правил гигиены и здоровая диета могут защитить от неблагоприятных последствий воздействия окружающей среды, нивелировать влияние пестицидов [32, 33].

Среди обследованных нами 26,4% (116 пациентов) отмечали наличие в анамнезе токсического воздействия химических веществ продолжительностью более 5 лет: бензин и нефтепродукты 8,7% (38), краски и органические растворители 8,0% (35), ядохимикаты и удобрения 4,3% (19), металлы и радиация 3,6% (16); 8 (1,8%) пациентов с БП работали сварщи-

ками (стаж 10 ± 6 лет). Однако при сравнении групп пациентов и контроля с учетом наличия токсического воздействия в анамнезе значимых различий не обнаружено ($OR = 0,79$ (95% CI: 0,58–1,08); $p = 0,1409$).

Факторы образа жизни. Ряд факторов образа жизни связывают со снижением риска развития БП. Так, наиболее прочная связь была обнаружена между снижением риска развития БП у курящих сигареты лиц и других потребителей табака. Предполагается, что никотин играет центральную роль в этой ассоциации, хотя недавно завершенное клиническое исследование не выявило модифицирующего эффекта никотинового пластыря у пациентов с БП на проявления и прогрессирование этого заболевания [34, 35].

В настоящем исследовании около 42% ($n = 184$) пациентов с БП никогда не курили, 53% ($n = 233$) курили в анамнезе и 5% ($n = 22$) продолжают курить в настоящее время. В группе контроля соответствующие показатели – 50,3% ($n = 178$), 43,5% ($n = 154$) и 6,2% ($n = 22$). Статистически значимых отличий при сравнении групп курящих и некурящих индивидов не обнаружено ($p = 0,6594$).

В 2007 г. Dr. Xiang Gao было опубликовано первое большое проспективное исследование длительностью 16 лет о влиянии диеты и пищевых привычек на риск развития БП [36]. Так, было обнаружено, что употребление кофе и кофеина связано с более низким риском развития БП. Эффект наиболее выражен у мужчин и является дозозависимым и, возможно, зависит дополнительно от генетических факторов. Аналогично в некоторых исследованиях показано снижение риска БП у лиц, пьющих крепко заваренный чай [37, 38].

Среди обследованных нами пациентов с БП только 20,5 % ($n = 90$) употребляют кофе и около 38,7% ($n = 137$) – среди контрольной группы сравнения ($OR = 0,41$ (95% CI: 0,30–0,56); $p < 0,0001$). При этом в анамнезе около 16% пациентов с БП регулярно ежедневно употребляли кофе на протяжении более чем 10 лет. Эти результаты согласуются с данными, полученными в исследовании Xiang Gao и соавт. [36].

Употребление алкоголя в обследованных нами группах было оценено на момент обследования и в анамнезе с учетом частоты потребления кружек пива, бокалов вина, крепленого вина, сладкого ликера или крепкого алкоголя в пересчете на граммы в сутки (г/сут) на основе стандартного объема емкости для конкретного напитка. Деление по группам было следующим образом: $<0,1$ г/сут (неупотреблявшие, I), 0,1–4,9 г/сут (II), 5,0–14,9 г/сут (III), 15,0–29,9 г/сут (IV), 30,0–59,9 г/сут (V) и ≥ 60 г/сут (VI). Среди лиц с БП были установлены следующие показатели в анамнезе: 15% (I), 18% (II), 34% (III), 20% (IV),

10% (V) и $\geq 3\%$ (VI). В контрольной группе: 13% (I), 19% (II), 35% (III), 20% (IV), 10% (V) и $\geq 3\%$ (VI) ($p > 0,05$). При этом среднее значение употребляемого алкоголя между группами не отличалось: $3,01 \pm 1,29$ и $3,02 \pm 1,26$ ($p = 0,9501$).

Длина (CAG) n -повторов гена HTT. Несмотря на неопровержимые доказательства патофизиологической роли митохондрий при БП и их ключевой роли в различных клеточных путях, выделение митохондриальной дисфункции как причинного или последовательного фактора и идентификация исходных событий, ведущих к нейродегенерации, остается сложной задачей [39].

Ранее нами были показаны ассоциации с БП генов *NBN*, *ATM*, *MLH1*, недостаточность белковых продуктов которых также может приводить к развитию дисфункции митохондрий. К развитию БП предрасполагают частые аллели и генотипы несинонимичных замен rs1801516 в гене *ATM* и rs1799977 в гене *MLH1*, при этом гетерозиготы обладают протективным эффектом. Рисковым эффектом обладают также редкий аллель и генотип промоторной замены в гене *NBN* (rs1805800) [40].

В настоящем исследовании нами была проанализирована длина (CAG) n -повторов у больных с БП и в группе контроля. В группе пациентов БП и контрольной выборке выявлено сопоставимое количество аллелей (16 и 17 у пациентов и в контроле соответственно) сопоставимого диапазона длин (12–32 повтора у пациентов и 12–30 – в контрольной выборке) (рис. 2). Аллели промежуточной длины (CAG) $_{26-35}$ выявлены в обеих группах в гетерозиготном состоянии с аллелями нормальной длины: (CAG) $_{16-19}$ у пациентов с БП и (CAG) $_{15-24}$ в группе контроля. Частота индивидов с промежуточными аллелями в группе пациентов составила 2,38%, в контроле – 5,85%.

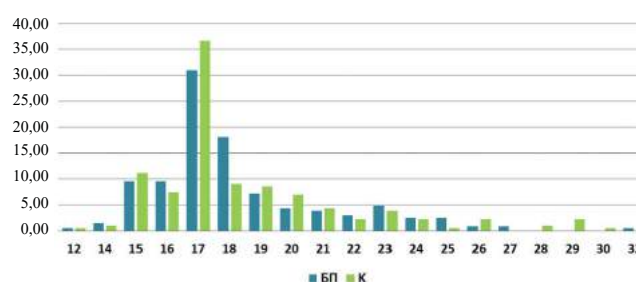


Рис. 2. Частоты аллелей (CAG) n -повторов в гене *HTT* у пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной выборке, %

Распределение аллелей в обеих исследованных группах сходно, около 80% аллелей имеют длину 15–20 повторов (рис. 3); в обеих группах наиболее частым является вариант (CAG) $_{17}$ (30,95 и 36,70% у больных и в контроле соответственно). Тем не менее

аллель (CAG)₁₈ в группе пациентов с БП встречается статистически значимо чаще, чем в контроле (OR = 2,22 (95% CI: 1,66–4,28), $\chi^2 = 6,09$; $p = 0,014$). Таким образом, выявлен рисковый аллель (18 повторов), аллель с 17 повторами встречается в группе контроля чаще на 5,75%, однако эти различия статистически не значимы ($p = 0,269$).

Поскольку в каждой из выборок наблюдалось большое количество генотипов (по 38 в каждой выборке), для дальнейшего анализа генотипы были сгруппированы. В группу «18/all» были включены все генотипы, один из аллелей которых содержал 18 повторов, вторым аллелем при этом мог быть любой, кроме содержащего 17 повторов. Генотип, представленный сочетанием аллелей с 17 и 18 повторами, рассматривался отдельно. В группу «17/all» были включены все генотипы, один из аллелей которых содержал 17 повторов, вторым аллелем при этом мог быть любой, кроме содержащего 18 повторов. Все остальные генотипы были включены в группу «all/all». Генотип «17/all» является протективным (OR = 0,50 (95% CI: 0,27–0,92), $\chi^2 = 5,05$; $p = 0,025$). В то же время генотипы, содержащие 18 аллелей, преобладают у больных БП: «18/all» встречается чаще в 2,98 раз, а «17/18» – в 1,47 раз чаще, чем в контроле. Поэтому далее их рассматривали вместе, частота генотипа, содержащего 18 аллелей в сочетании с любым другим (включая аллель с 17 повторами), у пациентов составила 36,19%, в группе контроля – 18,09%; для этих генотипов значение OR составило 2,57 (95% CI: 1,66–4,28; $\chi^2 = 7,25$; $p = 0,007$).

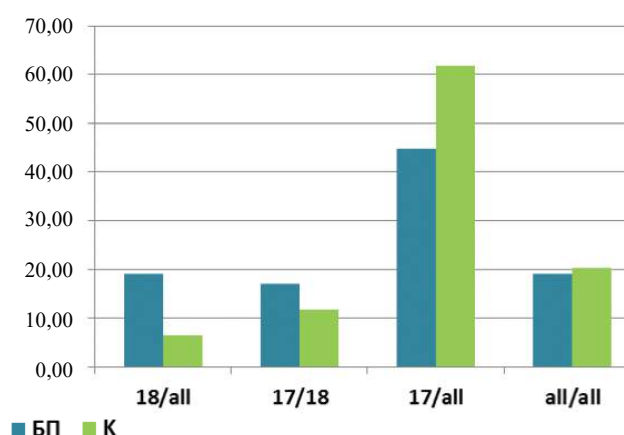


Рис. 3. Частоты генотипов по (CAG)*n*-повтору в гене *HTT* у пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной выборке, %

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что генотип, содержащий аллель с 17 CAG-повторами, обладает протективным эффектом в сочетании с любым другим аллелем, кроме содержащего 18 повторов. В свою очередь, все генотипы,

содержащие аллель с 18 повторами, предрасполагают к БП. Предрасполагающий эффект аллеля нормальной длины гена *HTT* к БП в настоящем исследовании выявлен впервые. Сложно сказать, каким образом данная ассоциация может быть реализована в патологический фенотип, поскольку в доступной литературе отсутствуют данные о вовлеченности в развитие патологии аллелей нормальной длины. Не исключено, что выявленные ассоциации могут быть объяснены вовлеченностью полиглутаминового тракта в гене гентингина в регуляцию энергетической функции митохондрий, поскольку зависимость соотношения АДФ/АТФ, показанная I.S. Seong и соавт. (2005), предполагает участие в этом феномене не только патологических, но и нормальных аллелей [41]. Соответственно, изменение энергетической функции митохондрий, возможно, будет вносить вклад в фенотипические проявления БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование пациентов с БП предоставляет доказательства того, что образ жизни является модифицируемым фактором и его изменение может улучшить показатели качества жизни, связанные со здоровьем.

Употребление в анамнезе кофе статистически значимо отличает группу пациентов с БП от группы контроля. Полученные данные предполагают возможный нейропротективный потенциал кофеина, способствующий поддержанию когнитивного и физического функционирования, улучшая качество жизни больных. Кофеин известен как психоактивный стимулятор и антиоксидант, способствующий повышению внимания. Показано, что кофеин способен защищать от окисления липопротеины низкой плотности и уменьшать окислительное повреждение ДНК. Являясь антагонистом аденозиновых рецепторов A2A и обладая нейропротективным действием, кофеин уменьшает потерю дофамина [42]. Так, в животных моделях БП лечение с использованием кофеина способствовало уменьшению окислительного стресса, восстановлению уровня дофамина в среднем мозге и полосатом теле, что, в свою очередь, предотвращало снижение двигательной активности и мышечной силы и нормализовало уровень норадреналина [43].

Травма головы широко исследовалась как фактор риска многих нейродегенеративных заболеваний [44]. Несколько исследований показали, что травма головы сопровождается нейровоспалением, либо непосредственным повреждением нейронов [45–47], либо опосредованно через нарушение гематоэнцефалического барьера [48]. Кроме того, было обнару-

жено, что высокие уровни α -синуклеина повышены в спинномозговой жидкости лиц, перенесших тяжелую ЧМТ [49]. Литературные данные предполагают возможную связь между травмой головы и БП, что было показано в нашем исследовании.

Преимуществами данного исследования являются проведение личных интервью с пациентами, зарегистрированные клинические данные и данные об окружающей среде, а также полное неврологическое обследование наряду с размером выборки пациентов. Однако при интерпретации результатов следует учитывать несколько ограничений. Так, из-за ретроспективного дизайна следует принимать во внимание возможную роль систематической ошибки припоминания: анамнез ЧМТ был установлен при опросе индивидуумов, и пациенты с БП могут быть более склонны вспоминать элементы, которые могли бы оправдать их состояние. Несмотря на это, ранее проведенное исследование показало высокую согласованность между оценкой своего анамнеза и документально подтвержденной ЧМТ в медицинской карте [50].

Таким образом, БП представляет собой сложное заболевание, в развитие которого вносят свой вклад как экологические, так и молекулярно-генетические факторы, требующие дальнейшего более глубокого изучения. Снижение бремени БП может быть достигнуто с помощью двусторонней стратегии: реализация мероприятий по коррекции модифицируемых факторов риска, таких как поведенческие факторы или факторы окружающей среды, и разработка лекарств, направленных на коррекцию функционирования белковых продуктов генов, связанных с БП.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Obeso J.A., Stamelou M., Goetz C.G., Poewe W., Lang A.E., Weintraub D. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov. Disord.* 2017;32(9):1264–1310. DOI: 10.1002/mds.27115.
- Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkmann J. et al. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017;3:17013. DOI: 10.1038/nrdp.2017.13.
- Ascherio A., Schwarzschild M.A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 2016;15(12):1257–1272. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30230-7.
- Dong X., Liao Z., Gritsch D., Hadzhiev Y., Bai Y., Locascio J.J. et al. Enhancers active in dopamine neurons are a primary link between genetic variation and neuropsychiatric disease. *Nat. Neurosci.* 2018;21(10):1482–1492. DOI: 10.1038/s41593-018-0223-0.
- Liu G., Boot B., Locascio J.J., Jansen I.E., Winder-Rhodes S., Eberly S. et al. Specifically neuropathic Gaucher's mutations accelerate cognitive decline in Parkinson's. *Ann. Neurol.* 2016;80(5):674–685. DOI: 10.1002/ana.24781.
- Domínguez-Baleón C., Ong J.S., Scherzer C.R., Rentería M.E., Dong X. Understanding the effect of smoking and drinking behavior on Parkinson's disease risk: a Mendelian randomization study. *Sci. Rep.* 2021;11(1):13980. DOI: 10.1038/s41598-021-93105-y.
- Liu G., Locascio J.J., Corvol J.C., Boot B., Liao Z., Page K. et al. Prediction of cognition in Parkinson's disease with a clinical-genetic score: a longitudinal analysis of nine cohorts. *Lancet Neurol.* 2017 Aug.;16(8):620–629. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30122-9.
- Balestrino R., Schapira A.H.V. Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* 2020;27(1):27–42. DOI: 10.1111/ene.14108.
- Wang A., Costello S., Cockburn M., Zhang X., Bronstein J., Ritz B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur. J. Epidemiol.* 2011;26(7):547–555. DOI: 10.1007/s10654-011-9574-5.
- Рыбкина В.Л., Азизова Т.В. Факторы риска развития болезни Паркинсона. *Неврологический журнал.* 2017;22(6):287–294. DOI: 10.18821/1560-9545-2017-22-6-287-294.
- Bettiol S.S., Rose T.C., Hughes C.J., Smith L.A. Alcohol Consumption and Parkinson's Disease Risk: A Review of Recent Findings. *J. Parkinsons Dis.* 2015;5(3):425–442. DOI: 10.3233/JPD-150533.
- Costa J., Lunet N., Santos C., Santos J., Vaz-Carneiro A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J. Alzheimers Dis.* 2010;20(1):S221–238. DOI: 10.3233/JAD-2010-091525.
- Gallo V., Vineis P., Cancellieri M., Chiodini P., Barker R.A., Brayne C. et al. Exploring causality of the association between smoking and Parkinson's disease. *Int. J. Epidemiol.* 2019;48(3):912–925. DOI: 10.1093/ije/dyy230.
- Cherian A., Divya K.P. Genetics of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Belg.* 2020;120(6):1297–1305. DOI: 10.1007/s13760-020-01473-5.
- Cook L., Schulze J., Naito A., Alcalay R.N. The role of genetic testing for Parkinson's disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2021;21(4):17. DOI: 10.1007/s11910-021-01100-7.
- Simon D.K., Tanner C.M., Brundin P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clin. Geriatr. Med.* 2020;36(1):1–12. DOI: 10.1016/j.cger.2019.08.002.
- Goldman S.M., Marek K., Ottman R., Meng C., Comyns K., Chan P. et al. Concordance for Parkinson's disease in twins: A 20-year update. *Ann. Neurol.* 2019;85(4):600–605. DOI: 10.1002/ana.25441.
- Jot S. Parkinsonism with a Hint of Huntington's from 29 CAG repeats in HTT. *Brain Sci.* 2019;9(10):245. DOI: 10.3390/brainsci9100245.
- Никитина М.А., Брагина Е.Ю., Гомбоева Д.Е., Назаренко М.С., Жукова Н.Г., Нуржанова К.Ф. и др. Атипичное течение болезни Паркинсона у клиническими проявлениями болезни Гентингтона у пациентки с аллелем 27 CAG-повторов в гене *HTT*. *Бюллетень сибирской медицины.* 2020;19(4):235–240. DOI: 10.20538/1682-0363-2020-4-235-240.

20. Postuma R.B., Berg D., Stern M., Poewe W., Olanow C.W., Oertel W. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2015;30(12):1591–1601. DOI: 10.1002/mds.26424.
21. Hoehn M.M., Yahr M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 1967;17(5):427–442. DOI: 10.1212/wnl.17.5.427.
22. Freud T., Vostrikov A., Dwolatzky T., Punchik B., Press Y. Validation of the Russian version of the MoCA test as a cognitive screening instrument in cognitively asymptomatic older individuals and those with mild cognitive impairment. *Front. Med. (Lausanne).* 2020;7:447. DOI: 10.3389/fmed.2020.00447.
23. Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975;12(3):189–198. DOI: 10.1016/0022-3956(75)90026-6.
24. Bastepe M., Xin W. Huntington disease: molecular diagnostics approach. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2015;87:9.26.1–9.26.23. DOI: 10.1002/0471142905.hg0926s87.
25. Crane P.K., Gibbons L.E., Dams-O'Connor K., Trittschuh E., Leverenz J.B., Keene C.D. et al. Association of traumatic brain injury with late-life neurodegenerative conditions and neuropathologic findings. *JAMA Neurol.* 2016;73(9):1062–1069. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.1948.
26. Ramlackhansingh A.F., Brooks D.J., Greenwood R.J., Bose S.K., Turkheimer F.E., Kinnunen K.M. et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 2011;70(3):374–383. DOI: 10.1002/ana.22455.
27. Loane D.J., Kumar A., Stoica B.A., Cabatbat R., Faden A.I. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2014;73(1):14–29. DOI: 10.1097/NEN.0000000000000021.
28. Nicoletti A., Vasta R., Mostile G., Nicoletti G., Arabia G., Iliceto G. et al. Head trauma and Parkinson's disease: results from an Italian case-control study. *Neurol. Sci.* 2017;38(10):1835–1839. DOI: 10.1007/s10072-017-3076-5.
29. Stoll G., Jander S., Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002;513:87–113. DOI: 10.1007/978-1-4615-0123-7_3.
30. Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(7):2464. DOI: 10.3390/ijms21072464.
31. Carmona A., Zogzas C.E., Roudeau S., Porcaro F., Garrevoet J., Spiers K.M. et al. SLC30A10 mutation involved in Parkinsonism results in manganese accumulation within nanovesicles of the Golgi apparatus. *ACS Chem. Neurosci.* 2019;10(1):599–609. DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00451.
32. Aloizou A.M., Siokas V., Sapouni E.M., Sita N., Liampas I., Brotis A.G. et al. Parkinson's disease and pesticides: Are microRNAs the missing link? *Sci. Total. Environ.* 2020;744:140591. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140591.
33. Dardiotis E., Xiromerisiou G., Hadjichristodoulou C., Tsatsakis A.M., Wilks M.F., Hadjigeorgiou G.M. The interplay between environmental and genetic factors in Parkinson's disease susceptibility: the evidence for pesticides. *Toxicology.* 2013;307:17–23. DOI: 10.1016/j.tox.2012.12.016.
34. Breckenridge C.B., Berry C., Chang E.T., Sielken R.L. Jr., Mandel J.S. Association between Parkinson's disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(4):e0151841. DOI: 10.1371/journal.pone.0151841.
35. Martino R., Candundo H., Lieshout P.V., Shin S., Crispo J.A.G., Barakat-Haddad C. Onset and progression factors in Parkinson's disease: A systematic review. *Neurotoxicology.* 2017;61:132–141. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.04.003.
36. Gao X., Chen H., Fung T.T., Logroscino G., Schwarzschild M.A., Hu F.B. et al. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007;86(5):1486–1494. DOI: 10.1093/ajcn/86.5.1486.
37. Delamarre A., Meissner W.G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med.* 2017;46(2-1):175–181. DOI: 10.1016/j.lpm.2017.01.001.
38. Paul K.C., Chuang Y.H., Shih I.F., Keener A., Bordelon Y., Bronstein J.M. et al. The association between lifestyle factors and Parkinson's disease progression and mortality. *Mov. Disord.* 2019;34(1):58–66. DOI: 10.1002/mds.27577.
39. Prasuhn J., Davis R.L., Kumar K.R. Targeting mitochondrial impairment in Parkinson's disease: challenges and opportunities. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;8:615461. DOI: 10.3389/fcell.2020.615461.
40. Nikitina M., Babushkina N., Bragina E., Alifirova V., Gomboeva D., Koroleva E. et al. The role of repair genes in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 2021;429:119480.
41. Seong I.S., Ivanova E., Lee J.M., Choo Y.S., Fossale E., Anderson M. et al. HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(19):2871–2880. DOI: 10.1093/hmg/ddi319.
42. Chen J.F., Xu K., Petzer J.P., Staal R., Xu Y.H., Beilstein M. et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2001;21(10):RC143. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-10-j0001.2001.
43. Khadrawy Y.A., Salem A.M., El-Shamy K.A., Ahmed E.K., Fadl N.N., Hosny E.N. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of Parkinson's disease induced by rotenone. *J. Diet Suppl.* 2017;14(5):553–572. DOI: 10.1080/19390211.2016.1275916.
44. Crane P.K., Gibbons L.E., Dams-O'Connor K., Trittschuh E., Leverenz J.B., Keene C.D. et al. Association of traumatic brain injury with late-life neurodegenerative conditions and neuropathologic findings. *JAMA Neurol.* 2016;73(9):1062–1069. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.1948.
45. Ramlackhansingh A.F., Brooks D.J., Greenwood R.J., Bose S.K., Turkheimer F.E., Kinnunen K.M. et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 2011Sept.;70(3):374–83. DOI: 10.1002/ana.22455.
46. Loane D.J., Kumar A., Stoica B.A., Cabatbat R., Faden A.I. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma:

- ma: association with chronic microglial activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2014;73(1):14–29. DOI: 10.1097/NEN.0000000000000021.
47. Schmidt O.I., Heyde C.E., Ertel W., Stahel P.F. Closed head injury-an inflammatory disease? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005;48(2):388–399. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.028.
48. Stoll G., Jander S., Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002;513:87–113. DOI: 10.1007/978-1-4615-0123-7_3.
49. Mondello S., Buki A., Italiano D., Jeromin A. α -Synuclein in CSF of patients with severe traumatic brain injury. *Neurology.* 2013;80(18):1662–1668. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182904d43.
50. Goldman S.M., Tanner C.M., Oakes D., Bhudhikanok G.S., Gupta A., Langston J.W. Head injury and Parkinson's disease risk in twins. *Ann. Neurol.* 2006;60(1):65–72. DOI: 10.1002/ana.20882.

Вклад авторов

Никитина М.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Алифорова В.М. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи. Брагина Е.Ю. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Бабушкина Н.П. – анализ и интерпретация данных. Гомбоева Д.Е. – обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания. Назаренко М.С. – разработка концепции и дизайна, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания.

Информация об авторах

Никитина Мария Анатольевна – канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск, nikitina_ma@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-2614-207X>

Алифорова Валентина Михайловна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск, v_alifirova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4140-3223>

Брагина Елена Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск, elena.bragina@medgenetics.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1103-3073>

Бабушкина Надежда Петровна – канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск, nad.babushkina@medgenetics.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6133-8986>

Гомбоева Дэнсэма Евгеньевна – ординатор, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск, Gombo-D@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7882-2093>

Назаренко Мария Сергеевна – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ; профессор кафедры медицинской генетики, СибГМУ, г. Томск, maria.nazarenko@medgenetics.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0673-4094>

(✉) **Никитина Мария Анатольевна**, nikitina_ma@mail.ru

Поступила в редакцию 15.09.2022;
одобрена после рецензирования 30.09.2022;
принята к публикации 03.10.2022

УДК 615.273.2:547.992

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-114-120>

Эффекты плазменной кислоты на ткани матки крыс *in vitro*

Салмин В.В.¹, Перевертов Т.А.¹, Мурадян Г.А.¹, Гудкова Е.С.², Эпова А.С.¹,
Кутяков В.А.^{1,3}, Лычковская Е.В.¹, Чекишева Т.Н.¹, Семичев Е.В.¹, Малиновская Н.А.¹,
Медведева Н.Н.¹, Макаренко Т.А.¹, Салмина А.Б.^{1,4}

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

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Россия, 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

³ Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы
Россия, 660049, г. Красноярск, пр. Мира, 35

⁴ Научный центр неврологии
Россия, 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, 80

РЕЗЮМЕ

Целью исследования является оценка влияния плазменной кислоты на ткани матки лабораторных животных *in vitro*.

Материалы и методы. Обработка раствора диметилсульфоксида в воде и воды для инъекций искровым разрядом в атмосфере приводила к снижению pH, что соответствовало формированию в растворах плазменной кислоты. Мы инкубировали ткани матки *in vitro* в плазменной кислоте при комнатной температуре в течение 30 мин. Обработанные ткани исследовались гистологически и иммуногистохимически.

Результаты. Нами показано, что плазменная кислота обладает выраженной биологической активностью. Иммуногистохимическим методом мы зарегистрировали, что, в зависимости от типа раствора, плазменная кислота изменяет в клетках формирование продуктов нитрозативного повреждения белков (3-NT) и окислительного повреждения ДНК (8-OHdG), модулирует количество клеток с высоким пролиферативным потенциалом (в том числе CD133+ клеток), продукцию сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), что соответствует суммарному цитотоксическому эффекту вида раствора плазменной кислоты.

Заключение. Плазменная кислота, приготовленная на основе воды и диметилсульфоксида, проявляет различные биологические эффекты в образцах ткани матки экспериментальных животных при 30-минутной экспозиции *in vitro*. Вода, обработанная плазмой, реализует цитотоксический потенциал, связанный с окислительным повреждением ДНК, а также способствует индукции проангиогенной активности в ткани. Диметилсульфоксид, обработанный плазмой, не вызывает цитотоксического действия, подавляет пролиферацию клеток, снижая популяцию CD133+ клеток, а также продукцию VEGF в ткани.

Ключевые слова: ткани матки, плазменная кислота, цитотоксичность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта ККФПНиНТД (договор № 1/20 от 15.05.2020).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено представителями биоэтической комиссии по работе с лабораторными животными при локальном этическом комитете и локальным этическим комитетом КрасГМУ.

Для цитирования: Салмин В.В., Перевертов Т.А., Мурадян Г.А., Гудкова Е.С., Эпова А.С., Кутяков В.А., Лычковская Е.В., Чекишева Т.Н., Семичев Е.В., Малиновская Н.А., Медведева Н.Н., Макаренко Т.А., Салмина А.Б. Эффекты плазменной кислоты на ткани матки крыс *in vitro*. Бюллетень сибирской медицины. 2022;21(4):114–120. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-114-120>.

Effects of plasma acid on rat uterine tissue *in vitro*

Salmin V.V.¹, Perevertov T.A.¹, Muradyan G.A.¹, Gudkova E.S.², Epova A.S.¹,
Kutyakov V.A.^{1,3}, Lychkovskaya E.V.¹, Chekischeva T.N.¹, Semichev E.V.¹,
Malinovskaya N.A.¹, Medvedeva N.N.¹, Makarenko T.A.¹, Salmina A.B.^{1,4}

¹ V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
1, Partizana Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

² St. Petersburg State Pediatric Medical University
2, Litovskaya Str., St. Petersburg, 194100, Russian Federation

³ Krasnoyarsk Regional Bureau of Forensic Medical Examination
25, Mira Av., Krasnoyarsk, 660049, Russian Federation

⁴ Scientific Center of Neurology
80, Volokolamskoe Highway, Moscow, 125367, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of plasma acid on the uterine tissue of laboratory animals *in vitro*.

Materials and methods. Treatment of dimethyl sulfoxide – water solution and water for injections with a spark discharge in air resulted in a decrease in pH, which contributed to generation of plasma acid in the solutions. We incubated uterine tissues *in vitro* in plasma acid at room temperature for 30 minutes. The treated tissues were examined histologically and immunohistochemically.

Results. We showed that plasma acid had pronounced biological activity. Immunohistochemistry was used to show that, depending on the type of a solution, plasma acid altered generation of nitrosative damage products (3-NT) and oxidative DNA damage (8-OHdG) and modulated the number of cells with high proliferative potential (including CD133⁺ cells) and production of vascular endothelial growth factor (VEGF). These effects contributed to the general cytotoxicity of plasma acid solutions.

Conclusion. During 30-minute exposure *in vitro*, plasma acid prepared from the dimethyl sulfoxide (DMSO) – water mixture exhibits various biological effects in uterine tissue samples obtained from experimental animals. Plasma-treated water exerts cytotoxic effects associated with oxidative DNA damage and promotes induction of pro-angiogenic activity in the uterine tissue. Plasma-treated DMSO does not have a cytotoxic effect. It inhibits cell proliferation, reducing the population of CD133⁺ cells and VEGF production in the tissue.

Keywords: uterine tissue, plasma acid, cytotoxicity

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

Source of financing. The study was supported by the grant of Krasnoyarsk regional foundation of scientific and scientific – technical support (agreement No. 1/20 of 15.05.2020).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the Bioethics Commission on the Use of Laboratory Animals at the local Ethics Committee and by the local Ethics Committee at V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University.

For citation: Salmin V.V., Perevertov T.A., Muradyan G.A., Gudkova E.S., Epova A.S., Kutyakov V.A., Lychkovskaya E.V., Chekischeva T.N., Semichev E.V., Malinovskaya N.A., Medvedeva N.N., Makarenko T.A., Salmina A.B. Effects of plasma acid on rat uterine tissue *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):114–120. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-114-120>.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрастает интерес к использованию газоразрядной плазмы при выполнении хирургического вмешательства в гинекологической практике. Лидирующим технологическим решением являются аргоноплазменные системы для коагуляции и абляции [1, 2]. Воздействие холодного воздушно-плазменного потока на завершающем этапе операции (непосредственно на область швов) при реконструктивно-пластических операциях на матке способствует улучшению репарации миометрия и, следовательно, формированию полноценного рубца [3]. Взаимодействие плазменной струи с воздухом, увлекаемым ламинарным потоком, создает повышенную концентрацию активных частиц, многие из которых, обладая хорошей растворимостью, повышают концентрацию активных форм кислорода и азота в ткани [4].

Для штатных режимов коагуляции и абляции нельзя исключать накопление тканями активных форм кислорода и азота и формированию так называемой плазменной кислоты, а при длительном воздействии – к существенному снижению pH [5, 6]. Значимое увеличение концентрации активных форм азота в медицинских плазменных установках достигается за счет замены аргона воздухом, применяемой в системе «Плазон» [7] или kINPen MED® [8]. Результаты оценки возможности использования аппарата «Плазон» при проведении операций на матке и ее придатках были продемонстрированы в работах [3, 9–13]. Однако молекулярно-клеточные процессы, происходящие в тканях матки под действием плазмы, не были изучены. Описано влияние плазменной кислоты на модификацию белков и липидов [6], но данные о влиянии на клетки репродуктивной системы, в том числе матки, в литературе отсутствуют. Это существенно затрудняет формирование научно-обоснованного представления о безопасности и эффективности использования плазменной кислоты в клинической практике.

Целью исследования является оценка влияния плазменной кислоты на ткани матки лабораторных животных *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на самках крыс линии Wistar возрастом 3 мес ($n = 16$), массой 180–200 г. Отбор самок осуществлялся в конце проэструса – начале эструса (путем осмотра раскрытия влагалища и оценки влагалищных мазков). Далее проводилось оперативное вмешательство, через 1 сут у животных после эвтаназии забирались матка. Образцы матки после обработки в плазменной кислоте фиксировали

в 4%-м растворе забуференного параформальдегида, после чего выполняли приготовление и нарезку срезов из парафиновых блоков.

Плазменная кислота получалась облучением 5 мл воды для инъекций или 50%-го водного раствора диметилсульфоксида (DMSO) искровым наносекундным разрядом в емкости 50 мл с негерметичной крышкой. Искровой разряд с длиной разрядного промежутка 20 мм создавался наносекундным высоковольтным генератором импульсов с энергией импульса 0,2 Дж и напряжением 40 кВ. При достижении pH = 2 обработка прекращалась. Приготовленный раствор использовался для инкубирования свежeweделенных тканей матки лабораторных крыс в течение 30 мин.

Оценку экспрессии DAPI, VEGF, CD133, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, 3-нитротирозина, Ki67 в ткани проводили согласно стандартным протоколам прямого и непрямого методов иммуногистохимии (иммунофлуоресцентный вариант). При увеличении 175 на флуоресцентном микроскопе ZOETM Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, США) производилось микрофотографирование 10 различных полей. Обработка цифровых фотографий производилась в программе ImageJ. Каждое поле разбивалось на девять фреймов, после чего выполнялась ручная сортировка с выбраковкой пустых полей за пределами ткани. Далее производилось автоматическое распознавание и подсчет меток с помощью плагина [14] в программе ImageJ.

Мы оценивали медианное значение экспрессии и межквартильный размах числа меток в одном фрейме $Me (Q_1; Q_3)$. Статистическая обработка полученных данных по анализу экспрессии молекул осуществлялась методом непараметрической статистики – сравнение нескольких независимых групп (Краскела – Уоллиса) с последующим использованием модуля «сравнения средних рангов для всех групп» для парного сравнения в пакете Statsoft Statistica 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по экспрессии применяемых маркеров приведены на диаграммах (рис.) и демонстрируют медианные значения с учетом межквартильного размаха в контрольной и двух экспериментальных группах с плазменной кислотой на различной основе (plasma DMSO, plasma water), использован метод Краскела – Уоллиса.

Анализ количества 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI)-окрашенных (DAPI+) клеток был использован нами для оценки влияния плазменной кислоты на выживаемость клеток в образце ткани при экспозиции в тестируемых растворах.

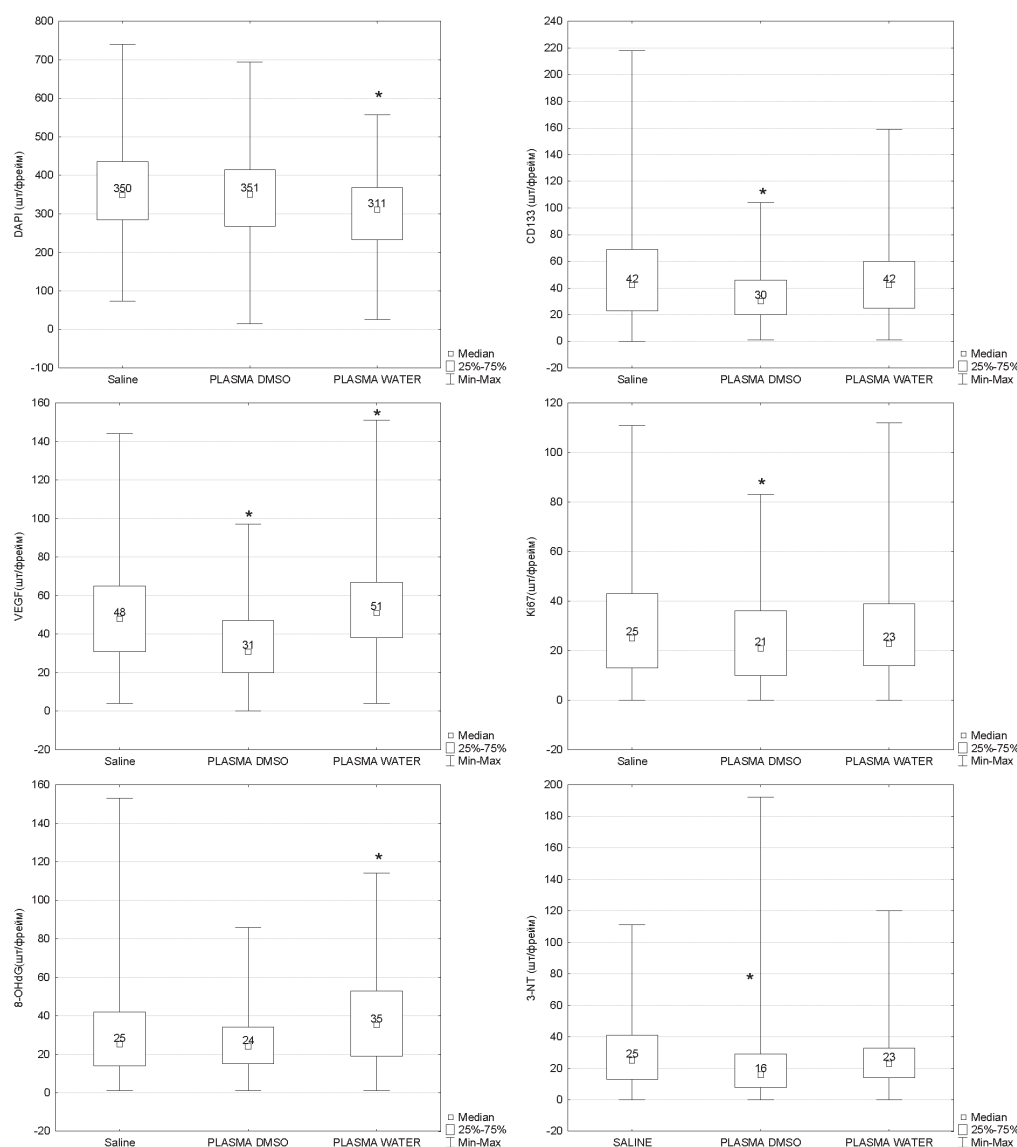


Рисунок. Результаты анализа количества DAPI+ клеток, экспрессии VEGF, Ki-67, CD133, 3-NT и 8-OHdG при инкубации образцов ткани матки крыс в растворах, обработанных плазмой искрового разряда, $Me (Q_1; Q_3)$: * – экспериментальные группы с $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; Plasma DMSO – 50%-й водный раствор, Plasma water – вода для инъекций) в сравнении с контролем (Saline – физиологический раствор)

Меньшее количество DAPI+ материала в образце ткани при этом расценивалось как результат гибели, отслоения и разрушения поврежденных клеток при экспозиции в тестируемых растворах. Мы обнаружили, что при применении обработанной плазмой воды медианное количество DAPI+ клеток значимо ниже $n_{DAPI+} = 311$ (233; 368) по сравнению с контрольной группой $n_{DAPI+} = 350$ (284; 435) ($z = 7,638$; $p < 0,001$), что доказывает наличие цитотоксического эффекта раствора. В образцах ткани, инкубированных в растворе DMSO, обработанном плазмой, медианное количество клеток $n_{DAPI+} = 351$ (267; 414) значимо не отличалось от контрольной группы ($z = 1,443$;

$p = 0,44$), поэтому цитотоксическую активность такого раствора следует считать недоказанной.

Мы зарегистрировали, что экспрессия 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) как маркера окислительного повреждения ДНК под действием воды, обработанной плазмой, значительно выше $n_{8-OHdG} = 35$ (19; 53) ($z = 5,98$; $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой $n_{8-OHdG} = 25$ (14; 42). При этом в группе образцов, инкубированных в обработанном плазмой растворе DMSO, уровень экспрессии $n_{8-OHdG} = 24$ (15; 34) значимо не отличался от контрольной группы ($z = 2,16$; $p = 0,09$). В образцах ткани, инкубированных в растворе DMSO, обработанном плазмой,

экспрессия в ткани 3-нитротирозина (3-NT), маркирующего нитрозативное повреждение белков, было значимо ниже $n_{3-NT} = 16$ (8; 29) ($z = 8,35$; $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой $n_{3-NT} = 25$ (13; 41), тогда как вода, обработанная плазмой, таким эффектом не обладала $n_{3-NT} = 23$ (14; 33) ($z = 1,64$; $p = 0,29$). Примечательно, что указанные эффекты DMSO сопровождались более низким пролиферативным потенциалом клеток, судя по характеру экспрессии в них белка Ki-67, $n_{Ki67} = 21$ (10; 36) ($z = 3,47$; $p = 0,0015$) по сравнению с контролем $n_{Ki67} = 25$ (13; 43), тогда как цитотоксическое действие воды, обработанной плазмой, не было ассоциировано со значимыми изменениями пролиферации клеток $n_{Ki67} = 23$ (14; 39) ($z = 1,18$; $p = 0,71$).

Насколько выявленные эффекты соответствуют ответу клеток с проангиогенным потенциалом в ткани? При обработке фрагментов стенки матки раствором DMSO, обработанным плазмой, отмечается значимо меньшее медианное количество клеток, экспрессирующих CD133 $n_{CD133} = 30$ (20; 46) ($z = 5,78$; $p < 0,001$), по сравнению с контролем $n_{CD133} = 42$ (23; 68). В группе образцов, обработанных водой, обработанной плазмой, $n_{CD133} = 42$ (25; 60), значимых различий не обнаружено ($z = 1,30$; $p = 0,57$). CD133 – маркер стволовых и прогениторных клеток в ткани. Уровень экспрессии VEGF характеризует проангиогенный потенциал ткани, а также может отражать степень гипоксического повреждения клеток. Мы установили, что медианное значение экспрессии VEGF в клетках эндометрия и стромы матки под действием DMSO, обработанного плазмой, значимо меньше, $n_{VEGF} = 31$ (20; 47) ($z = 8,13$; $p < 0,001$), тогда как при обработке водой, обработанной плазмой – больше, $n_{VEGF} = 51$ (38; 67) ($z = 3,36$; $p = 0,003$), по сравнению с контролем $n_{VEGF} = 48$ (31; 65).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы обнаружили, что DMSO, обработанный плазмой, не оказывает выраженного цитотоксического действия, не индуцирует окислительного повреждения ДНК или нитрозативного повреждения клеточных белков, однако уменьшает пролиферативный потенциал (в том числе CD133+ клеток) и подавляет экспрессию VEGF, тем самым препятствуя пролиферативным и проангиогенным событиям в ткани. Напротив, вода, обработанная плазмой, демонстрирует выраженный цитотоксический эффект, обусловленный индукцией окислительного повреждения ДНК, индуцирует экспрессию VEGF в ткани. В целом это свидетельствует о том, что цитотоксическая активность воды, обработанной плазмой, в большей степени определяется действием активных форм

кислорода, но не азота. Интересно, что DMSO, обработанный плазмой, препятствует развитию физиологически обусловленного нитрозативного повреждения клеточных белков. Такие различия в эффектах растворов, вероятно, обусловлены их физико-химическими свойствами, определяющими способность к проникновению через клеточные мембраны и(или) «тушению» активных форм кислорода и азота в растворе.

CD133 (проминин) является маркером стволовых клеток, присутствующих в различных тканях, а также может регистрироваться в зрелых дифференцированных клетках. Считается, что его экспрессия высока в эндометрии [15, 16]. Известно, что снижение экспрессии CD133 является следствием увеличения активности белка mTOR (который, в свою очередь, активируется при окислительном стрессе) [17]. Однако снижение количества CD133+ клеток при действии DMSO, обработанного плазмой, не может быть вызвано окислительным стрессом (с учетом отсутствия признаков окислительного повреждения ДНК или общей цитотоксичности), а, вероятнее всего, ассоциировано со снижением экспрессии VEGF, так как известно, что CD133+ клетки весьма чувствительны к эффектам этого фактора роста в различных тканях, причем CD133 может контролировать секрецию VEGF [18]. Известно, что мощными триггерами экспрессии VEGF являются гипоксия [19] и окислительный стресс [20]. Повышенная экспрессия VEGF регистрируется при эндометриозе [21]. Помимо стимуляции ангиогенеза, VEGF в mTOR-зависимом режиме активирует в клетках программу митохондриального биогенеза, что является ответом на недостаточную активность митохондрий вследствие дефицита кислорода, повреждения митохондрий или формирование повышенного запроса клеток на образование АТФ [22]. Логично предположить, что увеличение экспрессии VEGF в клетках при действии воды, обработанной плазмой, связано с развитием в ткани митохондриальной дисфункции, окислительного стресса и гипоксии. Действительно, вода, обработанная плазмой, вызывала цитотоксический эффект, сопровождающийся формированием 8-OHdG, поэтому увеличение под ее действием экспрессии VEGF логично и ожидаемо.

Два тестируемых раствора по-разному влияли на пролиферативный статус клеток: вода, обработанная плазмой, не оказывала значимого эффекта, но DMSO, обработанный плазмой, тормозил экспрессию Ki-67 в образцах ткани. Этот эффект мог бы быть связан с преимущественной гибелью активно пролиферирующих клеток при действии DMSO, обработанного плазмой. Однако с учетом того,

что DMSO в целом не проявлял цитотоксического эффекта, мы можем предположить, что снижение количества Ki-67+ клеток в ткани сопряжено с уменьшением числа CD133+ клеток и подавлением экспрессии VEGF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плазменная кислота, приготовленная на основе воды и диметилсульфоксида, проявляет различные биологические эффекты в образцах ткани матки экспериментальных животных при 30-минутной экспозиции *in vitro*. Вода, обработанная плазмой, реализует цитотоксический потенциал, связанный с окислительным повреждением ДНК, а также способствует индукции проангиогенной активности в ткани. Диметилсульфоксид, обработанный плазмой, не вызывает цитотоксического действия, подавляет пролиферацию клеток, снижая популяцию CD133+ клеток, а также продукцию VEGF в ткани. Растворы плазменной кислоты могут рассматриваться как перспективная фармакологическая форма для локального применения при гинекологической патологии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Bafort C., Beebejaun Y., Tomassetti C., Bosteels J., Duffy J. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020;(10):CD011031. DOI: 10.1002/14651858.CD011031.pub2.
- Grund K.E., Storek D., Farin G. Endoscopic argon plasma coagulation (APC) first clinical experiences in flexible endoscopy. *Endoscopic Surgery and Allied Technologies*. 1994;2(1):42–46.
- Давыдов А.И., Чакветадзе Л., Клиндухов И.А., Бахтияров К.Р., Вороной С.В. Оценка морфологической структуры миометрия и миомы матки после контактного воздействия воздушно-плазменного потока: Материалы I Всероссийской конференции «Проблемы женского здоровья и пути их разрешения». М.: 2007:17–18.
- Оловяникова Р., Макаренко Т., Лычковская Е., Гудкова Е., Мурадян Г., Медведева Н. и др. Химические механизмы действия холодной плазмы на клетки. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020;5(4):104–116. DOI: 10.23946/2500-0764-2020-5-4-104-115.
- Иванова И., Трофимова С., Аристов Н., Архипова Е., Бурхина О., Сысоева В. и др. Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках. *Современные технологии в медицине*. 2012;(2):20–30.
- Иванова И., Трофимова С., Пискарев И., Ичеткина А., Бурхина О., Сысоева В. Влияние излучения плазмы искрового разряда на модификацию белков и липидов. *Фундаментальные исследования*. 2013;3(1):572–575.
- Achkasov E., Esipov A., Pekshev A., Musailov V. Use of an exogenous nitric oxide generator for treatment of peritonitis. *Biomedical Engineering*. 2018;52(1):64–67. DOI: 10.1007/s10527-018-9783-2.
- Schönebeck R. *kINPen MED®. Comprehensive Clinical Plasma Medicine*: Springer; 2018:485–494.
- Давыдов А., Стрижаков А., Пекшев А., Кучухидзе С., Клиндухов И. Возможности и перспективы плазменной эндохирургии с генерацией монооксида азота при операциях на матке и ее придатках. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2002;1(2):57–60.
- Давыдов А., Стрижаков А., Чакветадзе Л., Шехтер А., Пекшев А., Клиндухов И. Клинико-морфологический анализ влияния на ткани матки и яичников плазматронов нового поколения при лапароскопических операциях. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2007;6(5):5–10.
- Давыдов А.И., Белоцерковцева Л.Д. Диагностика и лечение доброкачественных заболеваний шейки матки. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2012;11(6):74–81.
- Давыдов А.И., Кучухидзе С., Шехтер А., Ханин А., Пекшев А., Панкратов В. Клиническая оценка интраоперационного применения воздушно-плазменного потока, обогащенного монооксидом азота, при операциях на матке и ее придатках. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2004;3(4):12–17.
- Давыдов А.И., Шахламова М.Н., Чабан О.В., Пирогова М.Н. Высокие хирургические энергии в оперативной гинекологии. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2013;12(5):75–85.
- Салмин В.В., Салмина А.Б., Моргун А.В. Плагин для программы ImageJ для подсчета флуоресцентных меток на микрофотографиях: RU 2020612777. 2020.
- Friel A.M., Zhang L., Curley M.D., Therrien V.A., Sergeant P.A., Belden S.E. et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010;8(1):147. DOI: 10.1186/1477-7827-8-147.
- Sun Y., Yoshida T., Okabe M., Zhou K., Wang F., Soko C. et al. Isolation of stem-like cancer cells in primary endometrial cancer using cell surface markers CD133 and CXCR4. *Translational Oncology*. 2017;10(6):976–987. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.07.007.
- Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Experimental Hematology & Oncology*. 2013;2(1):17. DOI: 10.1186/2162-3619-2-17.
- Qiu Y., Chen C., Zhang J., Chen M., Gong H., Gong L. et al. VEGF attenuates lung injury by inducing homing of CD133+ progenitors via VEGFR1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;511(3):650–657. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.02.071.
- Sharkey A.M., Day K., McPherson A., Malik S., Licence D., Smith S.K. et al. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85(1):402–409. DOI: 10.1210/jcem.85.1.6229.
- Kim Y.-W., Byzova T.V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 2014;123(5):625–631. DOI: 10.1182/blood-2013-09-512749.
- Ren Q.Z., Qian Z.H., Jia S.H., Xu Z.Z. Vascular endothelial growth factor expression up-regulated by endometrial ischemia in secretory phase plays an important role in endome-

- triosis. *Fertil. Steril.* 2011;95(8):2687–2689. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.001.
22. Guo D., Wang Q., Li C., Wang Y., Chen X. VEGF stimulated

the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions. *Oncotarget.* 2017;8(44):77020–77027. DOI: 10.18632/oncotarget.20331.

Благодарности

Работа была выполнена с использованием ресурсной базы ЦКП МКТ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Вклад авторов

Салмин В.В., Макаренко Т.А., Салмина А.Б. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Перевертов Т.А., Мурадян Г.А., Гудкова Е.С., Эпова А.С., Кутяков В.А., Лычковская Е.В., Чекишева Т.Н., Семичев Е.В., Малиновская Н.А., Медведева Н.Н. – выполнение экспериментов.

Информация об авторах

Салмин Владимир Валерьевич – д-р физ.-мат. наук, доцент, зав. кафедрой медицинской и биологической физики, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, vsalmin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4441-9025>

Перевертов Тимофей Андреевич – студент, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, dmchernov26@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6280-9233>

Мурадян Гоар Амадуновна – лаборант, лаборатория медицинской кибернетики и управления в здравоохранении, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, muradyan.goar1@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5656-4636>

Гудкова Елизавета Сергеевна – врач-ординатор, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, г. Санкт-Петербург, miss.gudcova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7540-4144>

Эпова Анна Сергеевна – аспирант, кафедра оперативной гинекологии ИПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, annaepova23@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9969-9808>

Кутяков Виктор Андреевич – канд. биол. наук, эксперт, Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы; доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, victor-koutjakov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7814-4176>

Лычковская Елена Викторовна – ст. преподаватель, кафедра биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, lychk-elena@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4017-1125>

Чекишева Татьяна Николаевна – ассистент, кафедра анатомии человека, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, maks726@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6905-980X>

Семичев Евгений Васильевич – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, evsemichev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2386-5798>

Малиновская Наталия Александровна – д-р мед. наук, зав. кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, malinovskaya-na@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0033-3804>

Медведева Надежда Николаевна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анатомии человека, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, medvenad@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7757-6628>

Макаренко Татьяна Александровна – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой оперативной гинекологии ИПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, makarenko7777@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2899-8103>

Салмина Алла Борисовна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, руководитель лаборатории экспериментальной нейробиологии, отдел исследований мозга, Научный центр неврологии, г. Москва; гл. науч. сотрудник, НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, allasalmina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>

(✉) Салмин Владимир Валерьевич, vsalmin@gmail.com

Поступила в редакцию 01.11.2021;
одобрена после рецензирования 07.03.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616.153.96:616.132.2-004.6]-071
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-121-129>

Изучение ассоциаций белков в крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях методом количественной протеомики

Стахнёва Е.М.¹, Каштанова Е.В.¹, Полонская Я.В.¹, Стрюкова Е.В.¹, Шрамко В.С.¹, Садовский Е.В.¹, Кургузов А.В.², Мурашов И.С.², Чернявский А.М.², Рагино Ю.И.¹

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН)
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

² Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) им. акад. Е.Н. Мешалкина
Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение ассоциаций белков крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в артериях у пациентов с коронарным атеросклерозом с использованием количественного протеомного анализа.

Материалы и методы. В исследование участвовали пациенты с ишемической болезнью сердца и коронарным атеросклерозом ($n = 40$), средний возраст пациентов 58 ± 7 лет. Материал исследования – сыворотка крови. Концентрации белков в образцах сыворотки определяли с помощью набора PeptiQuant Plus Proteomics Kit (Cambridge Isotope Laboratories, США). Идентификацию белковых фракций осуществляли методом мониторинга множественных реакций на масс-спектрометре Q-TRAP 6500, комбинированном с жидкостным хроматографом.

Результаты. Масс-спектрометрическая идентификация выявила в образцах сыворотки крови у пациентов с нестабильными атеросклеротическими бляшками повышенную концентрацию белков: фибриноген, фибулин-1 и фактор комплемента Н. При одновременном сниженном уровне белков: витронектин, α -2-анти-плазмин, кофактор гепарина 2, коагуляционный фактор XII, плазминоген и протромбин, белки комплемента (C1, C3, C7, C9) и фактор комплемента В. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Выявлено, что нестабильность атеросклеротических бляшек ассоциирована с концентрацией фибулина-1 ($\text{Exp}(B) = 1,008$; $p = 0,05$), плазминогена ($\text{Exp}(B) = 0,995$; $p = 0,027$) и коагуляционного фактора X ($\text{Exp}(B) = 0,973$; $p = 0,037$).

Заключение. Повышенная концентрация фибулина-1 в крови может рассматриваться как потенциальный биомаркер нестабильности атеросклеротических бляшек при коронарном атеросклерозе. Возможность использования исследованных белков как биомаркеров нестабильности атеросклеротических бляшек при коронарном атеросклерозе требует дальнейших исследований их потенциальной роли в развитии данного заболевания.

Ключевые слова: протеомный анализ, масс-спектрометрия, коронарный атеросклероз

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках бюджетной темы по Государственному заданию № 122031700094-5 и в рамках гранта РНФ №. 21-15-00022.

Соответствие принципам этики. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН (протокол № 7 от 26.09.2017).

Для цитирования: Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Стрюкова Е.В., Шрамко В.С., Садовский Е.В., Кургузов А.В., Мурашов И.С., Чернявский А.М., Рагино Ю.И. Изучение ассоциаций белков в крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях методом количественной протеомики. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):121–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-121-129>.

Study of associations of blood proteins with development of unstable atherosclerotic plaques in coronary arteries by quantitative proteomics

Stakhneva E.M.¹, Kashtanova E.V.¹, Polonskaya Ya.V.¹, Striukova E.V.¹, Shramko V.S.¹, Sadovski E.V.¹, Kurguzov A.V.², Murashov I.S.², Chernyavskii A.M.², Ragino Yu.I.¹

¹ Research Institute 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 Meshalkin National Medical Research Center
15, Rechkunovskaya Str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the associations of blood proteins with the presence of unstable atherosclerotic plaques in the arteries in patients with coronary artery disease using the quantitative proteomic analysis.

Materials and methods. The study included patients with coronary artery disease ($n = 40$); the average age of patients was 58 ± 7 years. Material for the study was blood serum. Protein concentrations in serum samples were determined using the PeptiQuant Plus Proteomics Kit (Cambridge Isotope Laboratories, USA). Protein fractions were identified using the liquid chromatograph and tandem mass spectrometer Q-TRAP 6500.

Results. Mass spectrometry revealed an increased concentration of proteins, such as fibrinogen, fibulin-1, and complement factor H, in the serum samples of patients with unstable atherosclerotic plaques. It took place with a simultaneous decrease in the levels of α 2-antiplasmin, heparin cofactor II, coagulation factor XII, plasminogen, prothrombin, vitronectin, complement proteins (C1, C3, C7, C9), and complement factor B. The differences were considered significant at $p < 0.05$. It was revealed that the presence of unstable atherosclerotic plaques was associated with the level of fibulin-1 ($\text{Exp(B)} = 1.008$; $p = 0.05$), plasminogen ($\text{Exp(B)} = 0.995$; $p = 0.027$), and coagulation factor X ($\text{Exp(B)} = 0.973$; $p = 0.037$).

Conclusion. An increased concentration of fibulin-1 can be considered as a potential biomarker of unstable atherosclerotic plaque development in coronary artery disease. The possibility of using the studied proteins as biomarkers of unstable atherosclerotic plaques requires further studies on their potential role in the development of this disease.

Keywords: proteomic analysis, mass spectrometry, coronary artery disease

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

Source of financing. The study was carried out within the budgetary topic of the state assignment No.122031700094-5 and within the grant of the Russian Science Foundation No. 21-15-00022.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at the Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics (Protocol No. 7 of 26.09.2017).

For citation: Stakhneva E.M., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Striukova E.V., Shramko V.S., Sadovski E.V., Kurguzov A.V., Murashov I.S., Chernyavskii A.M., Ragino Yu.I. Study of associations of blood proteins with development of unstable atherosclerotic plaques in coronary arteries by quantitative proteomics. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):121–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-121-129>.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области этиологии и патогенеза коронарного атеросклероза, которые определяют осложнения коронарного атеросклероза, в настоящее время актуальны из-за высокой распространенности и смертности от этого заболевания. Атеросклероз, основа сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), включает в себя ряд патологических процессов: эндотелиальную дисфункцию, обширное отложение липидов в интимае, обострение врожденных и адаптивных иммунных реакций, пролиферацию гладкомышечных клеток и ремоделирования внеклеточного матрикса, в итоге приводящих к образованию атеросклеротической бляшки (АБ).

Дестабилизация АБ усугубляет патологический атеросклеротический процесс, приводя к развитию осложнений ССЗ. Состав бляшки и наличие внутреннего кровоизлияния в атеросклеротической бляшке являются независимым фактором риска развития инсульта и ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. Генетически обусловленное ингибирование α -, β - и γ -цепей фибриногена, фактора II и фактора XI связано со снижением риска венозной тромбоэмболии ($p < 0,001$), а ингибирование β - и γ -фибриногена – со снижением риска инсульта в крупных артериях ($p = 0,001$) [2]. Различные биомеханические и гемодинамические факторы способствуют дестабилизации АБ. Неповрежденный эндотелий сосудов обладает тромборезистентностью, а поврежденный эндотелий формирует мощную прокоагулянтную активность. Гемостаз осуществляется клетками крови и плазменной ферментной системой, представленной тесно взаимодействующими белковыми компонентами. Чтобы изучить участие различных белков в патогенезе коронарного атеросклероза, необходимо исследовать специфический вклад белков с про- или антикоагуляционной активностью в развитие нестабильности атеросклеротических поражений в коронарных артериях.

Накопление знаний о патогенезе коронарного атеросклероза и его осложнений вместе с развитием современных методов исследования вносит вклад в поиск белков – потенциальных прогностических и диагностических биомаркеров ССЗ. Количественный протеомный анализ, используемый для идентификации и количественного определения биологических молекул на основе масс-спектрометрии с тандемными химическими метками, является полезным методом в точном количественном одновременном определении белков в различных биологических образцах. Несмотря на то, что количество изучаемых белков-кандидатов постоянно растет, не всегда до

конца ясна их роль в патогенезе коронарного атеросклероза. Понимание изменений белковой составляющей крови при атеросклерозе поможет выявить новые биомаркеры для лучшего понимания условий развития осложнений данного заболевания.

Цель данного исследования – изучение ассоциаций некоторых белков крови с наличием нестабильных АБ в артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом с помощью количественного протеомного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты с ИБС и коронарным атеросклерозом, поступившие на операцию коронарного шунтирования, которым в ходе операции по интраоперационным показаниям была проведена эндартерэктомия из коронарных артерий. Критерии исключения: инфаркт миокарда менее 6 мес, острые хронические инфекционно-воспалительные заболевания или их обострение, почечная недостаточность, активные заболевания печени, рак, гиперпаратиреоз. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Материал исследования – образцы сыворотки крови. У всех пациентов кровь забирали из локтевой вены утром натощак. Для количественного протеомного анализа были отобраны образцы сыворотки крови 40 мужчин, которые были поделены на две группы по 20 пациентов в каждой. Первую группу составили пациенты (средний возраст 58 ± 4 лет), у которых, по данным гистологического анализа, были только стабильные АБ. Вторую группу составили пациенты (средний возраст 57 ± 10 лет), у которых, по данным гистологического анализа, в образцах крови были только нестабильные АБ. Определение концентрации белков в образцах сыворотки крови проводили с помощью набора PeptiQuant Plus Proteomics Kit (Cambridge Isotope Laboratories, США) по методике производителя с некоторыми модификациями.

Для проведения трипсинолиза в растворе к 10 мкл образца сыворотки крови добавляли 20 мкл раствора, содержащего 9 М мочевины, 20 мМ дитиотреитола, 300 мМ Трис-НСl (рН 8,0). В отдельную пробирку вносили 10 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), используемого в дальнейшем в качестве раствора матрицы для точек калибровки. Образцы инкубировали 30 мин при 37 °С. Во все пробирки вносили по 20 мкл раствора 100 мМ йодацетамида. Инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Добавляли 272 мкл 100 мМ Трис-НСl

(рН 8,0) и 35 мкл раствора трипсина. Инкубировали 18 ч при 37 °С. Протеолиз останавливали внесением 343 мкл 2%-й муравьиной кислоты.

Смесь легких (немеченых) пептидов разводили в 60 мкл раствора 30%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты. Готовили серию разведений для калибровки по схеме. Смесь пептидов, меченых тяжелыми стабильными изотопами, разводили в 450 мкл 30%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты и использовали в качестве внутреннего стандарта.

В пробирки вносили по 40 мкл образцов сыворотки после трипсинолиза и по 40 мкл раствора БСА после трипсинолиза. Во все пробирки вносили по 10 мкл раствора меченых пептидов. В пробирки с БСА добавляли по 10 мкл соответствующего разведения стандартов для калибровочной кривой. В пробирки с образцами сыворотки вносили по 10 мкл раствора 30%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты. Во все пробирки добавляли по 540 мкл 0,1%-й муравьиной кислоты.

Очистку образцов проводили на картриджах для твердофазной экстракции Oasis HLB (Waters, США), 10 мг. Картриджи активировали 600 мкл метанола и уравнивали 600 мкл 0,1%-й муравьиной кислоты. Вносили по 510 мкл образца, промывали 600 мкл воды 3 раза. Пептиды элюировали 300 мкл раствора 50%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты. Полученные образцы замораживали при –80 °С и высушивали с помощью лиофильной сушки FreeZone 2.5 (Labconco, США). Сухие осадки разводили в 34 мкл 0,1%-й муравьиной кислоты и использовали для анализа.

Детекцию пептидов осуществляли методом мониторинга множественных реакций (MRM – Multiple Reaction Monitoring) на масс-спектрометре Q-TRAP 6500 (AB Sciex, США), комбинированном с жидкостным хроматографом Infinity 1290 (Agilent, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке Titan C18, 1,9 мкм (Supelco, США) в несколько этапов. Скорость потока – 0,4 мл/мин, температура разделения – 45 °С.

Детектировали положительно заряженные ионы, полученные с помощью ионизации электроспреем в источнике Turbo Spray IonDrive. Построение калибровочных кривых и определение концентрации белков осуществляли в программе MultiQuant 3.0.2 (AB Sciex, США) по площади пиков MRM-переходов, специфичных для каждого исследованного пептида.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SPSS 20.0 для Windows. Статистический анализ включал тест на нормальность распределения признаков Колмогорова – Смирнова, сравнительный анализ по Манну – Уитни. Возраст пациентов приведен в виде средних

значений и стандартного квадратичного отклонения переменных ($M \pm \sigma$). Результаты в таблице приведены в виде медианы, интерквартильного размаха $Me [Q_{25}; Q_{75}]$. С целью поиска ассоциаций был проведен многофакторный логистический регрессионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Протеомное профилирование образцов сыворотки крови проводили с помощью набора PeptiQuant Plus Proteomics Kit. Всего было идентифицировано 125 белков. Идентификацию белков осуществляли методом мониторинга множественных реакций на тройном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения с ионизацией электроспреем, комбинированном с высокоэффективным жидкостным хроматографом.

Анализ дифференциальной экспрессии белка был проведен по двум техническим повторам каждого образца. В результате сравнительного анализа были выделены белки, концентрация которых статистически значимо различалась в исследуемых группах ($p < 0,05$).

Один из основных белков свертывающей системы крови, фибриноген, значительно отличался в исследуемых группах. В группе пациентов с нестабильными бляшками концентрация каждой из двух изоформ фибриногена (chain α и chain γ) была в 1,8 и 2,5 раза выше (таблица). При этом уровень связанного с фибриногеном и участвующего в образовании сгустка фибулина был также выше в группе пациентов с нестабильными бляшками. Кроме того, многофакторный логистический анализ показал, что нестабильность атеросклеротических бляшек ассоциирована с концентрацией фибулина-1 ($\text{Exp}(B) = 1,008$; 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1,000–1,015; $p = 0,05$).

В нашем исследовании уровень главного компонента фибринолитической системы плазминогена был выше в группе пациентов со стабильными бляшками ($p < 0,05$). Также многофакторный логистический анализ показал, что нестабильность атеросклеротических бляшек отрицательно ассоциирована с концентрацией плазминогена ($\text{Exp}(B) = 0,995$; 95%-й ДИ 0,990–0,999; $p = 0,027$), кофактором гепарина 2 ($\text{Exp}(B) = 0,999$; 95%-й ДИ 0,998–1,000; $p = 0,010$) и коагуляционным фактором X ($\text{Exp}(B) = 0,973$; 95%-й ДИ 0,949–0,998; $p = 0,037$). Фибринолитическая активность крови зависит также от ингибиторов фибринолиза. Концентрация ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) на 13% была выше в группе пациентов со стабильными бляшками, но уровня статистической значимости не достигала ($p = 0,102$).

Таблица

Количественная масс-спектрометрическая идентификация белков в крови, Me [Q_{25} ; Q_{75}]			
Название белка	Концентрация белка, fmol/ μ l		p
	Группа 1	Группа 2	
Фибриноген, chain α	143,5 [139,4;147,7]	254,4 [243,6;284,9]	0,006
Фибриноген, chain γ	45,9 [40,9;52,1]	120,9 [45,4;165,8]	0,005
Фибулин-1	663,9 [576,1;748,6]	735,2 [600,4;796,0]	0,038
Фибронектин	429,6 [234,0;522,5]	256,2 [197,9;402,3]	0,161
Тромбоспондин-1	75,0 [63,0;95,2]	75,1 [53,8;89,8]	0,419
Витронектин	2839,5 [2166,2;3362,2]	2151,0 [1654,0;2878,0]	0,005
α -2-антиплазмин	522,2 [427,2;649,4]	472,2 [323,4;599,2]	0,034
α -2-макроглобулин	4885,0 [4342,5;5345,5]	4714,5 [3324,5;5868,2]	0,376
Антитромбин III	3880,0 [2460,75;4845,75]	3272,5 [3017,5;4291,0]	0,844
Кофактор гепарина 2	4274,5 [4057,7;4577,5]	3803,0 [3055,0;4233,0]	0,0001
Коагуляционный фактор IX	87,8 [67,7;107,9]	74,1 [48,2;124,0]	0,166
Коагуляционный фактор X	136,0 [107,5;142,4]	105,3 [92,3;123,3]	0,065
Коагуляционный фактор XII	419,4 [294,9;525,0]	291,1 [265,8;380,6]	0,0001
Кининоген-1	178,3 [162,5;205,7]	175,5 [154,9;192,1]	0,346
Компонент комплемента C1q, subunit B	67,1 [53,3;95,9]	68,5 [57,2;80,2]	0,538
Компонент комплемента C1q, subunit C	106,2 [93,8;143,3]	112,1 [92,4;146,5]	0,939
Компонент комплемента C1r	251,2 [169,7;273,6]	194,0 [164,2;242,5]	0,106
Компонент комплемента C1s	47,4 [42,8;54,0]	43,8 [34,0;74,8]	0,729
Компонент комплемента C3	586,8 [469,1;717,1]	471,8 [408,7;572,0]	0,008
Компонент комплемента C7	75,9 [56,4;82,0]	60,4 [54,2;74,9]	0,006
Компонент комплемента C9	191,3 [113,9;212,5]	137,7 [75,4;185,5]	0,026
Фактор комплемента В	4985,0 [3585,0;6251,2]	3980,5 [3698,0;4358,7]	0,017
Фактор комплемента Н	526,4 [463,3;587,8]	581,4 [531,9;626,6]	0,018
Ингибитор протеазы плазмы C1	2037,0 [1565,0;2294,0]	1651,5 [1092,0;2234,7]	0,041
Ингибитор сериновой протеазы плазмы	51,4 [48,2;62,1]	49,4 [46,5;74,6]	0,769
Ингибитор активатора плазминогена-1	27,6 [21,1;36,4]	24,1 [19,2;32,1]	0,102
Плазминоген	933,1 [833,2;1050,5]	803,5 [695,6;879,2]	0,001
Протромбин	902,2 [711,1;1044,2]	788,4 [718,7;821,1]	0,047

Кроме того, у пациентов со стабильными бляшками концентрация белков, первичных антикоагулянтов (α -2-антиплазмин, α -2-макроглобулин, кофактор гепарина 2), была значительно выше (см. таблицу). При этом содержание в крови антикоагулянта антитромбина III было выше у пациентов с нестабильными бляшками. Антитромбин III является универсальным ингибитором тромбина и почти всех факторов свертывания, что подтверждается нашим исследованием, уровень коагуляционных факторов IX, X и XII ниже у пациентов группы 2.

При этом уровень коагуляционного фактора XII в группе пациентов со стабильными бляшками был достоверно выше. Высокоактивированный фактор XII в комплексе с кининогеном обуславливает внутреннюю активацию фибринолиза. В нашем исследовании уровень кининогена был выше в группе пациентов со стабильными бляшками, но уровня статистической значимости не достигал.

Существует взаимосвязь между механизмами образования тромбов и иммунной активацией. В

нашем исследовании значимой разницы между субкомпонентами C1 (C1q; C1r; C1s) в исследуемых группах не обнаружено (см. таблицу). Но суммарно содержание компонента комплемента C1 было выше в группе пациентов со стабильными АБ, чем с нестабильными АБ, и составила 471,37 fmol/ μ l против 446,48 fmol/ μ l ($p < 0,0001$). Содержание компонентов комплемента C3, C7, C9 и фактора комплемента В было выше в группе пациентов со стабильными АБ ($p < 0,05$). А уровень фактора комплемента Н, принимающего участие в инактивации C3b, был выше на 10% в группе пациентов с нестабильными АБ (см. таблицу).

Фибронектин, тромбоспондин и витронектин также участвуют в каскаде коагуляции, способствуя адгезии тромбоцитов. В нашем исследовании значимой разницы в содержании фибронектина и тромбоспондина между исследуемыми группами не обнаружено. А концентрация витронектина была значительно выше у пациентов со стабильными бляшками ($p = 0,005$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс атеросклероза неразрывно связан с воспалением и эндотелиальной дисфункцией сосудов. Неповрежденный эндотелий сосудов обладает тромборезистентностью, а поврежденный эндотелий — значительными прокоагулянтными свойствами.

В нашем исследовании уровень фибриногена и связанного с ним фибулина-1 значительно отличался в исследуемых группах. Концентрация каждой из двух изоформ фибриногена (chain α и chain γ) и фибулина-1 была выше в группе пациентов с нестабильными бляшками. Многофакторный логистический анализ показал, что нестабильность АБ ассоциирована с концентрацией фибулина-1. Ранее нами было установлено, что максимальное количество фибриногена было в ткани стабильных фиброзных АБ, а в нестабильных АБ уровень белка был значительно ниже [3]. Таким образом, мы предполагаем, что высокая концентрация фибриногена и фибулина-1 может быть перспективными биомаркерами нестабильности АБ в крови пациентов с коронарным атеросклерозом.

Белки фибронектин, тромбоспондин и витронектин участвуют в каскаде коагуляции. Показано, что активация тромбоцитов приводит к локальному высвобождению фибриногена, фибронектина, vWF, тромбоспондина, витронектина и факторов свертывания, способствуя адгезии тромбоцитов и усилению коагуляции [4]. В нашем исследовании значимой разницы в содержании фибронектина и тромбоспондина между исследуемыми группами не обнаружено.

Витронектин является основным гликопротеином клеточной адгезии, содержащимся в плазме и внеклеточном матриксе. Повышенная экспрессия витронектина может способствовать развитию хронических сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, играя важную роль в гомеостазе сосудов и патологическом ремоделировании сосудов. Ингибитор активатора плазминогена (РАI-1) стимулировал экспрессию витронектина путем связывания белка-1, ассоциированного с рецептором липопротеинов низкой плотности. Концентрация витронектина в плазме крови была значительно снижена у мышей с дефицитом РАI-1 по сравнению с контролем [5]. Витронектин, связываясь с РАI-1, принимает участие в активации фибринолиза. При атеросклерозе сонных артерий показано, что уровень РАI-1 в плазме крови был снижен в группе пациентов по сравнению с контролем. При этом уровень РАI-1 положительно коррелировал с уровнем витронектина в группе пациентов с атеросклерозом, возможно, из-за повышения фибринолитической активности и прогресси-

рования заболевания за счет усиления сосудистого ремоделирования [6]. Уровень витронектина в крови у пациентов с ИБС значительно выше, чем в контрольной группе. Предположительно, витронектин является маркером ИБС [7]. В нашем исследовании концентрация витронектина в крови была значительно выше у пациентов со стабильными бляшками.

Ранее в проспективном когортном исследовании было установлено, что высокие уровни факторов IX и XI и α -2-антиплазмина были связаны с повышенным риском ИБС и не зависели от других факторов коронарного риска [8]. Показаны корреляционные связи между уровнем фактора XII в крови и наличием уязвимых атеросклеротических бляшек в коронарных артериях [9].

В нашем исследовании у пациентов со стабильными бляшками концентрации белков α -2-антиплазмина, α -2-макроглобулина, кофактора гепарина 2, коагуляционного фактора XII были значительно выше, чем во второй группе. Антитромбин III (АТ-III) является универсальным ингибитором тромбина и почти всех факторов свертывания, но в нашем исследовании концентрация в крови АТ-III была выше у пациентов с нестабильными бляшками, хотя уровня статистической значимости не достигнуто.

Уровень коагуляционных факторов IX, X и XII был ниже у пациентов 2-й группы. При этом логистический регрессионный анализ показал, что нестабильность АБ имеет отрицательную связь с концентрацией коагуляционного фактора X, кофактора гепарина 2 и плазминогена.

Ранее было показано, что уровень АТ-III был снижен в подгруппе высокого риска острого коронарного синдрома (ОКС) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Модель логистической регрессии продемонстрировала, что АТ-III был защитным фактором ($OR = 0,958$; $p = 0,012$) для ОКС. Уровень АТ-III продемонстрировал прогностические значения у пациентов с ОКС и был связан с тяжестью стеноза коронарной артерии [10]. В то же время сниженный уровень АТ-III не является независимым фактором риска развития инфаркта миокарда [11].

Высокоактивированный фактор XII в комплексе с кининогеном обуславливает внутреннюю активацию фибринолиза. Кининоген является предшественником брадикинина и каллидина, белков, вызывающих вазодилатацию и сокращение гладких мышц. Кроме того, что кинины известны своей способностью к индукции оксида азота и простаглицлина, которые опосредуют кардиопротекцию, брадикинин способствует воспалению, фиброплазии и фиброзу после инфаркта миокарда у крыс [12]. Таким образом, кининоген играет роль в воспалении, контроле

артериального давления, коагуляции и возникновении болевых ощущений. При дефиците кининогена происходит снижение уровня брадикинина, не влияющее на функцию левого желудочка, но влияющее на риск развития ишемической болезни сердца [13]. В нашем исследовании уровень кининогена не различался в исследуемых группах пациентов. Но обнаружен высокий уровень плазминогена и ингибитора фибринолиза PAI-1 в группе пациентов со стабильными бляшками.

Существует взаимосвязь между иммунной активацией, воспалением и механизмами образования тромбов. Система комплемента – не только элемент врожденного иммунного ответа, но и ключевой медиатор воспалительного процесса [14]. Белки системы комплемента неоднократно ассоциировались с ремоделированием сосудов и атеросклерозом [15, 16].

Накапливающиеся данные исследований указывают на то, что аномалия компонентов комплемента и возникающая чрезмерная активация комплемента связаны с атерогенезом. Обнаружение отложений C3b/iC3b и MAC в атеросклеротических артериях указывает на повышенную активацию комплемента [17]. Система комплемента может модулировать активацию тромбоцитов и последующее образование тромбов. Сообщалось, что несколько компонентов системы комплемента, включая C3 и мембраноатакующий комплекс, связаны с тромбоцитами и становятся функционально действующими при активации тромбоцитов [18].

Система комплемента может быть активирована одним из трех путей: классическим, альтернативным и лектиновым. Все три сходятся на уровне C3 с образованием конвертаз C5, что в конечном итоге приводит к полимеризации C9 и сборке комплексов мембранной атаки. Классический путь активируется распознаванием антител C1q или апоптотических клеток, связанных с антигенами или микробными поверхностями. Воздействие C1q на его мишень приводит к активации сериновых протеаз C1r и C1s, за которыми следует C1s-опосредованное расщепление C4 на анафилатоксин C4a и опсонин C4b [14, 18]. Тромбоциты могут также высвобождать C1q при активации, тем самым активируя другие тромбоциты [19]. Существует несколько точек взаимодействия в каскаде комплемента и системе свертывания крови (например, фактор XIIa, который может активировать C1q и, следовательно, классический путь комплемента [20]).

В нашем исследовании значимой разницы между субкомпонентами C1 (C1q; C1r; C1s) в исследуемых группах не обнаружено. Но суммарно содержание компонента комплемента C1 было выше в группе пациентов со стабильными АБ, а содержание компо-

нентов комплемента C3, C7, C9 и фактора комплемента В было выше в группе пациентов со стабильными АБ ($p < 0,05$). Уровень фактора комплемента Н, служащего кофактором для инактивации C3b, был выше в группе пациентов с нестабильными АБ (см. таблицу).

Ранее проведенные исследования методом иммуно-ферментного анализа показали высокий уровень C5b-9 в утолщении интимы и фиброзных бляшках по сравнению с нормальной тканью. При этом уровень C5b-9 в утолщениях интимы были выше, чем в фиброзных бляшках. Это позволило авторам предположить, что активация комплемента происходит непосредственно в стенке артерии и является активной частью атерогенеза [16].

Воспаление и активация системы комплемента C5b-9 предрасполагают к разрыву аневризмы внутричерепной артерии [21]. В эксперименте на животных показано, что фактор комплемента C5a и его рецептор C5aR экспрессируются в уязвимых атеросклеротических бляшках. Значительное увеличение C5aR в бляшке было обнаружено у мышей, получавших C5a, при этом местное лечение C5a привело к поразительному увеличению количества разрушений бляшки с сопутствующим кровотечением. Кроме того, гладкомышечные клетки и эндотелиальные клетки после обработки C5a *in vitro* показали заметное увеличение апоптоза, что может способствовать нестабильности поражения *in vivo* [22]. Также было обнаружено, что мембраноатакующий комплекс может играть решающую роль в образовании бляшек и разрыве аневризм [23]. В нашем исследовании мы не получили повышения концентрации компонентов комплемента C7 и C9, участвующих в образовании мембраноатакующего комплекса, в крови пациентов с нестабильными бляшками. По-видимому, данный процесс носит исключительно локальный характер в ткани атеросклеротической бляшки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность использования исследованных белков как биомаркеров нестабильности АБ при коронарном атеросклерозе требует дальнейших исследований их потенциальной роли в развитии данного заболевания. Результаты этого исследования, полученные с помощью современного метода количественной протеомики, выявили в образцах сыворотки крови у пациентов с нестабильными АБ повышенные концентрации белков: фактора комплемента Н, фибриногена и фибулина-1. При одновременном сниженном уровне белков, участвующих в каскаде коагуляции, процессе фибринолиза, и белков, связанных с ними функционально (α -2-антиплазмин,

α-2-макроглобулин, кофактор гепарина 2, коагуляционный фактор XII, протромбин, плазминоген, PAI-1, витронектин), в группе пациентов с нестабильными АБ идентифицированы сниженные концентрации белков комплемента (C1, C3, C7, C9) и фактора комплемента В, ассоциированные с процессами коагуляции и фибринолиза.

Наши данные показали, что при угнетении коагуляционного и фибринолитических процессов в крови пациентов с нестабильными АБ значительно повышена концентрация белков фибулина-1 и фибриногена. Это подтвердил многофакторный логистический регрессионный анализ, показавший связь нестабильности с концентрацией фибулина-1 ($\text{Exp}(B) = 1,008$; $p = 0,05$).

Таким образом, возможно, что повышенная концентрация фибулина-1 в крови может рассматриваться как перспективный потенциальный биомаркер нестабильности АБ при коронарном атеросклерозе.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bos D., Arshi B., van den Bouwhuijsen Q.J.A., Ikram M.K., Selwaness M., Vernooij M.W. et al. Atherosclerotic carotid plaque composition and Incident stroke and coronary events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2021;77(11):1426–1435. DOI: 10.1016/j.jacc.2021.01.038
2. Yuan S., Burgess S., Laffan M., Mason A.M., Dichgans M., Gill D. et al. Genetically proxied Inhibition of Coagulation Factors and Risk of Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2021;10(8):e019644. DOI: 10.1161/JAHA.120.019644.
3. Stakhneva E.M., Meshcheryakova I.A., Demidov E.A., Starostin K.V., Sadovski E.V., Peltek S.E. et al. A Proteomic Study of Atherosclerotic Plaques in Men with Coronary Atherosclerosis. *Diagnostics.* 2019;9(4):E177. DOI: 10.3390/diagnostics9040177.
4. Badimon L., Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* 2014;276(6):618–632. DOI: 10.1111/joim.12296.
5. Luo M., Ji Y., Luo Y., Li R., Fay W.P., Wu J. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates the vascular expression of vitronectin. *J. Thromb. Haemost.* 2017;15(12):2451–2460. DOI: 10.1111/jth.13869.
6. Ekmekçi H., Güngör Öztürk Z., Ekmekçi O.B., İşler Bütün I., Beşirli K., Gode S. et al. Significance of vitronectin and PAI-1 activity levels in carotid artery disease: comparison of symptomatic and asymptomatic patients. *Minerva Med.* 2013;104(2):215–223.
7. Ekmekci H., Sonmez H., Ekmekci O.B., Ozturk Z., Domanic N., Kokoglu E. Plasma vitronectin levels in patients with coronary atherosclerosis are increased and correlate with extent of disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2002;14(3):221–225. DOI: 10.1023/a:1025000810466.
8. Yamagishi K., Aleksic N., Hannan P.J., Folsom A.R.; ARIC Study Investigators. Coagulation factors II, V, IX, X, XI, and XII, plasminogen, and alpha-2 antiplasmin and risk of coronary heart disease. *J. Atheroscler. Thromb.* 2010;17(4):402–409. DOI: 10.5551/jat.3673.
9. Ragino Y.I., Striukova E.V., Murashov I.S., Polonskaya Y.V., Volkov A.M., Kurguzov A.V. et al. Association of some hemostasis and endothelial dysfunction factors with probability of presence of vulnerable atherosclerotic plaques in patients with coronary atherosclerosis. *BMC Res. Notes.* 2019;12(1):336. DOI: 10.1186/s13104-019-4360-7.
10. Lu J., Niu D., Zheng D., Zhang Q., Li W. Predictive value of combining the level of lipoprotein-associated phospholipase A2 and antithrombin III for acute coronary syndrome risk. *Biomed. Rep.* 2018;9(6):517–522. DOI: 10.3892/br.2018.1162.
11. Elmissbah T.E., Iderous M.E., Al-Qahtani F.M., Elaskary A., Dahlawi H. Assessment of antithrombin III and protein C in Saudi myocardial infarction patients. *Clin. Lab.* 2021;67(10). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.201206.
12. Sridharan V., Tripathi P., Sharma S.K., Moros E.G., Corry P.M., Lieblong B.J. et al. Cardiac inflammation after local irradiation is influenced by the kallikrein-kinin system. *Cancer Res.* 2012;72(19):4984–4992. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1831
13. Koch M., Bonaventura K., Spillmann F., Dendorfer A., Schultheiss H.P., Tschöpe C. Attenuation of left ventricular dysfunction by an ACE inhibitor after myocardial infarction in a kininogen-deficient rat model. *Biol. Chem.* 2008;389(6):719–723. DOI: 10.1515/BC.2008.083.
14. Lubbers R., van Essen M.F., van Kooten C., Trouw L.A. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin. Exp. Immunol.* 2017;188(2):183–194. DOI: 10.1111/cei.12952.
15. Martin-Ventura J.L., Martinez-Lopez D., Roldan-Montero R., Gomez-Guerrero C., Blanco-Colio L.M. Role of complement system in pathological remodeling of the vascular wall. *Mol. Immunol.* 2019;114:207–215. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.06.016.
16. Vlaicu S.I., Tatmir A., Rus V., Mekala A.P., Mircea P.A., Niculescu F. et al. The role of complement activation in atherogenesis: the first 40 years. *Immunol. Res.* 2016;64(1):1–13. DOI: 10.1007/s12026-015-8669-6.
17. Ge X., Xu C., Liu Y., Zhu K., Zeng H., Su J. et al. Complement activation in the arteries of patients with severe atherosclerosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2018;11(1):1–9.
18. Rawish E., Sauter M., Sauter R., Nording H., Langer H.F. Complement, inflammation and thrombosis. *Br. J. Pharmacol.* 2021;178(14):2892–2904. DOI: 10.1111/bph.15476.
19. Speth C., Rambach G., Würzner R., Lass-Flörl C., Kozarcanin H., Hamad O.A. et al. Complement and platelets: Mutual interference in the immune network. *Mol. Immunol.* 2015;67(1):108–118. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.03.244.
20. Amara U., Rittirsch D., Flierl M., Bruckner U., Klos A., Gebhard F. et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008;632:71–79. DOI: 10.1007/978-0-387-78952-1_6.
21. Tulamo R., Frösen J., Paetau A., Seitsonen S., Hernesniemi J., Niemelä M. et al. Lack of complement inhibitors in the outer intracranial artery aneurysm wall associates with complement terminal pathway activation. *Am. J. Pathol.* 2010;177(6):3224–

3232. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091172.
22. Wezel A., de Vries M.R., Lagraauw H.M., Foks A.C., Kuiper J., Quax P.H. et al. Complement factor C5a induces atherosclerotic plaque disruptions. *J. Cell Mol. Med.* 2014;18(10):2020–2030. DOI: 10.1111/jcmm.12357.
23. Wu G., Hu W., Shahsafaei A., Song W., Dobarro M., Sukhova G.K. et al. Complement regulator CD59 protects against atherosclerosis by restricting the formation of complement membrane attack complex. *Circ. Res.* 2009;104(4):550558. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.191361.

Вклад авторов

Стахнёва Е.М. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Каштанова Е.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Полонская Я.В., Стрюкова Е.В., Шрамко В.С., Садовский Е.В., Кургузов А.В., Мурашов И.С. – анализ и интерпретация данных. Чернявский А.М., Рагино Ю.И. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Стахнёва Екатерина Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, stahneva@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-0484-6540>.

Каштанова Елена Владимировна – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, elekstanova@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2268-4186>

Полонская Яна Владимировна – д-р биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, yana-polonskaya@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3538-0280>;

Стрюкова Елена Владимировна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, strukova.j@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5316-4664>

Шрамко Виктория Сергеевна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, nosova@211.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0436-2549>

Садовский Евгений Викторович – мл. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, stinger000@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7350-534X>

Кургузов Алексей Витальевич – врач-кардиолог, кардиохирургическое отделение аорты и коронарных артерий, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, <http://orcid.org/0000-0003-1345-2199> aleksey_kurguzov@mail.ru

Мурашов Иван Сергеевич – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория патоморфологии, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, ivmurashov@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3712-1258>

Чернявский Александр Михайлович – д-р мед. наук, профессор, директор НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, amchern@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9818-8678>

Рагино Юлия Игоревна – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, руководитель НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, ragino@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4936-8362>

(✉) Стахнёва Екатерина Михайловна, stahneva@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.05.2022;
одобрена после рецензирования 27.06.2022;
принята к публикации 08.09.2022

УДК 616.127-005.8-021.3-037:616.132..2-089.86
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-130-139>

Прогностическое значение перипроцедурной динамики фракции выброса левого желудочка у пациентов с первым инфарктом миокарда и чрескожным коронарным вмешательством

Тимофеева Т.М.^{1,2}, Кобалава Ж.Д.¹, Сафарова А.Ф.^{1,2}, Кабельо М.Ф.Э.¹, Тигай Ж.Г.¹

¹ Российский университет дружбы народов (РУДН)
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8

² Городская клиническая больница (ГКБ) им. В.В. Виноградова
117292, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 61

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Оценка перипроцедурной динамики фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) у пациентов с первым острым инфарктом миокарда (ОИМ) и чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ) без анамнеза сердечной недостаточности (СН) и ее прогностическое значение в развитии сердечно-сосудистых осложнений в постинфарктный период.

Материалы и методы. В проспективное одноцентровое наблюдательное исследование включен 131 пациент с первым ОИМ без анамнеза СН и успешным ЧКВ. ФВ ЛЖ оценивалась до ЧКВ при поступлении и перед выпиской. У пациентов с исходно сниженной ФВ ЛЖ менее 50% были выбраны критерии перипроцедурного ее улучшения: 1) ФВ ЛЖ $\geq 50\%$; 2) Δ ФВ ЛЖ более 5%, но ФВ $< 50\%$. Конечными точками являлись госпитализация по поводу развития СН и смерть от сердечно-сосудистых заболеваний в комбинации с развитием СН. Средний период наблюдения составил 2,5 года.

Результаты. При поступлении у 74 (56,5%) пациентов отмечена ФВ ЛЖ менее 50%. При выписке в этой группе по критериям улучшения ФВ ЛЖ доля пациентов составила 40,5 и 14,9% соответственно. В 44,6% случаев прирост ФВ ЛЖ отсутствовал.

Предикторами перипроцедурного отсутствия динамики ФВ ЛЖ явились индекс нарушения локальной сократимости $>1,94$, конечно-систолический объем ЛЖ >57 мл, конечно-диастолический размер ЛЖ $>5,1$ см, систолическое давление легочной артерии >27 мм рт. ст., уровень NT-proBNP > 530 пг/мл, соотношение скоростей трансмитрального кровотока в фазу раннего наполнения к кровотоку в систолу предсердий $>1,06$. За период наблюдения 28 (21,4%) пациентов были госпитализированы по поводу развития СН, у 33 (25,2%) зарегистрирована комбинированная конечная точка.

Отсутствие перипроцедурного улучшения сократительной способности ЛЖ независимо ассоциировано с более высокой вероятностью госпитализации по поводу СН (относительный риск (ОР) 3,5; 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1,63–7,55; $p = 0,001$) и наступления комбинированной конечной точки (ОР 2,6; 95%-й ДИ 1,28–5,48; $p = 0,009$) в постинфарктном периоде.

Заключение. У пациентов с первым ИМ и систолической дисфункцией ЛЖ целесообразна перипроцедурная оценка ФВ ЛЖ для стратификации риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, перипроцедурная динамика, фракция выброса, сердечная недостаточность

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

✉ Тимофеева Татьяна Михайловна, timtan@bk.ru

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике Медицинского института РУДН.

Для цитирования: Тимофеева Т.М., Кобалава Ж.Д., Сафарова А.Ф., Кабельо М.Ф.Э., Тигай Ж.Г. Прогностическое значение перипроцедурной динамики фракции выброса левого желудочка у пациентов с первым инфарктом миокарда и чрескожным коронарным вмешательством. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):130–139. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-130-139>.

Prognostic value of short-term trajectories of left ventricular ejection fraction in patients with first myocardial infarction and percutaneous coronary intervention

Timofeeva T.M.^{1,2}, Kobalava Zh.D.¹, Safarova A.F.^{1,2}, Cabello M. F.E.¹, Tigay Zh.G.¹

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)
8, Mikluho-Maklaya Str., Moscow, 117198, Russian Federation

² Vinogradov City Clinical Hospital
61, Vavilova Str., Moscow, 117292, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To assess periprocedural dynamics of left ventricular ejection fraction (LVEF) in patients with first acute myocardial infarction (AMI) and percutaneous coronary intervention (PCI) without heart failure (HF) in the medical history, as well as its prognostic value in the development of cardiovascular complications in the postinfarction period.

Materials and methods. A prospective, single-center observational study included 131 patients with first AMI without HF in the past medical history and successful PCI. LVEF was assessed before PCI at admission and before discharge. In patients with reduced baseline LVEF of less than 50%, the criteria for its periprocedural improvement were chosen: 1) LVEF $\geq 50\%$; 2) Δ LVEF of more than 5%, but EF $< 50\%$. The endpoints were hospitalization for the development of HF and death from cardiovascular disease in combination with the development of HF. The average follow-up period was 2.5 years.

Results. At admission, LVEF was $< 50\%$ in 74 (56.5%) patients. At discharge, according to the criteria for LVEF improvement, the proportion of patients in this group was 40.5 and 14.9%, respectively. In 44.6% of cases, no increase in LVEF was noted.

The predictors of the absence of periprocedural dynamics in LFEF included impaired regional contractility index > 1.94 , left ventricular end-systolic volume > 57 ml, left ventricular end-diastolic diameter > 5.1 cm, pulmonary artery systolic pressure > 27 mm Hg, NT-proBNP > 530 pg / ml, and E / A ratio > 1.06 . During the follow-up period, 28 (21.4%) patients were hospitalized for the development of HF, 33 (25.2%) patients had a combined endpoint.

The absence of periprocedural improvement in left ventricular contractility was independently associated with higher odds of hospitalization for HF (relative risk (RR) 3.5; 95% confidence interval (CI) 1.63–7.55; $p = 0.001$) and the combined endpoint (RR 2.6; 95% CI 1.28–5.48; $p = 0.009$) in the postinfarction period.

Conclusion. In patients with first AMI and left ventricular systolic dysfunction, periprocedural evaluation of LVEF is reasonable to stratify the risk of adverse cardiovascular outcomes.

Keywords: acute myocardial infarction, periprocedural dynamics, ejection fraction, heart failure

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All individuals signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at RUDN University.

For citation: Timofeeva T.M., Kobalava Zh.D., Safarova A.F., Cabello M. F.E., Tigay Zh.G. Prognostic value of

short-term trajectories of left ventricular ejection fraction in patients with first myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):130–139. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-130-139>.

ВВЕДЕНИЕ

Систолическая дисфункция левого желудочка (ЛЖ) является одним из ключевых отрицательных прогностических факторов у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) [1], в связи с чем оценка фракции выброса (ФВ) ЛЖ рекомендована для всех пациентов данной группы [2, 3]. В то же время ФВ ЛЖ является единственным эхокардиографическим параметром, который в настоящее время используется в качестве предиктора исхода у пациентов с ИМ с подъемом сегмента ST (ИМпST) [4]. В зависимости от величины ФВ ЛЖ после первого ИМ в качестве теста перед выпиской авторы рекомендуют выделять группы риска высокой летальности с периодами наблюдения 1 год [5, 6], 3 года [7]. Тем не менее ряд исследований показал, что у значительного числа пациентов с ИМ со сниженной исходной ФВ ЛЖ возможно ее улучшение с течением времени [8, 9], что приводит к снижению риска сердечно-сосудистых событий в постинфарктном периоде. И, наоборот, пациенты, у которых не наблюдается улучшения ФВ ЛЖ после ИМ, имеют более высокий риск неблагоприятного ремоделирования ЛЖ [10], жизнеугрожающих аритмий, остановки сердца, сердечно-сосудистых заболеваний и смертности от всех причин независимо от реваскуляризации, медикаментозной терапии, пикового уровня тропонина и исходного уровня ФВ ЛЖ [11, 12]. В исследованиях по изучению динамики сократительной способности ЛЖ у пациентов после ИМ выявлена связь улучшения ФВ ЛЖ с исходным уровнем натрийуретического пептида, МВ-креатинкиназы и пораженной артерии [13, 14]. Показано, что пациенты с улучшенной ФВ ЛЖ в период от 2 нед до нескольких месяцев после ИМ имеют лучший прогноз [11, 12, 15]. Частота улучшения ФВ ЛЖ в более короткий период после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) и ее связь с отдаленными исходами недостаточно изучены у пациентов с первым ИМ и без анамнеза сердечной недостаточности (СН).

Несмотря на достигнутые успехи в диагностике и лечении, частота осложнений после ИМ по-прежнему остается высокой [16–18]. Кроме того, отсутствие приверженности и возможности у пациентов длительного динамического наблюдения делает актуальным выявление роли краткосрочной динамики

ФВ ЛЖ после ЧКВ перед выпиской и ее влияние на развитие СН и сердечно-сосудистой смерти (ССС). Поскольку проблеме развития СН в отдаленном периоде у пациентов с ОИМ уделяется большое внимание, целью нашего исследования и явилась оценка перипроцедурной динамики ФВ ЛЖ у пациентов с первым ИМ и ЧКВ без анамнеза СН и ее прогностическое значение в развитии сердечно-сосудистых осложнений в постинфарктный период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное одноцентровое наблюдательное исследование включен 131 пациент, госпитализированный в отделение реанимации и интенсивной терапии ГКБ им. В.В. Виноградова. Средний возраст составил $61,85 \pm 11,3$ лет; мужчин 68%; ИМпST диагностирован у 74% пациентов. Средняя ФВ ЛЖ при поступлении составила 46 (44; 50)%: у 57 (43,6%) пациентов ФВ ЛЖ была более 50%, у 56 (42,7%) пациентов – 40–49%, у 18 (13,7%) – менее 40%.

Критерии включения: первый ОИМ, диагностированный в соответствии с четвертым универсальным определением ИМ [19]; успешное первичное ЧКВ у пациентов с ИМпST, ранним (в течение 24 ч) ЧКВ у пациентов с инфарктом миокарда без подъема сегмента ST (ИМбпST), т. е. достижение кровотока TIMI III в пораженном сосуде; сумма В-линий менее 5 при ультразвуковом исследовании (УЗИ) легких; отсутствие анамнеза СН, одышки при поступлении, Killip 1.

Критерии невключения: применение диуретиков и вазопрессоров, первичная патология легких (пневмонии), онкологические заболевания легких, развитие осложнений ОИМ (разрыв межжелудочковой перегородки, отрыв папиллярной мышцы), тяжелые нарушения ритма и проводимости сердца на момент включения, в том числе фибрилляция и (или) трепетание предсердий.

Исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации».

У всех пациентов, включенных в исследование, при поступлении проводили сбор анамнеза, стан-

дартное физическое обследование, электрокардиографию, рентгенологическое исследование органов грудной полости, эхокардиографию (ЭхоКГ), УЗИ легких, коронароангиографию и ангиопластику со стентированием коронарных артерий. Лабораторные исследования выполняли в соответствии с российскими стандартами оказания медицинской помощи: общий и биохимический анализ крови, в том числе определяли уровень тропонина I при поступлении и через 6–12 ч после госпитализации, дополнительно определяли мозговой натрийуретический гормон (NT-proBNP).

ЭхоКГ выполняли при поступлении в ОРИТ до ЧКВ и при выписке с последующей постобработкой на станции Echopac (General Electric Healthcare, США) с автоматической оценкой ФВ ЛЖ [20–22]. Диастолическую функцию ЛЖ оценивали по следующим параметрам: E, E/A, e'lat, E/e'lat, индексированный объем левого предсердия и максимальная скорость трикуспидальной регургитации [23].

Пациенты с исходно сниженной, менее 50%, ФВ ЛЖ были дополнительно стратифицированы на основе перипроцедурной динамики сократительной способности ЛЖ. У пациентов с исходно сниженной ФВ ЛЖ менее 50% были выбраны критерии перипроцедурного ее улучшения: 1) ФВ ЛЖ $\geq$ 50%; 2) Δ ФВ ЛЖ более 5 %, но ФВ < 50% [15].

УЗИ легких при поступлении для оценки легочного застоя проводилось в восьми точках по передней поверхности грудной клетки. Сумма В-линий менее 5 соответствовала отсутствию легочного застоя [4, 22]. Все пациенты в госпитальном периоде и в течение года после выписки находились на стандартной двойной антиагрегантной терапии до и после вмешательства.

Основными оцениваемыми исходами были госпитализация по поводу СН и ССС. Данные были получены в единой медицинской информационно-аналитической системе, а также по данным телефонных контактов за средний период наблюдения 2,5 года.

Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения SPSS (версия 23.0) и

MedCalc Версия 19. Количественные переменные описывали как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение среднего значения $M \pm SD$ (при нормальном распределении) или для количественных переменных с асимметричным распределением рассчитывались медиана и интерквартильный размах $Me (Q_1; Q_3)$. Качественные переменные описывали абсолютными и относительными значениями n (%). Проверка распределений выполнялась с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. Непараметрический метод Спирмена использовали для измерения ранговой корреляции (статистическая зависимость между ранжированием двух переменных). Для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо количественного признака использовали U -критерий Манна – Уитни.

Для сравнения частот признаков и качественных переменных пользовались критерием χ^2 -квадрат Пирсона (χ^2). Результаты считали статистически значимыми при значениях двустороннего $p < 0,05$. Влияние отсутствия улучшения ФВ ЛЖ на риск развития конечных точек оценивали при одно- и многофакторном анализе Кокса. При помощи логистической регрессии изучались предикторы изменения ФВ ЛЖ, определялось отношение шансов и 95%-1-й доверительный интервал (ДИ). Пороговые значения для количественных предикторов устанавливались на основе соотношения маргинальных вероятностей с выбранным баллом отсека. Балл отсека был выбран при оптимальном соотношении чувствительности и специфичности. Первичным критерием оценки выживаемости установлена кумулятивная выживаемость – промежуток между датой выписки и датой конечной точки. Вероятность выживания оценивали методом построения кривых выживаемости Каплана – Майера, сравнение производили с помощью лог-рангового критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительная характеристика пациентов с ФВ ЛЖ более и менее 50% при поступлении представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика пациентов с ОИМ, $n = 131$			
Показатель	ФВ ЛЖ $\geq 50\%$, $n = 57$ (43,5%)	ФВ ЛЖ < 50%, $n = 74$ (56,5%)	p
Возраст, годы, $M \pm SD$	$57 \pm 10,97$	$62,5 \pm 11,8$	0,172
Мужчины/женщины, n (%)	39(68)/18(32)	50(68)/24(32)	0,917
Индекс массы тела, $кг/м^2$, $M \pm SD$	$28,03 \pm 4,26$	$28,71 \pm 4,56$	0,375
Фибрилляция предсердий в анамнезе, n (%)	2 (3,5)	10 (14)	0,049
NT-proBNP пг/мл, $Me (Q_1; Q_3)$	330,70 (199; 988)	785 (314; 1768)	0,011
Тропонин I, нг/мл, $Me (Q_1; Q_3)$	0,11 (0,03; 0,73)	0,39 (0,07; 2,93)	0,005

Окончание табл. 1

Показатель	ФВ ЛЖ50, $n = 57$ (43,5%)	ФВ ЛЖ < 50%, $n = 74$ (56,5%)	p
Тропонин 2, нг/мл, $Me (Q_1; Q_3)$	3,64 (0,68; 19,73)	23,68 (3,45; 61,24)	<0,000
ИМпST/ИМбпST, n (%)	38(67)/19(33)	59(80)/15(20)	0,090

Примечание. Тропонин 1 – при поступлении в реанимационное отделение; тропонин 2 – через 6–12 ч после госпитализации.

Пациенты были сопоставимы по полу и возрасту. В группе пациентов с ФВ ЛЖ менее 50% достоверно чаще имелась фибрилляция предсердий в анамнезе; в лабораторных показателях выявлены достоверно более высокие уровни тропонина при поступлении и через 6–12 ч и уровень NT-proBNP. Кроме того, они имели более высокий риск летальности по шкале GRACE.

При повторном ЭхоКГ исследовании перед выпиской пациентов с исходной ФВ ЛЖ менее 50% в 55,4% случаев наблюдалось улучшение систолической

функции ЛЖ по выбранным критериям: 1) улучшение ФВ ЛЖ $\geq 50\%$ – у 30 пациентов; 2) Δ ФВ ЛЖ более 5%, но не достигшие 50% – у 11 пациентов. В 4,6% случаев наблюдалось незначительное снижение ФВ ЛЖ, эти пациенты отнесены к группе без динамики ФВ ЛЖ, которую составили 33 пациента.

Сравнительная характеристика пациентов с улучшенной ФВ ЛЖ и пациентов с без динамики представлена в табл. 2.

Предикторы отсутствия перипроцедурного улучшения ФВ ЛЖ представлены в табл. 3.

Таблица 2

Сравнительная характеристика пациентов с улучшенной ФВ ЛЖ и отсутствием динамики ФВ ЛЖ, $n = 74$			
Показатель	Пациенты с улучшенной ФВ ЛЖ, $n = 41$	Пациенты без динамики ФВ ЛЖ, $n = 33$	p
ИНЛС, $M \pm SD$	1,87 $\pm$ 0,15	1,96 $\pm$ 0,15	0,025
КСО ЛЖ, мл, $Me (Q_1; Q_3)$	41 (35; 56)	58 (42; 71)	0,0055
УО, мл, $Me (Q_1; Q_3)$	47 (41; 59)	41 (37; 47)	0,040
ОТС ЛЖ, $M \pm SD$	0,47 $\pm$ 0,1	0,53 $\pm$ 0,1	0,041
Тип геометрии ЛЖ, n (%):			
норма	6 (14,6)	2 (6)	0,244
КР	9 (22)	7 (21,2)	0,937
КГ	24 (58,5)	15 (45,5)	0,293
ЭГ	2 (4,9%)	9 (27,3)	0,006
Е, см/с, $Me (Q_1; Q_3)$	0,44 (0,40; 0,60)	0,56 (0,42; 0,66)	0,197
Е/А, $Me (Q_1; Q_3)$	0,70 (0,60; 0,82)	0,77 (0,57; 1,36)	0,002
ИОЛП, мл/м ² , $Me (Q_1; Q_3)$	28,4 (24; 33)	30 (23,5; 40)	0,333
Vmax TR, м/с, $Me (Q_1; Q_3)$	1,9 (1,40; 2,20)	2,5 (2,2; 2,8)	<0,000
СДЛА, мм рт. ст.	20 (14; 27)	30 (25; 37)	<0,000

Примечание. А – скорость трансмитрального кровотока в систолу предсердий; Е – скорость трансмитрального кровотока в фазу раннего наполнения; Vmax TR – максимальная скорость трикуспидальной регургитации; ИНЛС – индекс нарушения локальной сократимости; ИОЛП – индексированный к площади поверхности тела объем левого предсердия; КГ – концентрическая гипертрофия; КР – концентрическое ремоделирование; КСО – конечный систолический объем; ОТС – относительная толщина стенки; СДЛА – систолическое давление в легочной артерии; УО – ударный объем; ЭГ – эксцентрическая гипертрофия.

Таблица 3

Предикторы отсутствия перипроцедурного улучшения ФВ ЛЖ			
Показатель	ОШ	95%-й ДИ	p
ИНЛС > 1,94	7,86	2,57–24,06	0,0001
КСО ЛЖ > 57 мл	6,94	2,82–17,05	<0,0001
КДР ЛЖ > 5,1 см	8,45	2,99–23,87	< 0,0001
СДЛА > 27 мм рт. ст.	5,39	2,31–12,56	0,0001
NTproBNP > 530 пг/мл	3,22	1,42–7,29	0,0044
Е/А > 1,06	6,32	1,81–22,0	0,004
Vmax TR > 2,1 м/с	10,87	3,57–33,04	0,000

Примечание. ИНЛС – индекс нарушения локальной сократимости; КСО ЛЖ – конечно-систолический объем левого желудочка; КДР ЛЖ – конечно-диастолический размер левого желудочка; СДЛА – систолическое давление в легочной артерии; Е/А – соотношение скоростей трансмитрального кровотока в фазу раннего наполнения к кровотоку в систолу предсердий; Vmax TR – максимальная скорость трикуспидальной регургитации.

Относительный риск развития СН и комбинированной конечной точки, полученный при одно- и многофакторном анализе, оказался значимым в группе пациентов с отсутствием перипроцедурной динамики ФВ ЛЖ (табл. 4).

У пациентов без динамики ФВ ЛЖ при выписке после ОИМ достоверно чаще по сравнению с паци-

ентами с исходно нормальной и улучшенной ФВ ЛЖ наблюдалось развитие конечных точек (госпитализация по поводу СН и ССЗ) (рис. 1).

Кривые Каплана – Майера кумулятивной вероятности выживания в зависимости от улучшения ФВ ЛЖ при выписке у пациентов с ОИМ представлены на рис. 2, 3.

Таблица 4

Соотношение рисков развития сердечной недостаточности и комбинированной точки у пациентов в зависимости от перипроцедурной динамики ФВ ЛЖ										
Показатель	Развитие СН					Комбинированная точка				
	Частота событий, %	Однофакторный анализ, 95%-й ДИ	<i>p</i>	Многофакторный анализ, 95%-й ДИ	<i>p</i>	Частота событий, %	Однофакторный анализ, 95%-й ДИ	<i>p</i>	Многофакторный анализ, 95%-й ДИ	<i>p</i>
ФВ ЛЖ $\geq 50\%$, <i>n</i> = 30	14	0,50 (0,27–1,89)	0,71	0,75 (0,28–2,05)	0,58	19	0,73 (0,30–1,77)	0,48	0,69 (0,27–1,74)	0,44
Увеличение ФВ ЛЖ $\geq 5\%$, <i>n</i> = 11	17	0,75 (0,18–3,18)	0,70	0,53 (0,12–2,35)	0,40	22	0,62 (0,14–2,61)	0,51	0,41 (0,09–1,81)	0,24
ФВ ЛЖ без улучшения, <i>n</i> = 33	39	3,1 (1,46–6,47)	0,003	3,5 (1,63–7,55)	0,001	42	2,3 (1,17–4,86)	0,017	2,6 (1,28–5,48)	0,009

Примечание. Многофакторный анализ включал возраст, пол, ФП, сахарный диабет, многососудистое поражение коронарного русла.

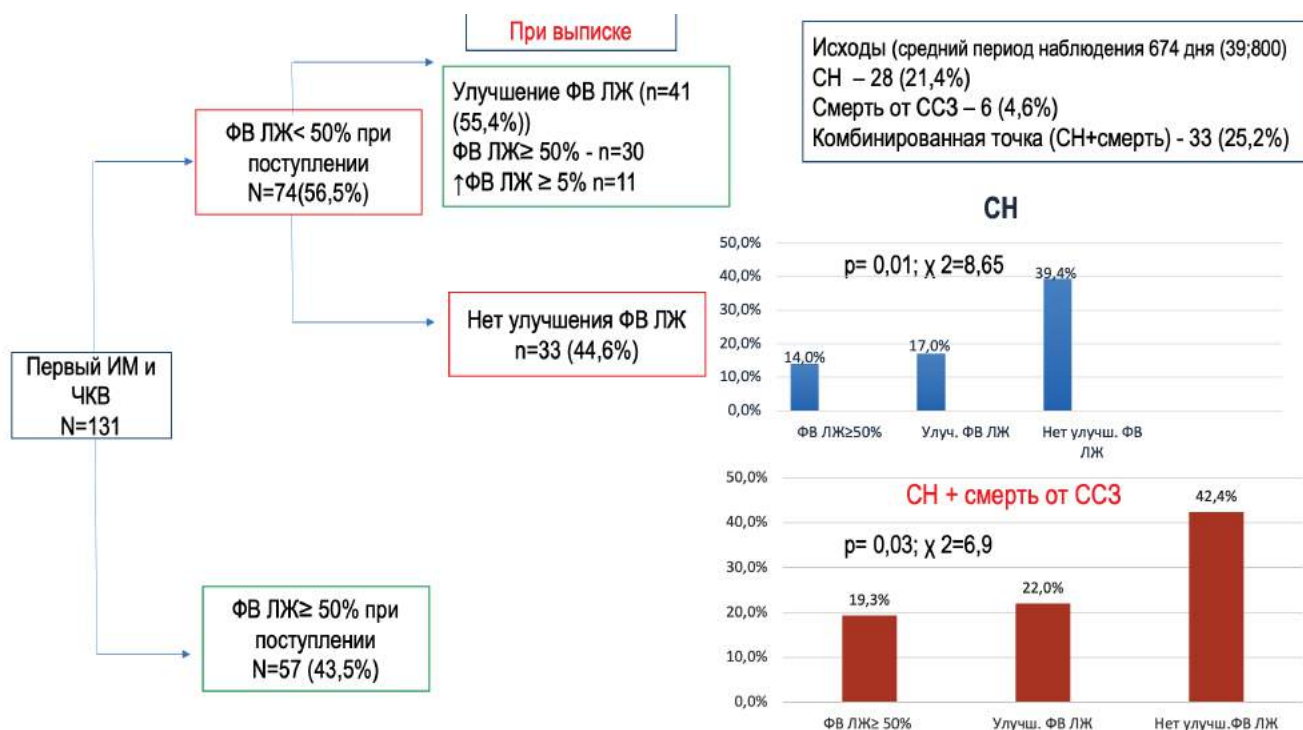


Рис. 1. Распределение пациентов с ОИМ и ЧКВ по ФВ ЛЖ при поступлении и выписке

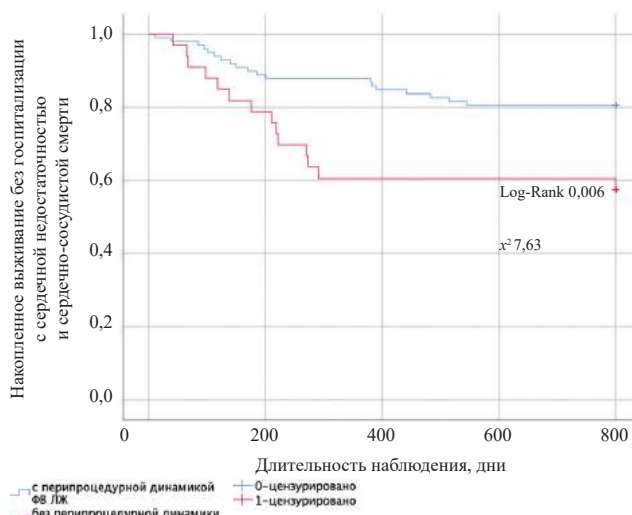


Рис. 2. Кривые Каплана – Майера кумулятивной вероятности выживания (без развития комбинированной точки) в зависимости от улучшения ФВ ЛЖ при выписке

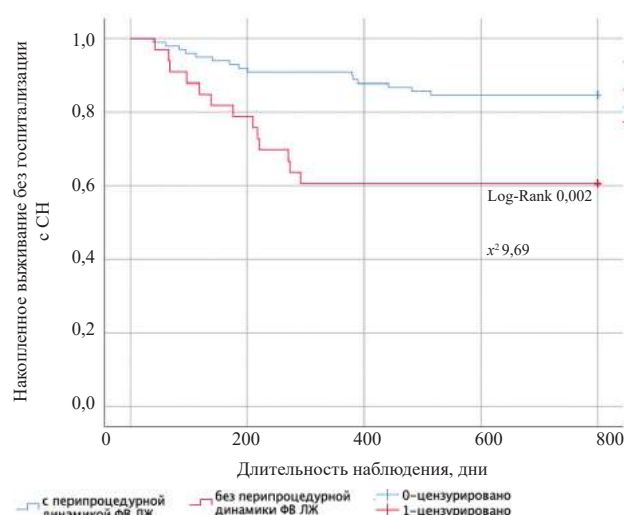


Рис. 3. Кривые Каплана – Майера кумулятивной вероятности выживания (без госпитализации по причине СН) в зависимости от улучшения ФВ ЛЖ при выписке

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании впервые предпринята попытка оценить прогностическое значение перипроцедурного улучшения ФВ ЛЖ среди пациентов после первого ИМ и ЧКВ. Показано, что отсутствие улучшения ФВ ЛЖ по выбранным критериям при выписке связано со значительным повышением риска развития СН, а также наступления комбинированной точки. При поступлении больше половины пациентов имели систолическую дисфункцию ЛЖ и у 44,6% из них не наблюдалось ее улучшения при выписке.

Пациенты с положительной динамикой ФВ ЛЖ и без нее были сопоставимы по полу, возрасту, факторам риска сердечно-сосудистых заболеваний, по степени поражения коронарного русла. Однако пациенты без динамики ФВ ЛЖ имели достоверно большие КСО ЛЖ, ОТС ЛЖ, более высокий уровень СДЛА, чаще имели эксцентрическую гипертрофию ЛЖ, что подчеркивает более значимое структурно-функциональное поражение сердца [23, 24].

Полученные нами данные согласуются с работами M.F. Minicucci и соавт. [14], которые выявили восстановление функции ЛЖ в период от 2 нед до 6 мес у 25% пациентов после ИМ. W.Y. Wu и соавт. [15, 25] показали 8-кратное снижение смертности от всех причин и 10-кратное снижение ССС у молодых пациентов с ОИМ с улучшенной ФВ ЛЖ. D.S. Chew и соавт. [11, 12] также обнаружили, что пожилые пациенты с ИМ и улучшением ФВ ЛЖ до >40% в период от 2 нед имели в 4 раза более низ-

кий риск будущих нежелательных явлений и смертности от всех причин и ССЗ по сравнению с пациентами без динамики ФВ ЛЖ.

В более ранних работах получена корреляция низкой ФВ ЛЖ при выписке у пожилых пациентов после ИМ с повышенным риском смертности и повторной госпитализации [26]. В нашем исследовании снижение исходной ФВ ЛЖ менее 50% само по себе достоверно не связано с более высокими показателями госпитализации по поводу СН и ССС ($p = 0,070$). Однако нами выявлена ассоциация между отсутствием перипроцедурной динамики сократительной способности ЛЖ и высокой частотой госпитализаций по поводу СН в период наблюдения, а также развитием комбинированной конечной точки. Кроме того, нами выявлены предикторы отсутствия динамики ФВ ЛЖ у пациентов с первым ИМ: индекс нарушения локальной сократимости $>1,94$, КСО ЛЖ > 57 мл, КДР ЛЖ $> 5,1$ см, СДЛА > 27 мм рт. ст., уровень NT-proBNP > 530 пг/мл, соотношение скоростей трансмитрального кровотока в фазу раннего наполнения к кровотоку в систолу предсердий $>1,06$.

В литературных данных мы не обнаружили исследований, посвященных изучению перипроцедурной динамики ФВ ЛЖ у пациентов с первым ИМ и успешным ЧКВ и ее влиянию на прогноз развития ССО. Изучение динамики сократительной способности до и после ЧКВ в период госпитализации может иметь важное значение, поскольку частота ИМ не снижается, а приверженность к динамическому наблюдению у пациентов, а также его возможность не всегда оптимальны.

Оценка ФВ ЛЖ рекомендована у всех пациентов, поступивших с ОИМ (рекомендация класса 1); однако рекомендации менее ясны в отношении того, когда ФВ ЛЖ следует оценивать в динамике [2, 3]. Показано, что для получения прогностической информации можно использовать множество традиционных ЭхоКГ параметров, таких как объемы и ФВ ЛЖ, ИНЛС [27]. Наше исследование показывает, что у пациентов с первым ОИМ оценка линейных размеров ЛЖ, диастолической функции ЛЖ, динамическая оценка ФВ ЛЖ до и после ЧКВ может дать ценную информацию о долгосрочном прогнозе, исходах и потенциальной постоянной потребности в медикаментозной терапии.

Ограничения и перспективы исследования. Наше исследование было ограничено малой выборкой и относительно коротким сроком наблюдения. Существуют также неотъемлемые ограничения в отношении оценки ФВ ЛЖ при использовании ЭхоКГ. Однако было показано, что ЭхоКГ по сравнению с другими методами визуализации обеспечивает точную оценку ФВ ЛЖ и широко используется в клинических исследованиях. В нашей работе ЭхоКГ исследования были выполнены одним врачом на одном аппарате с последующей постобработкой на станции Echopac (General Electric Healthcare, США) с автоматической оценкой ФВ ЛЖ, что позволяет минимизировать внутриисследовательские погрешности [20, 21]. Очевидна необходимость многоцентрового клинического исследования, в котором изучалось бы значение перипроцедурной динамики ФВ ЛЖ у пациентов с первым ОИМ в отношении долгосрочного прогноза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с первым ИМ частота систолической дисфункции ЛЖ при поступлении составила 58,8%. Не имели улучшения сократительной функции ЛЖ после успешного ЧКВ 44,6% пациентов. Отсутствие улучшения ФВ ЛЖ связано со значительным увеличением риска госпитализации по поводу развития СН и наступления комбинированной точки. Таким образом, у пациентов с первым ОИМ и систолической дисфункцией ЛЖ целесообразна перипроцедурная оценка ФВ ЛЖ для стратификации риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Ye Q., Zhang J., Ma L. Predictors of all-cause 1-year mortality in myocardial infarction patients. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(29):e21288. DOI: 10.1097/MD.00000000000021288.
- Amsterdam E.A., Wenger N.K., Brindis R.G., Casey D.E. Jr., Ganiats T.G., Holmes D.R. Jr. et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014;64(24):e139–e228. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.09.017. Erratum in: *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014;64(24):2713–2714. Dosage error in article text. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.09.017.
- O’Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D., Casey D.E. Jr., Chung M.K., de Lemos J.A. et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013;127(4):e362–425. DOI: 10.1161/CIR.0b013e3182742cf6.
- Ibanez B., James S., Agewall S., Antunes M.J., Bucciarelli-Ducci C., Bueno H. et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2018;39(2):119–177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393.
- Ahnve S., Gilpin E., Dittrich H., Nicod P., Henning H., Carlisle J. et al. First myocardial infarction: age and ejection fraction identify a low-risk group. *Am. Heart J.* 1988;116(4):925–932. DOI: 10.1016/0002-8703(88)90142-1.
- Федорова Н.В., Герман А.И., Коков А.Н., Брель Н.К., Печерина Т.Б., Кашталап В.В. и др. Эхокардиографические корреляты фиброза миокарда у пациентов с инфарктом миокарда и сохранной фракцией выброса левого желудочка. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019;4(2):17–27. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-17-27.
- Гарганеева А.А., Борель Н.Н., Округин С.А., Кузнецова Е.А. Влияние фракции выброса левого желудочка на отдаленный прогноз пациентов, перенесших коронарную катастрофу. Анализ 5-летнего мониторинга в рамках популяционной программы «Регистр острого инфаркта миокарда». *Сердечная недостаточность*. 2014;15(4):218–223.
- Oh P.C., Choi I.S., Ahn T., Moon J., Park Y., Seo J.G. et al. Predictors of recovery of left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: from the Korean acute myocardial infarction registry and Korean myocardial infarction registry. *Korean Circ. J.* 2013;43(8):527–533. DOI: 10.4070/kcj.2013.43.8.527.
- Sjöblom J., Muhrbeck J., Witt N., Alam M., Frykman-Kull V. Evolution of left ventricular ejection fraction after acute myocardial infarction: implications for implantable cardioverter-defibrillator eligibility. *Circulation*. 2014;130(9):743–748. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009924.
- Жарикова Е.С., Виллеальде С.В., Кобалава Ж.Д. Предикторы неблагоприятного ремоделирования левого желудочка у пациентов, перенесших инфаркт миокарда. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2017;21(2):219–226. DOI: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-219-226.
- Chew D.S., Heikki H., Schmidt G., Kavanagh K.M., Dommasch M., Bloch Thomsen P.E. et al. Change in left ventricular ejection fraction following first myocardial infarction and outcome. *JACC Clin. Electrophysiol.* 2018;4(5):672–682. DOI: 10.1016/j.jacep.2017.12.015.

12. Chew D.S., Wilton S.B., Kavanagh K., Southern D.A., Tan-Mesiatowsky L.E., Exner D.V. et al. Left ventricular ejection fraction reassessment post-myocardial infarction: Current clinical practice and determinants of adverse remodeling. *Am. Heart J.* 2018;198:91–96. DOI: 10.1016/j.ahj.2017.11.014.
13. Ohashi J., Sakakura K., Yamamoto K., Taniguchi Y., Tsukui T., Seguchi M. et al. Determinants of improvement of mid-term ejection fraction in patients with acute myocardial infarction. *Int. Heart J.* 2019;60(6):1245–1252. DOI: 10.1536/ihj.19-126.
14. Minicucci M.F., Farah E., Fusco D.R., Cogni A.L., Azevedo P.S., Okoshi K. et al. Infarct size as predictor of systolic functional recovery after myocardial infarction. *Arq. Bras. Cardiol.* 2014;102(6):549–556. DOI: 10.5935/abc.20140051.
15. Wu W.Y., Biery D.W., Singh A., Divakaran S., Berman A.N., Ayuba G. et al. Recovery of left ventricular systolic function and clinical outcomes in young adults with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020;75(22):2804–2815. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.03.074.
16. Gupta A., Wang Y., Spertus J.A., Geda M., Lorenze N., Nkonde-Price C. et al. Trends in acute myocardial infarction in young patients and differences by sex and race, 2001 to 2010. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014;64(4):337–345. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.04.054.
17. Wilmot K.A., O'Flaherty M., Capewell S., Ford E.S., Vaccarino V. Coronary heart disease mortality declines in the United States from 1979 through 2011: Evidence for stagnation in young adults, especially women. *Circulation.* 2015;132(11):997–1002. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015293.
18. Yandrapalli S., Nabors C., Goyal A., Aronow W.S., Frishman W.H. Modifiable risk factors in young adults with first myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019;73(5):573–584. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.10.084.
19. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J., Morrow D.A. et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation.* 2018;138(20):e618–e651. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000617.
20. Belghithia H., Brette S., Lafitte S., Reant P., Picard F., Serri K. et al. Automated function imaging: a new operator-independent strain method for assessing left ventricular function. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2008;101(3):163–169. DOI: 10.1016/s1875-2136(08)71798-4.
21. Amundsen B.H., Helle-Valle T., Edvardsen T., Torp H., Crosby J. et al. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006;47(4):789–793. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.10.040.
22. Mamedov S., Kobalava Zh., Safarova A., Timofeeva T., Cabello F., Meray I. et al. Prognostic value of subclinical pulmonary congestion in patients with primary acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *Eur. J. Heart Fail.* 2021;23(S2):34–35.
23. Nagueh S.F., Smiseth O.A., Appleton C.P., Byrd B.F. 3rd, Dokainish H., Edvardsen T. et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2016;29(4):277–314. DOI: 10.1016/j.echo.2016.01.011.
24. Cohn J.N., Ferrari R., Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000;35(3):569–582. DOI: 10.1016/s0735-1097(99)00630-0.
25. Colvin M.M., Sutton N.R. Left ventricular recovery in young patients with myocardial infarction: How much is enough? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020;75(22):2816–2818. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.04.020.
26. Sutton N.R., Li S., Thomas L., Wang T.Y., de Lemos J.A., Enriquez J.R. et al. The association of left ventricular ejection fraction with clinical outcomes after myocardial infarction: Findings from the Acute Coronary Treatment and Intervention Outcomes Network (ACTION) Registry-Get With the Guidelines (GWTG) Medicare-linked database. *Am. Heart J.* 2016;178:65–73. DOI: 10.1016/j.ahj.2016.05.003.
27. Крикунов П.В., Васюк Ю.А., Крикунова О.В. Прогностическая значимость эхокардиографии после острого инфаркта миокарда. Часть 1. *Российский кардиологический журнал.* 2017;22(12):120–128. DOI: 10.15829/1560-4071-2017-12-120-128.
28. Gillam L.D., Leipsic J., Weissman N.J. Use of Imaging Endpoints in Clinical Trials. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 2017;10(3):296–303. DOI: 10.1016/j.jcmg.2016.12.003.

Вклад авторов

Тимофеева Т.М. – разработка концепции и дизайна, получение, анализ и интерпретация данных. Кобалава Ж.Д. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Сафарова А.Ф. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Кавельо Ф.Э. – анализ и интерпретация данных. Тигай Ж.Г. – проверка критически важного интеллектуального содержания.

Информация об авторах

Тимофеева Татьяна Михайловна – ассистент, кафедра внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева, РУДН; врач, отделение функциональной диагностики, ГКБ им. В.В. Виноградова, г. Москва, timtan@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6586-7404>

Кобалава Жанна Давидовна – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева, РУДН, г. Москва, zkobalava@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5873-1768>

Сафарова Айтен Фуад Кызы – д-р мед. наук, профессор кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева, РУДН; врач, отделение функциональной диагностики, ГКБ им. В.В. Виноградова, г. Москва, aytensaf@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2412-5986>

Кабельо Монтойа Флора Элиса – канд. мед. наук, ассистент, кафедра внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева, РУДН, г. Москва, flora.cabello@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2334-6675>

Тигай Жанна Геннадьевна – д-р мед. наук, профессор, директор Аккредитационно-симуляционного центра, РУДН, г. Москва, tigay_zhg@rudn.university, <https://orcid.org/0000-0001-6586-7404>

(✉) Тимофеева Татьяна Михайловна, timtan@bk.ru

Поступила в редакцию 29.06.2022;
одобрена после рецензирования 15.07.2022;
принята к публикации 08.09.2022

УДК 616.24-002.5:578.233.22

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-140-149>

Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких

Чурина Е.Г.^{1,2}, Попова А.В.¹, Уразова О.И.¹, Патышева М.Р.^{2,3}, Колобовникова Ю.В.¹, Чумакова С.П.¹

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 Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук

Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Цель работы – оценка экспрессии скавенджер-рецепторов (CD163, CD204, CD206) на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам.

Материалы и методы. Обследованы 64 пациента с туберкулезом легких (ТБ): 40 мужчин и 24 женщины, из которых 26 человек с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) и 38 – с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ). Из них было 42 пациента, выделяющих *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), чувствительные к основным противотуберкулезным средствам (ПТС), и 22 пациента, выделяющих МБТ, устойчивые к лекарственным средствам основного ряда противотуберкулезной терапии. 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 with gentamicin and phenol red 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 CD163, CD204, CD206 на проточном цитометре Beckman Coulter CytO FLEX LX. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0. Полученные результаты анализировали статистическими методами.

Результаты. Переключение фенотипа макрофагов с провоспалительного M1 на противовоспалительный M2, установленное нами в ходе настоящего исследования, способствует хроническому течению туберкулеза легких, диссеминации и персистенции инфекции. Мы проанализировали особенности экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких. Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов на макрофагах показал значимое увеличение численности CD163, CD204 и CD206-позитивных клеток у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к ПТС по сравнению с группой здоровых доноров.

Заключение. Исследование механизмов, лежащих в основе M1- или M2-активации макрофагов, необходимо для более глубокого понимания иммунопатогенеза туберкулезной инфекции и роли клеток врожденного иммунитета в защите организма от микобактерий. Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах позволил нам прийти к заключению, что при туберкулезе легких, особенно у больных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* и при инфильтративной форме заболевания, реализуются механизмы регуляции, подавляющие активацию врожденного иммунитета, с поляризацией дифференцировки макрофагов в направлении M2-фенотипа, что, вероятно, является причиной формирования иммунодефицита, индуцированного возбудителем.

Ключевые слова: макрофаги, туберкулез легких, врожденный иммунитет, иммунный ответ, скавенджер-рецепторы, IL-4, IFN γ , CD163, CD204, CD206

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. От каждого обследованного было получено добровольное информированное согласие на проведение исследования. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 5648 от 27.11.2017).

Для цитирования: Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Колобовникова Ю.В., Чумакова С.П. Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):140–149. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-140-140>.

Expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis

Churina E.G.^{1,2}, Popova A.V.¹, Urazova O.I.¹, Patysheva M.R.^{2,3}, Kolobovnikova Ju.V.¹, Chumakova S.P.¹

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

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the expression of scavenger receptors (CD163, CD204, CD206) on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis, depending on the clinical form of the disease and sensitivity of the pathogen to anti-tuberculosis drugs.

Materials and methods. 64 patients with pulmonary tuberculosis (TB) were examined: 26 patients with disseminated pulmonary tuberculosis (DTB) and 38 patients with infiltrative pulmonary tuberculosis (ITB). Of these, 42 patients secreted *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) sensitive to basic antituberculosis drugs (ATBD), and 22 patients secreted MBT resistant to first-line anti-TB drugs. Material for the study was venous blood.

To isolate monocytes from the whole blood in order to transform them into macrophages, Ficoll density gradient centrifugation with a density of 1.077 g / cm³ was used followed by immunomagnetic separation of CD14⁺ cells. Monocytes were cultured in the X-VIVO 10 medium with gentamicin and phenol red with the addition of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (5 ng / ml) at a concentration of 1×10⁶ cells / ml with stimulators: interleukin (IL)-4 (10 ng / ml) and interferon (IFN) γ (100 ng / ml). Immunophenotyping of macrophages was performed using monoclonal antibodies to CD163, CD204, and CD206 on the Beckman Coulter CytoFLEX LX Flow Cytometer. The analysis of the obtained data was carried out using the CytExpert 2.0 software. The results were analyzed using statistical methods.

Results. Switching the phenotype of macrophages from the M1-like proinflammatory phenotype to M2-like anti-inflammatory one contributes to the chronic course of pulmonary TB, dissemination, and persistence of infection. In the present study, we analyzed the features of the expression of CD163, CD204, and CD206 scavenger receptors on macrophages in patients with pulmonary TB. An increase in the number of macrophages carrying markers of the M2 subpopulation (CD163, CD204, and CD206) on their surface was noted, regardless of the clinical form of pulmonary TB and drug resistance of *M. tuberculosis*.

Conclusion. Studying the mechanisms underlying M1 or M2 activation of macrophages is necessary for a deeper understanding of the immunopathogenesis of TB and the role of innate immunity cells in protecting the body from mycobacteria. The analysis of the expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages

allowed to conclude that, in pulmonary TB, especially in patients with drug resistant *M. tuberculosis* and infiltrative TB, regulatory mechanisms that suppress the activation of innate immunity are implemented together with polarization of macrophage differentiation towards the M2 phenotype. It may be the cause of immune deficiency induced by the pathogen.

Keywords: macrophages, pulmonary tuberculosis, innate immunity, immune response, scavenger receptors, IL-4, IFN γ , CD163, CD204, CD206

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

Source of financing. The reported study was funded by the Council for Grants of the President of the Russian Federation for leading scientific schools (SS-2690.2018.7) and the RFBR grant, project number 19-315-90018.

Conformity with 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 Siberian State Medical University (Protocol No. 5648 of 27.11.2017).

For citation: Churina E.G., Popova A.V., Urazova O.I., Patysheva M.R., Kolobovnikova Ju.V., Chumakova S.P. Expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):140–149. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-140-149>.

ВВЕДЕНИЕ

Макрофаги играют важнейшую роль в защите организма от *Mycobacterium tuberculosis*. Они участвуют как во врожденных, так и в адаптивных иммунных реакциях, а также регулируют ремоделирование и процессы репарации поврежденных тканей [1, 2]. Макрофаги универсальны и пластичны, способны к быстрой конверсии функционального фенотипа в тканях [3–6]. Такая гетерогенность определяется свойством макрофагов реализовывать разные программы активации в ответ на различные стимулы: цитокиновые сигналы и сигналы, связанные с повреждением клетки или проникновением в организм паттернов патогенности.

В последнем Глобальном докладе ВОЗ о туберкулезе сообщается, что в 2018 г. снизилось число случаев смерти от туберкулеза – умерло 1,5 млн человек по сравнению с 1,6 млн в 2017 г. Тем не менее заболеваемость остается высокой: в 2018 г. около 10 млн человек в мире заболели туберкулезом [7]. Важная проблема – формирование у *M. tuberculosis* резистентности к противотуберкулезным средствам (ПТС). Вариант течения туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, когда *M. tuberculosis* не реагирует ни на один из существующих антибиотиков, зарегистрирован в 117 странах мира [8].

Дисрегуляция иммунного ответа при развитии туберкулеза легких (ТБ) возникает уже на самых ранних его этапах, прежде всего, на стадии активации макрофагов и презентации антигена Т-лимфоцитам-хелперам. Макрофаги играют важную роль в механизмах успешной реализации иммунной защиты при проникновении компонентов *M. tuberculosis* в

слизистые оболочки дыхательных путей. М1-макрофаги запускают острое воспаление легких с быстрым включением механизмов врожденного иммунитета, воспалительного и цитотоксического Т-клеточных иммунных ответов, вызывая развитие острых деструктивных клинко-патогенетических форм – инфильтративного и диссеминированного ТБ [9]. В дальнейшем иммунологический контроль инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, зависит от направления дифференцировки макрофагов и эффективности воспалительного клеточного иммунного ответа, реализуемого CD4⁺ Т-лимфоцитами-хелперами первого типа (Th1) [10–12]. Переключение фенотипа макрофагов на противовоспалительный – М2, способствует хронизации и персистенции туберкулезной инфекции. Механизмы врожденных иммунных реакций при ТБ требуют более подробного рассмотрения, прежде всего, с помощью анализа рецепторного репертуара макрофагов. Наибольший интерес представляют скавенджер-рецепторы («мусорщики») моноцитов и (или) макрофагов, к которым относят маннозный рецептор CD206, скавенджер-рецептор типа А – SR-A (CD204), мембранный маркер CD163 [12, 13–16]. Открытыми остаются многие вопросы, связанные с пластичностью, поляризацией и активацией макрофагов при различных клинических формах ТБ, а также в зависимости от устойчивости или чувствительности *M. tuberculosis* к ПТС.

Таким образом, целью работы явилась оценка экспрессии скавенджер-рецепторов (CD163, CD204, CD206) на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы обследованы 64 пациента (40 мужчин и 24 женщины) в возрасте 23–50 лет (средний возраст $43,10 \pm 10,0$ лет) с впервые выявленным туберкулезом легких, диагностированным в Томском областном фтизиопульмонологическом медицинском центре. Диагноз устанавливался на основании анамнеза, клинической картины заболевания, а также результатов рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты. Все пациенты были обследованы до назначения специфической противотуберкулезной химиотерапии. Клиническая форма заболевания устанавливалась с использованием рентгенологического исследования легких. У пациентов в патологический процесс были вовлечены преимущественно оба легких: при ИТБ в легких фиксировались одна или несколько неоднородных теней инфильтрата (3–6 см в диаметре), при ДТБ – множественные очаги мелких и средних размеров с неоднородной структурой. У всех пациентов регистрировалось бактериовыделение (*Mtb*+). *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) определяли методом микроскопии окрашенного по Цилю – Нильсену мазка мокроты, а также методом люминесцентной микроскопии с применением аурамина. С помощью метода абсолютных концентраций и посева мокроты на питательные среды Левенштейна – Йенсена и Финн-2 выявляли видовую принадлежность возбудителя туберкулеза, а также чувствительность *Mbt* к противотуберкулезным средствам (ПТС).

Больные ТБ были разделены на две группы в зависимости от клинической формы заболевания: 26 пациентов с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) и 38 пациентов с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ). У всех обследованных больных ТБ была определена лекарственная чувствительность возбудителя к основным ПТС. По данному критерию были выявлены 42 пациента, выделяющих *M. tuberculosis* (МВТ), чувствительные к основным ПТС, и 22 пациента, выделяющих МВТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). Критериями исключения больных ТБ из исследования являлись: 1) наличие онкологических заболеваний, сахарного диабета, аллергии и аутоиммунных заболеваний, вирусного гепатита и ВИЧ-инфекции; 2) лечение противотуберкулезными и иммуносупрессивными препаратами. Группу сравнения составили 30 здоровых доноров (20 мужчин и 10 женщин) в возрасте 23–50 лет (средний возраст $41,31 \pm 7,47$ лет), не имеющих в анамнезе туберкулеза легких. От каждого обследованного было получено до-

бровольное информированное согласие на проведение исследования.

Иммуномагнитная сепарация моноцитов крови. 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 30 мл забирали в вакуумные системы с антикоагулянтом (К₃-ЭДТА). Кровь разводили 1 : 1 PBS (фосфатно-солевым буфером) и наслаивали на 15 мл фиколла с плотностью 1,077 г/см³. Образцы центрифугировали 30 мин при 0,016 g. Полученную моноклеарную фракцию собирали и 2 раза отмывали PBS. После этого добавляли 5 мл PBS, перемешивали, затем подсчитывали 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 37 °C и 7,5% CO₂.

Имунофенотипирование 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-scaper, США) собирали клетки. Для иммунофенотипирования макрофагов добавляли моноклональные антитела к CD163, CD204, CD206 (eBioscience, США). Из-

мерение 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 медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1-Q_3)$. 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

Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах, *in vitro* трансформированных из CD14⁺-моноцитов крови, у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов на макрофагах показал значимое увеличение численности CD163- и CD206-позитивных клеток у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к ПТС по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 1, 2, рис. 1, 2).

Таблица 1

Экспрессия скавенджер-рецепторов на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %, $Me (Q_1-Q_3)$				
Маркеры макрофагов	Группы обследованных лиц	Условия культивирования макрофагов <i>in vitro</i>		
		Без стимуляции	При стимуляции IL-4	При стимуляции IFN γ
CD163	Здоровые доноры	12,43 (6,51–22,33)	4,11 (2,17–8,34) $p_3 = 0,011$	13,24 (7,41–16,71) $p_3 = 0,511$ $p_4 = 0,014$
	Больные ИТБ	44,23 (24,14–64,35) $p_1 = 0,012$	48,55 (27,31–59,54) $p_1 = 0,015$	26,70 (14,74–38,02) $p_1 = 0,010$ $p_3 = 0,011$ $p_4 = 0,027$
	Больные ДТБ	40,81 (25,42–61,27) $p_1 = 0,010$	26,30 (17,11–41,72) $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,027$ $p_3 = 0,011$	27,83 (16,01–34,73) $p_1 = 0,010$ $p_3 = 0,014$
CD204	Здоровые доноры	11,31 (6,75–20,14)	8,05 (4,11–17,76)	10,26 (7,11–19,33)
	Больные ИТБ	24,52 (14,27–34,36) $p_1 = 0,041$	40,83 (24,35–59,21) $p_1 = 0,017$ $p_3 = 0,037$	32,19 (16,14–50,36) $p_1 = 0,010$ $p_3 = 0,013$
	Больные ДТБ	9,56 (6,02–20,33) $p_2 = 0,014$	8,91 (5,63–21,30) $p_2 = 0,025$	19,62 (11,38–35,17) $p_1 = 0,017$ $p_2 = 0,011$ $p_3 = 0,045$ $p_4 = 0,037$
CD206	Здоровые доноры	17,16 (9,17–28,43)	13,4 (6,35–22,45)	4,41 (2,15–9,37) $p_3 = 0,017$ $p_4 = 0,035$
	Больные ИТБ	57,59 (28,12–68,18) $p_1 = 0,014$	58,27 (27,01–66,22) $p_1 = 0,037$	46,31 (26,45–61,27) $p_1 = 0,020$
	Больные ДТБ	33,01 (18,34–52,43) $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,021$	29,37 (19,17–44,36) $p_1 = 0,012$ $p_2 = 0,021$	23,44 (13,16–37,46) $p_1 = 0,037$ $p_2 = 0,014$ $p_3 = 0,012$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров – p_1 ; у больных ИТБ – p_2 ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции – p_3 ; – при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) – p_4 .

После добавления в культуру клеток IL-4 (M2-активация) у больных ИТБ экспрессия CD163 существенно не изменялась в сравнении с ее величиной в отсутствие цитокиновой стимуляции в отличие от

таковой у лиц контрольной группы и больных ДТБ, у которых она снижалась. В группе здоровых доноров численность CD163-позитивных макрофагов при M2-активации была в 3,2 раза ниже относительно

количества клеток при M1-активации (при индукции клеток $IFN\gamma$). У больных ДТБ экспрессия CD163 на макрофагах оказалась ниже, чем в отсутствие стимуляции, практически в 1,5 раза как при M1-, так и при M2-активации (см. табл. 1, см. рис. 1).

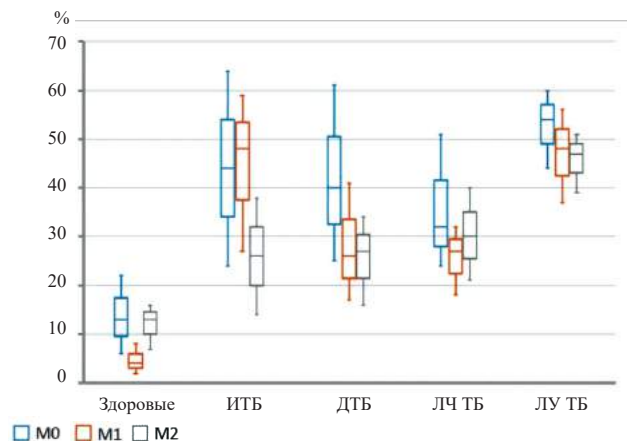


Рис. 1. Экспрессия скавенджер-рецептора CD163 на макрофагах у больных туберкулезом легких, $Me (Q_1-Q_3)$: ИТБ – инфильтративный туберкулез легких, ДТБ – диссеминированный туберкулез легких, ЛЧ ТБ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких, ЛУ ТБ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких, M0 – клеточная культура макрофагов без стимуляции цитокинами, M1 – клеточная культура макрофагов при стимуляции $IFN\gamma$, M2 – клеточная культура макрофагов при стимуляции IL-4 (здесь на рис. 2, 3)

Численность CD206-позитивных макрофагов при цитокиновой стимуляции у больных ИТБ существенно не изменялась в сравнении с базальным ее уровнем. У здоровых доноров и больных ДТБ экспрессия молекулы CD206 на макрофагах значительно снижалась в ответ на индукцию клеток $IFN\gamma$ по сравнению с интактной культурой (см. табл. 1, рис. 2).

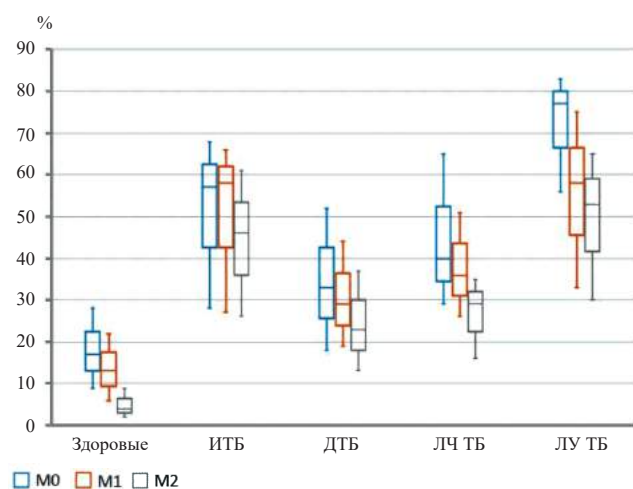


Рис. 2. Экспрессия скавенджер-рецептора CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких, $Me (Q_1-Q_3)$

Индукцированная экспрессия скавенджер-рецептора CD204 на макрофагах у больных ИТБ возрастала сравнительно с таковой без активации – более значительно после стимуляции культуры клеток IL-4, нежели $IFN\gamma$. В первом случае она возрастала в 5,1 раза по сравнению с ее величиной у здоровых доноров и в 4,6 раза – у больных ДТБ. У больных ДТБ, напротив, количество CD204-позитивных макрофагов в большей степени (более чем в 2 раза) увеличивалось в ответ на стимуляцию клеток $IFN\gamma$ относительно такового в контрольной группе и после индукции клеток IL-4 (см. табл. 1, рис. 3).

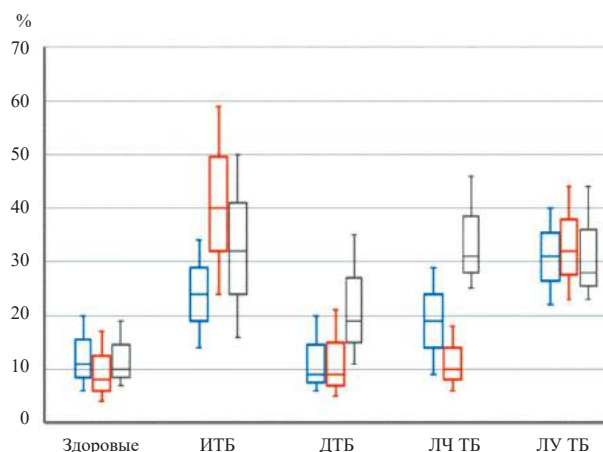


Рис. 3. Экспрессия скавенджер-рецептора CD204 на макрофагах у больных туберкулезом легких, $Me (Q_1-Q_3)$

Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах, *in vitro* трансформированных из CD14⁺-моноцитов крови, у больных туберкулезом легких в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам

При анализе экспрессии маркеров M2-активации на макрофагах у больных ТБ в зависимости от чувствительности возбудителя к ПТС установлено, что наиболее высокая экспрессия молекулы CD163 на макрофагах отмечалась у больных ЛУ ТБ – базальная и при стимуляции клеток обоими цитокинами. У больных ЛЧ ТБ при индукции цитокинами она существенно не изменялась в сравнении с базальным уровнем экспрессии CD163, но (как и у больных ЛУ ТБ) была выше, чем у здоровых доноров (табл. 2, см. рис. 1).

Максимальное количество CD206-позитивных макрофагов при культивировании клеток без стимуляции и при индукции цитокинами также обнаруживалось у больных ЛУ ТБ – оно было выше, чем в контрольной группе и у больных ЛЧ ТБ. Однако при ЛУ ТБ как при M1-, так и при M2-активации цитокинами число CD206⁺-макрофагов было ниже, чем их количество в культуре клеток без стимуляции (см. табл. 2, рис. 3).

Таблица 2

Экспрессия скавенджер-рецепторов на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности <i>M. tuberculosis</i> к ПТС, %, Me (Q_1 – Q_3)				
Маркеры макрофагов	Группы обследованных лиц	Условия культивирования макрофагов <i>in vitro</i>		
		Без стимуляции	При стимуляции IL-4	При стимуляции IFN γ
CD163	Здоровые доноры	12,43 (6,51–22,33)	4,11 (2,17–8,34) $p_3 = 0,012$	13,24 (7,41–16,71) $p_4 = 0,015$
	Больные DS PTB	32,52 (24,45–51,23) $p_1 = 0,031$	27,25 (18,12–32,65) $p_1 = 0,012$	30,56 (21,65–40,28) $p_1 = 0,024$
	Больные DR PTB	54,23 (44,23–60,56) $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,012$	48,77 (37,56–56,44) $p_1 = 0,024$ $p_2 = 0,043$	47,32 (39,11–51,22) $p_1 = 0,035$ $p_2 = 0,044$
CD204	Здоровые доноры	11,31 (6,75–20,14)	8,05 (4,11–17,76)	10,26 (7,11–19,33)
	Больные DS PTB	19,23 (9,54–29,11) $p_1 = 0,032$	10,26 (6,23–18,25)	31,33 (25,4–46,12) $p_1 = 0,031$ $p_3 = 0,012$ $p_4 = 0,032$
	Больные DR PTB	31,23 (22,56–40,12) $p_1 = 0,034$ $p_2 = 0,011$	32,44 (23,56–44,36) $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,023$	28,56 (23,54–44,2) $p_1 = 0,037$
CD206	Здоровые доноры	17,16 (9,17–28,43)	13,40 (6,35–22,45)	4,41 (2,15–9,37) $p_3 = 0,017$ $p_4 = 0,035$
	Больные DS PTB	40,13 (29,14–65,45) $p_1 = 0,012$	36,45 (26,17–51,45) $p_1 = 0,027$	29,03 (16,54–35,47) $p_1 = 0,015$ $p_3 = 0,014$
	Больные DR PTB	77,36 (56,45–83,12) $p_1 = 0,031$ $p_2 = 0,022$	58,36 (33,47–75,16) $p_1 = 0,010$ $p_2 = 0,025$ $p_3 = 0,013$	53,27 (30,45–65,44) $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,042$ $p_3 = 0,014$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров – p_1 ; у больных с DS PTB – p_2 ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции – p_3 ; при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) – p_4 .

Аналогичным образом на макрофагах при ЛУ ТБ регистрировалась наиболее высокая экспрессия CD204 – при культивировании клеток без стимуляции она была выше, чем в группе контроля и у больных ЛЧ ТБ. Вместе с тем при индукции клеток цитокинами она сохранялась на исходном уровне. Однако у больных ЛЧ ТБ после добавления в культуру макрофагов IFN γ (при M1-активации клеток) было выявлено увеличение экспрессии рецептора CD204 – в 1,6 раза сравнительно с базальным ее уровнем и в 3,1 раза – с M2-активацией и группой контроля (см. табл. 2, рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая эффективность активации врожденного иммунитета при ТБ играет решающую роль в развитии и исходах заболевания. Нарушения индуктивной фазы иммунного ответа часто связаны с формированием толерантности к антигену уже на стадии его презентации. В этом случае вместо активации макрофагов и их дифференциации в направлении M1-клеток происходит формирование толерогенного и противовоспалительного фенотипа M2. Мобилизация моноцитов и поступление их в системный кровоток

из костного мозга всегда обусловлены усиленной антигенной нагрузкой, запросом на резидентные макрофаги иммунной системы при развитии воспаления в легких. Все больше исследований о гетерогенности популяции макрофагов указывают на то, что своевременное переключение фенотипа макрофагов с M1 на M2 и наоборот влияет на клинический исход туберкулезной инфекции [17–20].

Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов на макрофагах в целом показал повышение числа клеток, несущих на поверхности маркеры фенотипа M2 (CD163, CD204 и CD206), независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* (см. табл. 1, 2, рис. 1–3).

Наибольшее количество CD163-позитивных макрофагов мы зарегистрировали у больных ИТБ, особенно при M2-активации клеток (при M1-активации, напротив, число CD163+ макрофагов снижалось по сравнению с таковым в отсутствие цитокиновой стимуляции клеток). При ЛУ ТБ численность CD163-позитивных макрофагов была выше, чем при ЛЧ ТБ, как в интактной культуре клеток, так и при стимуляции IL-4 и IFN γ (см. табл. 1, 2, рис. 1). Известно, что рецептор «поглотитель гемоглобина» CD163

экспрессируется моноцитами и преимущественно макрофагами фенотипа M2 [21]. Поверхностный рецептор CD163 на макрофагах функционирует как рецептор врожденного иммунитета для распознавания паттернов патогенности бактерий, а его гиперэкспрессия может быть механизмом снижения острой тяжелой воспалительной реакции [22]. Логично, что макрофаги, экспрессирующие CD163, должны обладать регуляторным и восстановительным потенциалом для своевременного ограничения иммунного ответа, повреждающего ткани.

Оценивая экспрессию CD204 на макрофагах у больных ТБ, мы определили ее наибольшую интенсивность при ИТБ по сравнению с диссеминированной формой заболевания, при которой экспрессия маркера CD204 повышалась только в случае M1-активации клеток. Лекарственная чувствительность или устойчивость микобактерий не влияла на выраженность экспрессии молекулы CD204 – и в том, и в другом случае она повышалась (см. табл. 1, 2, рис. 2).

CD204 – акцепторный скавенджер-рецептор класса А (SR-A). В основном он экспрессируется на макрофагах, дендритных клетках и эпителиальных клетках дыхательных путей, является многофункциональным рецептором с широким лиганд-связывающим потенциалом [23, 24]. CD204 распознает модифицированные липидные белки, апоптотические клетки, патоген-ассоциированные молекулы [25]. Исследования CD204-нокаутных мышей показали, что экспрессия CD204 играет важную роль в поляризации дифференцировки макрофагов в направлении M2-фенотипа за счет ингибирования передачи сигналов через TLR [26].

Молекула CD206 представляет собой лектин C-типа или маннозный рецептор класса 1 (MR1), который обычно экспрессируется на тканевых макрофагах, дендритных клетках, эндотелиоцитах. Он связывает структуры с высоким содержанием маннозы на поверхности потенциально патогенных бактерий, вирусов и грибов [27]. CD206 играет важную роль в иммунном гомеостазе. Высокая экспрессия этого рецептора обнаруживается на клетках микроокружения злокачественных опухолей. Нарастание количества CD206-позитивных опухоль-ассоциированных макрофагов связано с плохим прогнозом заболевания и свидетельствует о развитии хронического воспаления в метастатических нишах [28]. У обследованных нами пациентов экспрессия маркера CD206 на макрофагах была наиболее выраженной при ИТБ и ЛУ ТБ, однако в последнем случае число CD206-позитивных клеток снижалось при индукции культуры как M1-, так и M2-стимуляторами (см. табл. 1, 2, рис. 3).

В литературе имеются данные о том, что популяция макрофагов, участвующих в борьбе с *M. tuberculosis*, неоднородна [4, 29]. Изучены различные механизмы, с помощью которых антиген преобразовывает макрофаги из M1-клеток в M2-клетки с их иммунорегуляторной активностью, тем самым создавая себе благоприятную среду для существования. В исследовании, проведенном на модели стафилококковой легочной инфекции у мышей, было отмечено, что *Staphylococcus aureus* индуцирует сигнальный путь Akt1 (Akt1 – protein kinase B), сдвигая поляризацию макрофагов с антимикробного фенотипа M1 в направлении функционально инертного типа M0 [30]. В другой работе показано, что *M. tuberculosis* секретируют факторы вирулентности LAM (липоарабиноманнан) и ESAT-6, которые ингибируют активацию M1-макрофагов посредством блокирования созревания фаголизосом и активации of nuclear factor κ B (NF- κ B) [17].

Таким образом, высокая экспрессия скавенджер-рецепторов на макрофагах при туберкулезе легких может быть связана с предрасположенностью больных к реализации, в первую очередь, регенераторных и противовоспалительных функций макрофагов и их дифференциации по пути M2-фенотипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов, лежащих в основе M1- или M2-активации макрофагов, необходимо для более глубокого понимания иммунопатогенеза туберкулезной инфекции и роли клеток врожденного иммунитета в защите организма от микобактерий. Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах позволил нам прийти к заключению, что при туберкулезе легких, особенно у больных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* и при инфильтративной форме заболевания, реализуются механизмы регуляции, подавляющие активацию врожденного иммунитета, с поляризацией дифференцировки макрофагов в направлении M2-фенотипа, что, вероятно, является причиной формирования иммунодефицита, индуцированного возбудителем.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Davies L.C., Taylor P.R. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*. 2015;144(4):541–548. DOI: 10.1111/imm.12451.
2. Mills C.D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 2012;32(6):463–488. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10.
3. Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* 2019;106(2):275–282. DOI: 10.1002/JLB.MR0318-095RR.

4. Guillems M., Svedberg F.R. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Review Nat. Immunol.* 2021;22(2):118–127. DOI: 10.1038/s41590-020-00849-2.
5. Cheah F.C., Presicce P., Tan T.L., Carey B.C., Kallapur S.G. Studying the effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on fetal lung macrophages during the perinatal period using the mouse model. *Front. Pediatr.* 2021;9:614209. DOI: 10.3389/fped.2021.614209.
6. Global tuberculosis report. Health Organization Report. Geneva, 2019. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-report-2019>.
7. Global tuberculosis report World Health Organization Report. Geneva, 2018. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>.
8. Leopold Wager C.M., Arnett E., Schlesinger L.S. Macrophage nuclear receptors: Emerging key players in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007585. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007585.
9. Santos J.H.A., Bühner-Sékula S., Melo G.C., Cordeiro-Santos M., Pimentel J.P.D., Gomes-Silva A. et al. *Ascaris lumbricoides* coinfection reduces tissue damage by decreasing IL-6 levels without altering clinical evolution of pulmonary tuberculosis or Th1/Th2/Th17 cytokine profile. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019;52:e20190315. DOI: 10.1590/0037-8682-0315-2019.
10. Zhai W., Wu F., Zhang Y., Fu Y., Liu Z. The Immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(2):340. DOI: 10.3390/ijms20020340.
11. Shim D., Kim H., Shin S.J. *Mycobacterium tuberculosis* infection-driven foamy macrophages and their implications in tuberculosis control as targets for host-directed therapy. *Front. Immunol.* 2020;11:910. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00910.
12. Maler M.D., Nielsen P.J., Stichling N., Cohen I., Ruzsics Z., Wood C. et al. Role of the scavenger receptor MARCO in mediating adenovirus infection and subsequent innate responses of macrophages. *mBio.* 2017;8(4):e00670–17. DOI: 10.1128/mBio.00670-17.
13. Gayer F.A., Reichardt S.D., Bohnenberger H., Engelke M., Reichardt H.M. Characterization of testicular macrophage subpopulations in mice. *Immunol. Lett.* 2022;243:44–52. DOI: 10.1016/j.imlet.2022.02.003.
14. Prabhu Das M.R., Baldwin C.L., Bollyky P.L., Bowdish D.M.E., Drickamer K., Febbraio M. et al. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J. Immunol.* 2017;198(10):3775–3789. DOI: 10.4049/jimmunol.1700373.
15. Wong C.K., Smith C.A., Sakamoto K., Kaminski N., Koff J.L., Goldstein D.R. Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice. *J. Immunol.* 2017;199(3):1060–1068. DOI: 10.4049/jimmunol.1700397.
16. Wolfsberger J., Sakil H.A.M., Zhou L., van Bree N., Baldissari E., Ferreira S.S. et al. TAp73 represses NF- κ B-mediated recruitment of tumor-associated macrophages in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2021;118(10):e2017089118. DOI: 10.1073/pnas.2017089118.
17. Pisu D., Huang L., Narang V., Theriault M., Lê-Bury G., Lee B. et al. Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *J. Exp. Med.* 2021;218(9):e20210615. DOI: 10.1084/jem.20210615.
18. Rocha D.M.G.C., Magalhães C., Cá B., Ramos A., Carvalho T., Comas I. et al. Heterogeneous streptomycin resistance level among mycobacterium tuberculosis strains from the same transmission cluster. *Front. Microbiol.* 2021;12:659545. DOI:10.3389/fmicb.2021.659545.
19. Marino S., Cilfone N.A., Mattila J.T., Linderman J.J., Flynn J.L., Kirschner D.E. Macrophage polarization drives granuloma outcome during Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect. Immun.* 2015;83(1):324–338. DOI: 10.1128/IAI.02494-14.
20. Weaver L.K., Hintz-Goldstein K.A., Pioli P.A., Wardwell K., Qureshi N., Vogel S.N. et al. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Leukoc. Biol.* 2006;80(1):26–35. DOI: 10.1189/jlb.1205756.
21. Fabrick B.O., van Bruggen R., Deng D.M., Ligtenberg A.J.M., Nazmi K., Schornagel K. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009;113(4):887–892. DOI: 10.1182/blood-2008-07-167064.
22. Dieudonné A., Torres D., Blanchard S., Taront S., Jeannin P., Delneste Y. et al. Scavenger receptors in human airway epithelial cells: role in response to double-stranded RNA. *PLoS One.* 2012;7(8):e41952. DOI: 10.1371/journal.pone.0041952.
23. Canton J., Neculai D., Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13(9):621–634. DOI: 10.1038/nri3515.
24. Kubota K., Moriyama M., Furukawa S., Rafiul H.A.S.M., Maruse Y., Jinno T. et al. CD163⁺CD204⁺ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1755. DOI: 10.1038/s41598-017-01661-z.
25. Komohara Y., Takemura K., Lei X.F., Sakashita N., Harada M., Suzuki H. et al. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to upregulation of nitric oxide and interferon-gamma production by tumor-associated macrophages. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2160–2166. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01296-x.
26. Barreto-Bergter E., Figueiredo R.T. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014;4:145. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00145.
27. Azad A.K., Rajaram M.V., Schlesinger L.S. Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. *J. Cytol. Mol. Biol.* 2014;1(1):1000003. DOI: 10.13188/2325-4653.1000003.
28. Kaku Y., Imaoka H., Morimatsu Y., Komohara Y., Ohnishi K., Oda H. et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014;9(1):e87400. DOI: 10.1371/journal.pone.0087400.
29. Weiss G., Schaible U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 2015;264(1):182–203. DOI: 10.1111/imr.12266.
30. Xu F., Kang Y., Zhang H., Piao Z., Yin H., Diao R. et al. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 2013;208(3):528–538. DOI: 10.1093/infdis/jit177.

Вклад авторов

Чурина Е.Г. – разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи. Попова 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. Колобовникова Ю.В. – взаимодействие с пациентами, консультирование соавторов по вопросам фтизиатрии и пульмонологии. Чумакова С.П. – взаимодействие с пациентами, обеспечение забора биоматериала.

Информация об авторах

Чурина Елена Георгиевна – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ; профессор кафедры природных соединений, фармацевтической и медицинской химии, НИ ТГУ, г. Томск, Lena1236@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8509-9921>

Попова Анжелика Владимировна – аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, anjelika.sitnikova@yandex.ru

Уразова Ольга Ивановна – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, urazova72@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Патышева Марина Ринатовна – мл. науч. сотрудник, лаборатория биологии опухолевой прогрессии, НИИ онкологии Томского НИМЦ; мл. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск, marinapatysh@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5758-7330>

Колобовникова Юлия Владимировна – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, kolobovnikova.julia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7156-2471>

Чумакова Светлана Петровна – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, chumakova_s@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

(✉) Чурина Елена Георгиевна, Lena1236@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2022;
одобрена после рецензирования 06.05.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616.24:[616.98:578.834.1-036.21]-022.14-073.432.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-150-159>

Ультразвуковая диагностика COVID-19-ассоциированных пневмоний

Балабанова А.А., Куражов А.П., Завадовская В.Д.

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

РЕЗЮМЕ

В течение последних десятилетий ультразвуковая диагностика заболеваний легких получила широкое распространение. Ультразвуковое исследование (УЗИ) имеет ряд преимуществ: отсутствие лучевой нагрузки, получение изображения в режиме реального времени, отчетливая визуализация субплевральных отделов легких и реберно-диафрагмальных синусов, которые дают возможность использовать ультразвук для динамики пневмонии у детей и беременных женщин. В условиях пандемии COVID-19 УЗИ легких получило широкое применение в связи с высокой диагностической эффективностью, сопоставимой по ряду показателей с классической рентгенографией и рентгеновской компьютерной томографией.

Излагается методика УЗИ легких, ультразвуковая картина COVID-19-ассоциированных пневмоний. Предоставлен обзор литературы, согласно которой выявлены степени тяжести пневмонии в зависимости от ультразвуковой картины и необходимость использования УЗИ легких.

Указано, что недостаточно изучены информация об оценке ультразвуковой картины легких в динамике при различных вариантах течения коронавирусной инфекции, а также многие вопросы методического характера, включая периодичность и частоту динамического УЗИ легких.

Ключевые слова: ультразвуковое исследование, пневмония, COVID-19, интерстициальный синдром, белое легкое, консолидация, В-линии, плевральная линия

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Балабанова А.А., Куражов А.П., Завадовская В.Д. Ультразвуковая диагностика COVID-19-ассоциированных пневмоний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):150–159. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-150-159>.

Lung ultrasound in the diagnosis of COVID-19-associated pneumonia

Balabanova A.A., Kurazhov A.P., Zavadovskaya V.D.

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

ABSTRACT

Over the past decades, lung ultrasound in the diagnosis of lung diseases has become widespread. Ultrasound examination has a number of advantages (no radiation exposure, real-time imaging, clear visualization of

✉ Куражов Алексей Петрович, kurazhovap@mail.ru

the subpleural lung regions and costophrenic angles), which make it possible to use ultrasound to monitor the dynamics of pneumonia in children and pregnant women. Currently, in the context of the COVID-19 pandemic, lung ultrasound is widely used due to its high diagnostic efficiency, which is comparable with classical radiography and X-ray computed tomography (CT) by a number of parameters.

The article describes the method of lung ultrasound and the radiographic pattern of COVID-19-associated pneumonia. It also provides a review of the literature, according to which the severity of pneumonia was determined, depending on the radiographic pattern, and the need for a lung ultrasound was identified.

The article indicates that information on assessment of the radiographic pattern of the lungs at runtime in different variants of the course of coronavirus infection, as well as many methodological issues, including the frequency of second-look lung ultrasound, has not been sufficiently studied.

Keywords: ultrasound, pneumonia, COVID-19, interstitial syndrome, white lung, consolidation, B-lines, pleural line

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Balabanova A.A., Kurazhov A.P., Zavadovskaya V.D. Lung ultrasound in the diagnosis of COVID-19-associated pneumonia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):150–159. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-150-159>.

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусная инфекция (COVID-19) 2019-nCoV [1–3] – потенциально тяжелая острая респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV) [4]. Представляет собой опасное заболевание [3], которое может протекать как в форме острой респираторной вирусной инфекции легкого течения [5, 6], так и в тяжелой форме [7]. Наиболее частым осложнением заболевания является вирусная пневмония, способная приводить к острому респираторному дистресс-синдрому и последующей острой дыхательной недостаточности, при которых чаще всего необходимы кислородная терапия и респираторная поддержка [8].

Для выявления COVID-19-ассоциированных пневмоний, их осложнений, дифференциальной диагностики с другими заболеваниями легких, а также для определения степени их выраженности, течения в динамике и оценки эффективности проводимой терапии применяются методы медицинской визуализации [6]. К основным методам лучевой диагностики патологии органов грудной клетки (ОГК) пациентов с предполагаемой или установленной COVID-19-ассоциированной пневмонией относят рентгеновскую компьютерную томографию (КТ) легких, обзорную рентгенографию органов грудной клетки (РОГК), ультразвуковое исследование (УЗИ) легких и плевральных полостей.

Золотым стандартом лучевой диагностики при исследовании пациентов с предполагаемой или

подтвержденной пневмонией при COVID-19 является КТ. Так, установлено, что специфичность КТ в отличие от УЗИ и РОГК в определенных выборках пациентов может достигать 100% [9]. Вместе с тем следует учитывать, что специфичность КТ в диагностике COVID-19-ассоциированных поражений легких могут снижать многие заболевания инфекционной и неинфекционной природы, такие как ВИЧ-ассоциированные поражения легких различной этиологии и интерстициальные болезни легких [10, 11]. Типичными изменениями легких, по данным КТ, при COVID-19-ассоциированных пневмониях являются двусторонние рассеянные участки уплотнения легочной ткани по типу матового стекла, расположенные субплеврально, или участки ее консолидации неправильной, иногда округлой формы с преимущественно периферическим характером их распределения в легких, которые появляются при присоединении бактериальной флоры [12].

В Российской Федерации, согласно Временным методическим рекомендациям Российского общества рентгенологов и радиологов и Российской ассоциации специалистов по ультразвуковой диагностике в медицине, в условиях большого потока пациентов с COVID-19 для быстрой оценки патологических изменений в легких, выявляемых на КТ, рекомендована так называемая эмпирическая визуальная шкала. Она основана на визуальной оценке примерного объема уплотненной легочной ткани и характере ее изменений [13]. Данная шкала имеет пять градаций (табл. 1).

Таблица 1

Визуальная шкала степени поражения легких, выявляемых на КТ	
Степень поражения легких	Характеристика
КТ-0	Норма и отсутствие КТ-признаков вирусной пневмонии на фоне типичной клинической картины и релевантного эпидемиологического анамнеза
КТ-1	Легкая степень – зоны уплотнения по типу матового стекла. Вовлечение паренхимы легкого $\leq 25\%$
КТ-2	Среднетяжелая степень – зоны уплотнения по типу матового стекла. Вовлечение паренхимы легкого 25–50%
КТ-3	Тяжелая степень – зоны уплотнения по типу матового стекла, зоны консолидации. Вовлечение паренхимы легкого 50–75%
КТ-4	Критическая степень – диффузное уплотнение легочной ткани по типу матового стекла и консолидации в сочетании с ретикулярными изменениями. Гидроторакс. Вовлечение паренхимы легкого $\geq 75\%$

На сегодняшний день данная шкала является основой для установления степени выраженности морфологических изменений легких у пациентов с COVID-19-ассоциированными пневмониями, а ее высокая эффективность доказана широким использованием в клинической практике. Единственным ограничивающим фактором проведения КТ является невозможность ее использования у пациентов, находящихся в палатах интенсивной терапии на аппаратах искусственной вентиляции легких (ИВЛ).

Другим часто используемым методом лучевой диагностики в выявлении COVID-19-ассоциированных пневмоний является рутинная РОГК [14]. Данный метод обладает меньшей диагностической эффективностью, но в виду большей доступности и меньшей себестоимости нашел широкое распространение во время пандемии COVID-19 [15]. Типичными изменениями на РОГК при COVID-19 являются множественные сливающиеся друг с другом диффузные периферические бесформенные или округлой формы затемнения, локализованные преимущественно в нижних долях обоих легких [16].

В течение последних десятилетий одним из актуальных вопросов ультразвуковой диагностики является оценка диагностической информативности УЗИ при заболеваниях легких [17–20]. Установлено, что данная модальность может иметь высокую диагностическую ценность в оценке некоторых заболеваний легких и в определенных клинических ситуациях по чувствительности и специфичности превосходить рентгенологическое исследование органов грудной клетки [21]. Например, результаты

работ российских исследователей свидетельствуют о большей точности УЗИ по сравнению с рентгенографией легких в диагностике пневмоний у детей, и эти же авторы приводят данные о том, что в некоторых случаях УЗИ может конкурировать с КТ, например в диагностике абсцесса легкого [22]. Кроме этого, УЗИ легких получило достаточно широкое применение в мониторингировании патологических процессов, связанных с легочной тканью, включая кардиогенный отек, пневмоторакс, плевральный выпот, ателектаз, пневмонии и периферические объемные образования [23–27]. Ряд других публикаций также свидетельствует о том, что в последние десятилетия УЗИ широко востребовано в диагностике различных заболеваний легких, включающих, помимо вышеперечисленных, эмфизему и заболевания плевры [17–19, 28–30].

Считается, что УЗИ легких у пациентов с предполагаемой или известной COVID-19-ассоциированной пневмонией является дополнительным методом визуализации, который не заменяет и не исключает проведение РОГК и КТ как традиционных лучевых модальностей, обладающих высокой информативностью, доказанной многолетней клинической практикой. В связи с этим УЗИ легких не включено в клинические рекомендации и стандарты оказания медицинской помощи по диагностике и лечению внебольничной пневмонии [5, 13]. Отчасти это обусловлено тем, что результативность УЗИ в значительной степени зависит от имеющегося опыта и квалификации врача, проводящего исследование.

Многие исследователи приводят данные о том, что в диагностике COVID-19-ассоциированных пневмоний УЗИ может конкурировать по точности с КТ [31, 32] и в некоторых аспектах превосходить классическую рентгенографию [33]. Так, согласно исследованию R. Gibbons и соавт. [33], чувствительность УЗИ в выявлении внутрилегочных изменений при COVID-19 составила 97,6%, а классической рентгенографии ОГК – только 69,9%. Однако при этом УЗИ легких оказалось менее специфичным, чем РОГК (33,3 и 44,4% соответственно). Данная работа основывалась на результатах исследования 143 пациентов в возрасте от 18 лет и старше с симптомами COVID-19 (все зарегистрированные пациенты имели температуру тела 38 °C или выше, частота сердечных сокращений 100 уд./мин или выше, частота дыхательных движений 16 или больше, SpO₂ менее 94% в сочетании с кашлем, одышкой, миалгией, недомоганием, агевзией и аносмией).

Также ранее установлено, что с помощью УЗИ легких можно контролировать течение пневмонии непосредственно у постели больного, в том числе

находящегося на ИВЛ [34]. Дополнительным преимуществом УЗИ легких в виду отсутствия лучевой нагрузки является возможность его использования при обследовании беременных женщин [35], у которых COVID-19-ассоциированные пневмонии могут протекать более тяжело [28, 36, 37]. При помощи УЗИ можно выявлять начальные признаки поражения легких, вызванного SARS-CoV-2, что особенно актуально при сортировке пациентов в приемных отделениях лечебных учреждений различных профилей. Нарастание интенсивности интерстициальных изменений в легочной ткани вплоть до появления ультразвуковой картины «белого легкого» может быть предиктором необходимости в интубации и переводе пациентов на принудительную ИВЛ [31]. В таких случаях УЗИ легких может активно влиять на лечебную тактику, позволяя сокращать время принятия соответствующих решений, что весьма важно, учитывая возможность стремительного ухудшения состояния пациентов с COVID-19 [34].

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕГКИХ

Стандартное УЗИ легких выполняется в В-режиме микроконвексным датчиком с частотой 5 МГц. Вместе с тем допустимо использованием линейного или конвексного датчика в частотных диапазонах 5–15 МГц и 3–5 МГц соответственно [17, 38]. Линейный датчик применяется для детализации и лучшей визуализации скопления висцеральной плевры и поиска альвеолярной консолидации [18]. В зависимости от тяжести состояния пациента исследование может быть проведено в вертикальном положении, в положении сидя или лежа. Считается, что если пациент находится на ИВЛ или в положении на животе (в прон-позиции), то необходимо сканировать доступные участки грудной клетки и отметить эту особенность проведения ультразвукового исследования в его протоколе [39].

На сегодняшний день разработана и активно используется стандартная методика УЗИ легких [40]. В 2008 г. D. Lichtenstein разработал так называемый BLUE-протокол, представляющий собой алгоритмический подход к исследованию легких при острой респираторной патологии [18]. Его ценность заключается в том, что он позволяет получить основную диагностическую информацию при максимальной простоте выполнения исследования за короткий промежуток времени. Основным принцип BLUE-протокола – простая сонографическая оценка легких. При подозрении на тромбоэмболию ветвей легочных артерий (ТЭЛА) данный протокол может

быть расширен за счет упрощенного исследования вен нижних конечностей и эхокардиографии, проводимых с целью нахождения тромбов внелегочной локализации как возможных источников ТЭЛА. Исследование только передних зон позволяет в течение нескольких секунд подтвердить или исключить такие состояния, как пневмоторакс и отек легких. При отсутствии ультразвуковых признаков пневмоторакса и отека легких далее, согласно диагностическому алгоритму, исследуются вены нижних конечностей, латеральные и задние зоны легких для диагностики возможной инфаркт-пневмонии и плеврального выпота [18]. Сонографическими признаками ТЭЛА могут являться консолидация легочной ткани, преимущественно клиновидной или округлой формы, наличие жидкости, расположенной непосредственно над субплеврально пораженной легочной тканью, и локальные интерстициальные изменения [41].

Согласно BLUE-протоколу [18], при проведении стандартного УЗИ легких с целью диагностики внутрилегочных поражений грудная клетка условно делится на 12 зон. Справа и слева поверхность грудной клетки разделяется на переднюю, боковую и заднюю, каждая из которых в свою очередь – на верхнюю и нижнюю области (табл. 2). Затем датчик ультразвукового аппарата устанавливается перпендикулярно ребрам или параллельно в межреберные промежутки и сканируются все зоны, доступные для осмотра [18].

Таблица 2

Зоны и анатомические ориентиры при УЗИ легких			
Поверхность	Вертикальные границы	Зона	Горизонтальные границы
Передняя	От парастернальной до передней подмышечной линии	Верхняя	От надключичной области до IV ребра
		Нижняя	От IV ребра до диафрагмального синуса
Боковая	От передней подмышечной до задней подмышечной линии	Верхняя	От подмышечной ямки до IV ребра
		Нижняя	От IV ребра до диафрагмального синуса
Задняя	От задней подмышечной до паравerteбральной линии	Верхняя	От II ребра до нижнего угла лопатки
		Нижняя	От нижнего угла лопатки до диафрагмального синуса

Для минимизации риска заражения коронавирусом COVID-19 медицинского персонала, УЗИ легких предпочтительно выполнять непосредственно в палате больного быстро и по

предварительно выверенному протоколу, используя портативный аппарат. При исследовании пациентов с легкой или средней степенью тяжести заболевания для уменьшения затрат времени УЗИ легких выполняется в вертикальном положении с запрокинутыми за голову руками.

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ КАРТИНА ЛЕГКИХ В НОРМЕ

В норме легочная ткань визуализируется в межреберных промежутках и на диагностических изображениях представлена множественными параллельным гиперэхогенными линиями (называемыми А-линиями), ассоциированными со скольжением легкого и обусловленными движениями висцеральной плевры [18]. А-линии располагаются непосредственно под плевральной линией, которая, в свою очередь, в норме имеет вид тонкой гиперэхогенной полоски (рис. 1). Также в норме при ультразвуковом осмотре могут выявляться единичные В-линии (не более трех в одном межреберном промежутке), представляющие собой гиперэхогенные линейные вертикальные артефакты типа «хвоста кометы», идущие от плевральной линии [17, 18] (рис. 2).

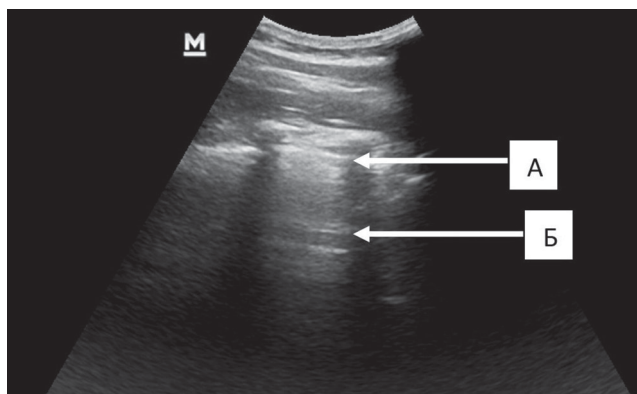


Рис. 1. УЗ-картина неизменной легочной ткани: А – плевральная линия, Б – множественные параллельные белые А-линии

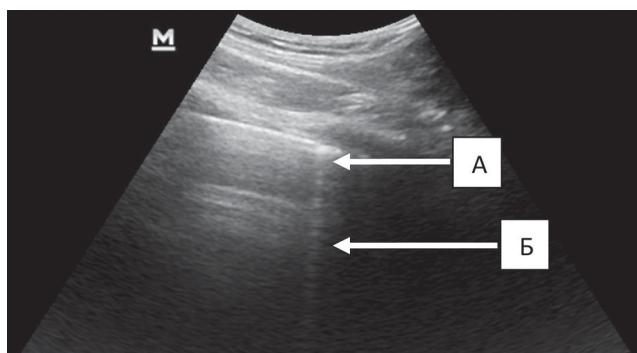


Рис. 2. УЗ-картина неизменной легочной ткани с единичной вертикальной В-линией: А – плевральная линия, Б – единичная В-линия

В-линии возникают вследствие реверберации между висцеральной плеврой и воздухом в поверхностных альвеолах легкого и в результате отека субплевральных междолевых перегородок (*subpleural interlobular septa*) [18].

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ СЕМИОТИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19-АССОЦИИРОВАННЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

Впервые ультразвуковая семиотика поражения легких при COVID-19 была описана учеными из Китая [42]. Согласно их результатам, основными ультразвуковыми признаками поражения легких при COVID-19-ассоциированных пневмониях явились: 1) утолщение, неравномерность костальной плевры; 2) различные варианты В-паттернов в виде фокусных, сливных или мультифокальных В-линий; 3) консолидации легочной ткани – субплевральные, лобарные, возможно, с аэробронхограммами (яркими гиперэхогенными элементами, представляющими собой включения воздуха в бронхиолах); 4) небольшой редко встречающийся плевральный выпот [42].

На сегодняшний день считается, что качественными ультразвуковыми признаками поражения легочной ткани при COVID-19-ассоциированных пневмониях являются: 1) интерстициальный синдром; 2) синдром «белого легкого» и 3) консолидация легочной ткани [43, 44] (рис. 3–5).

Ультразвуковая картина интерстициального синдрома включает в себя визуализацию более трех вертикальных В-линий в одном межреберном промежутке. Считается, что интерстициальный синдром является следствием инфекционно-воспалительного процесса, поражающего интерстиций [45]. При этом В-линии обычно более выражены в нижних зонах с одинаковым распределением с обеих сторон, а передние и верхние боковые зоны легких поражаются в меньшей степени. Также в рамках интерстициального синдрома, помимо появления множественных В-линий, при УЗИ легких определяется утолщение плевральной линии (рис. 3) [18]. Этот синдром возникает из-за локальных изменений акустических свойств легкого, вызванных изменениями плотности и появлением отека субплевральной легочной ткани [46–48].

Под ультразвуковой картиной синдрома «белого легкого» принято понимать визуализацию мультифокальных сливных В-линий, поскольку установлено, что увеличение их числа отражает повышение количества внесосудистой жидкости в легких. Это наблюдается при интерстициальном отеке [49, 50].

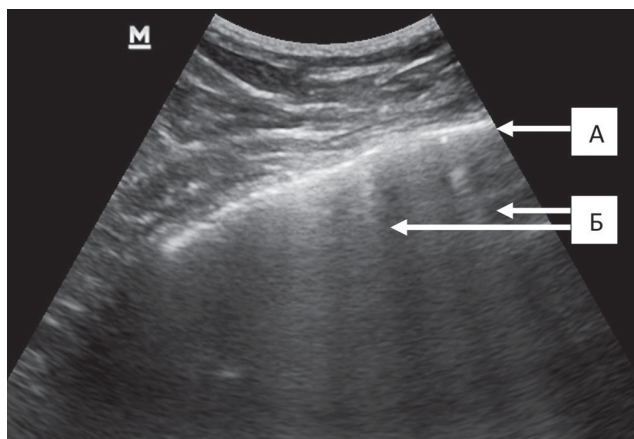


Рис. 3. УЗ-картина интерстициального синдрома у пациента с COVID-19-ассоциированной пневмонией: А – утолщенная плевральная линия с неровными контурами, Б – множественные вертикальные В-линии

Диффузное «белое легкое» характеризуется альвеолярно-интерстициальным синдромом, т.е. наличием как альвеолярного, так и интерстициального отека легких [18] (рис. 4).

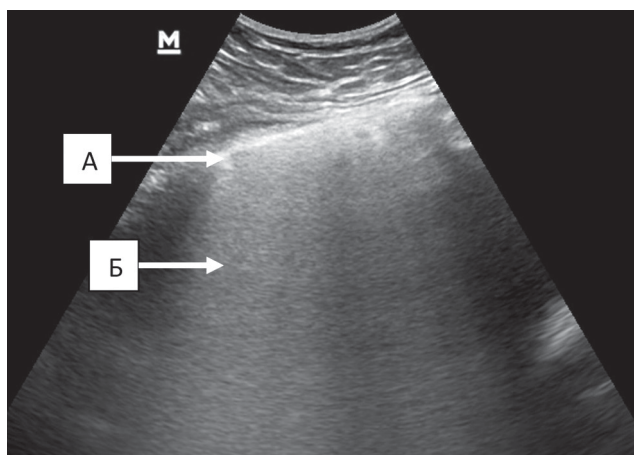


Рис. 4. УЗ-картина синдрома «белого легкого» у пациента с COVID-19-ассоциированной пневмонией: А – утолщенная плевральная линия, Б – множественные сливающиеся вертикальные В-линии

Альвеолярно-интерстициальный синдром не имеет физического эквивалента и хорошо выявляется при КТ, а также при УЗИ легких [51–53]. Альвеолярно-интерстициальный синдром возникает при многих патологических состояниях, включая кардиогенный отек легких, инфекционную, вирусную и грибковую пневмонию, хронические интерстициальные заболевания легких в период обострения [21, 51, 53].

Помимо визуализации мультифокальных сливных В-линий при УЗИ легких может выявляться неровная утолщенная прерывистая плевральная ли-

ния. При этом также не исключается визуализация единичных гипозоногенных участков в субплевральных отделах легких, соответствующих альвеолам, totally заполненным жидкостью [46–48].

Синдром консолидации легочной ткани возникает при распространении воспалительного процесса на субплевральные области легких и сонографически проявляется неравномерным утолщением, прерывистостью костальной плевры. При этом в субплевральных отделах легких появляются гипозоногенные участки, образующиеся вследствие заполнения альвеол жидкостным субстратом (рис. 5). Появление данных гипозоногенных участков свидетельствует о потере воздушности легочной ткани, и их акустические свойства становятся такими же, как у мягких тканей, значительно отличаясь от легких, содержащих воздух [46–48].

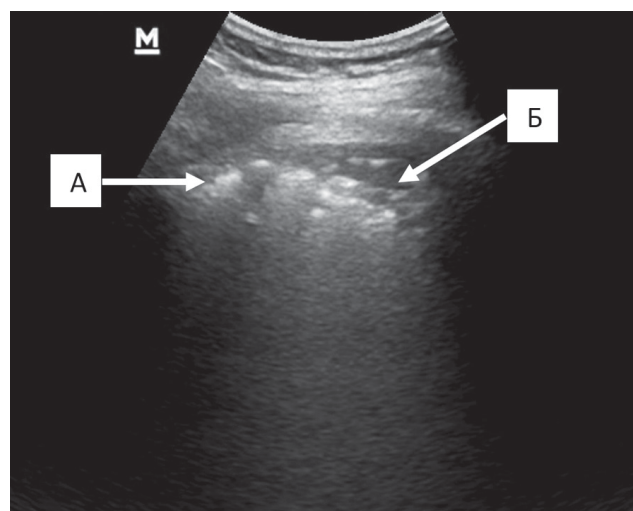


Рис. 5. УЗ-картина синдрома консолидации легочной ткани у пациента с COVID-19-ассоциированной пневмонией: А – утолщенная прерывистая плевральная линия, Б – гипозоногенные участки в субплевральных отделах легких

В исследовании китайских ученых [54] показано, что у пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2, протекающей в тяжелой форме, в 25,5% случаев присоединяется бактериальная флора, а в 10,9% случаев – грибковая. В исследованиях итальянских ученых [55] обнаружено, что у 16 654 пациентов, умерших от COVID-19, в 11% случаев имела место бактериальная и грибковая коинфекция.

При присоединении бактериальной флоры типичными ультразвуковыми признаками пневмонии являются консолидация легочной ткани, картина «воздушной бронхограммы», плевральный выпот, субплевральные очаги деструкции, компрессионный ателектаз в сочетании с плевральным выпотом [56–58] (рис. 6).

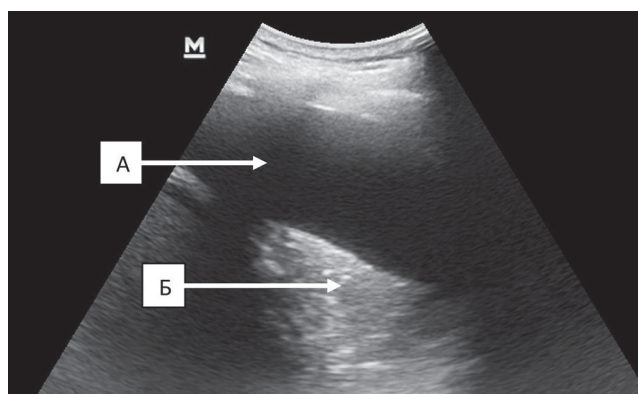


Рис. 6. УЗ-картина компрессионного ателектаза легочной ткани в нижних отделах легкого в сочетании с плевральным выпотом у пациента с COVID-19-ассоциированной пневмонией, осложненной присоединением бактериального поражения легочной ткани: А – плевральный выпот, Б – участок компрессионного ателектаза легочной ткани

Другое направление исследований в области ультразвуковой диагностики COVID-19-ассоциированных пневмоний посвящено разработке ультразвуковой семиотики поражения легочной ткани в зависимости от стадии данного заболевания. Так, Q.Y. Peng и соавт. [42] выявили определенные связи ультразвуковой картины со стадиями пневмоний, вызванных SARS-CoV-2 (табл. 3).

Таблица 3

Ультразвуковая картина поражения легочной ткани при COVID-19-ассоциированных пневмониях в зависимости от их стадии по Q.Y. Peng и соавт. [42]	
Стадия пневмонии	Ультразвуковая картина
Начальная стадия или легкая форма	Визуализируются неравномерно распределенные фокусные В-линии и неравномерно утолщенная плевральная линия
Стадия прогрессирования или средняя степень	Возрастает число В-линий в пораженных участках легких, в первую очередь в базальных, а затем распространяется в другие области легких. Количество В-линий возрастает, что приводит к их слиянию
Тяжелая форма	Визуализируются участки консолидации легочной ткани. Происходит «гепатизация» легочной ткани, в плевральных полостях появляется выпот
Стадия разрешения	Уменьшение количества В-линий, появление А-линий в зоне поражения

Также помимо выделения качественных ультразвуковых признаков поражения легочной ткани при COVID-19 предприняты попытки полуколичественной оценки патологических изменений в легких при данном заболевании. Так, G. Soldati и соавт. предложили балльную шкалу оценки тяжести пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, по данным УЗИ легких [58]. В соответствии с данной шкалой степень пора-

жения легких можно оценивать полуколичественно в баллах (от 0 до 3) для каждой из 12 исследованных областей (табл. 4) [58].

Таблица 4

Ультразвуковая картина поражения легочной ткани при COVID-19-ассоциированных пневмониях в зависимости от степени по G. Soldati G. и соавт. [58]	
Степень поражения легких	Ультразвуковая картина
0	Норма, плевральная линия ровная, непрерывная, визуализируются А-линии
1	Плевральная линия «зубчатая», под измененной плевральной линией визуализируются три и более вертикальные В-линии в одной области
2	Плевральная линия прерывистая, под измененной плевральной линией визуализируются консолидированные участки легочной ткани разных размеров, под ними определяются множественные «сливные» В-линии («белое легкое»)
3	В области сканирования определяется усиление УЗ-картины «белого легкого» с более крупными областями консолидации или без них

В данной работе [58] средняя величина баллов, подсчитанных по предложенной авторами методике, составила $20,4 \pm 8,5$ у пациентов без ухудшения клинического состояния и $29,2 \pm 7,3$ с его ухудшением. В итоге при проведении однофакторного и многофакторного анализов установлено, что общий балл, вычисленный по результатам УЗИ, имеет непосредственную связь с вероятным ухудшением состояния пациента. Более того, общий средний балл по УЗИ выше 24 был связан с почти 6-кратным увеличением вероятности ухудшения состояния пациента.

В другом зарубежном исследовании [39] показано, что УЗИ легких у пациентов с COVID-19 может использоваться в качестве предиктора течения и исхода заболевания. В данной работе [39] УЗИ легких проводилось только в шести зонах (передней, переднебоковой и заднебоковой с обеих сторон), так как обследуемые пациенты находились в отделении интенсивной терапии, а для интерпретации результатов ультразвукового исследования также была предложена балльная оценка степени поражения легочной ткани (табл. 5).

В данном исследовании [39] медианы баллов у пациентов с легкой, средней и тяжелой степенью тяжести составили 12, 19 и 23 соответственно. В итоге авторами исследования была получена кривая выживаемости больных COVID-19-ассоциированными пневмониями, на основании которой пациенты с баллом более 18 имели риск смертности в 2,6 раза больший по сравнению со смертностью пациентов с меньшей величиной баллов [39].

Таблица 5

Ультразвуковая картина поражения легочной ткани при COVID-19-ассоциированных пневмониях в зависимости от их степени по Y. Lichter и соавт. [39]	
Степень поражения легких	Ультразвуковая картина
0	Норма, визуализируются А-линии, соответствующие нормальной аэрации легких
1	Визуализируются три и более вертикальные В-линии в одной области, соответствующие умеренной потере аэрации легких; плевральная линия изменена
2	Визуализируются множественные «сливные» В-линии, соответствующие тяжелой потере аэрации легких; плевральная линия изменена
3	Визуализируются участки консолидации легочной ткани; плевральная линия изменена

В свою очередь, в другом исследовании [59] установлено, что УЗИ легких в диагностике COVID-19-ассоциированных пневмоний по чувствительности сравнимо с КТ органов грудной клетки и составляет 93–94%. Однако учитывая, что УЗИ легких способно оценивать только периферические отделы легких [60], этот метод исследования оказался низко специфичен (специфичность менее 50%). Кроме того, УЗИ легких ограничено при использовании у пациентов с ожирением [61] и зависит от опыта и навыков оператора [62].

Вместе с тем плохо изученным полем использования ультразвукового исследования легких при COVID-19-ассоциированных пневмониях является оценка сонографической картины легких в динамике при различных вариантах течения коронавирусной инфекции, а также многие вопросы методического характера, включая частоту контрольного ультразвукового исследования легких и его кратность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в условиях пандемии COVID-19 УЗИ легких играет одну из важных ролей в диагностике COVID-19-ассоциированных поражений легких, вызванных SARS-CoV-2, в связи с относительно высокой диагностической эффективностью, сопоставимой по ряду показателей с классической рентгенографией и рентгеновской компьютерной томографией, а также возможностью исследования нетранспортабельных и маломобильных пациентов (включая беременных женщин) в условиях их пребывания в специализированных лечебных учреждениях при отсутствии лучевой нагрузки. Ультразвуковое исследование легких также может быть использовано в качестве предиктора течения и исхода COVID-19-ассоциированных пневмоний. Вместе с тем ультразвуковая семиотика поражения легких при данном заболевании, как и прикладные аспекты ульт-

развукового исследования методического характера, требует более углубленного изучения и уточнения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Khachfe H.H., Chahrour M., Sammour J., Salhab H.A. An epidemiological study on COVID-19: a rapidly spreading disease. *Cureus*. 2020;12(3):e7313. DOI: 10.7759/cureus.7313.
2. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J. et al. *N. Engl. J. Med.* 2020;38(8):727–733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020;5(4):536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
4. Heymann D.L., Shindo N. COVID-19: what is next for public health? *The Lancet*. 2020;395(10224):542–545. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30374-3.
5. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Временные методические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации (3 сентября 2020). 2020:227.
6. Li K., Fang Y., Li W., Pan C., Qin P., Zhong Y. et al. CT image visual quantitative evaluation and clinical classification of coronavirus disease (COVID-19). *Eur. Radiol.* 2020;30(8):4407–4416. DOI: 10.1007/s00330-020-06817-6.
7. Авдеев С.Н., Царева Н.А., Мерзоева С.Н., Трущенко Н.В., Ярошецкий А.И. Практические рекомендации по кислородотерапии и респираторной поддержке пациентов с COVID-19 на доресанимационном этапе. *Пульмонология*. 2020;30(2):151–163. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-2-151-163.
8. Salehi S., Abedi A., Balakrishnan S., Gholamrezanezhad A. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A systematic review of imaging findings in 919 patients. *AJR Am. J. Roentgenol.* 2020;215(1):87–93. DOI: 10.2214/AJR.20.23034.
9. Rongrong Y., Xien G., Yongxi Z., Yong X., Shicheng G., Hengning K. Clinical characteristics of COVID-19 patients with HIV coinfection in Wuhan, China. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2021;15(3):403–409. DOI: 10.1080/17476348.2021.1836965.
10. Chen J., Cheng X., Wang R., Zeng X. Computed tomography imaging of an HIV-infected patient with coronavirus disease 2019. *J. Med. Virol.* 2020;92(10):1774–1776. DOI: 10.1002/JMV.25879.
11. Chung M., Bernheim A., Mei X., Zhang N., Huang M., Zeng X. et al. CT Imaging Features of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV). *Radiology*. 2020;295(1):202–207. DOI: 10.1148/radiol.2020200230.
12. Torres P., Irion K., Marchiori E. COVID-19: chest X-rays to predict clinical outcomes. *J. Bras. Pneumol.* 2020;46(5):e20200464. DOI: 10.36416/1806-3756/E20200464.
13. Сеницын В.Е., Тюрин И.Е., Митьков В.В. Временные согласительные методические рекомендации Российского общества рентгенологов и радиологов (РОПР) и Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине (РАСУДМ) «Методы лучевой диагностики пневмонии при новой коронавирусной инфекции COVID-19» (версия 2). *Вестник рентгенологии и радион-*

- логи. 2020;101(2):72–89. DOI: 10.20862/0042-4676-2020-101-2-72-89.
14. Osterwalder J. COVID-19 – more lung pocus and sparing use of stethoscope, chest X-ray and lung CT. *Praxis (Bern 1994)*. 2020;109(8):583–591. DOI: 10.1024/1661-8157/a003512.
15. Jacobi A., Chung M., Bernheim A., Eber C. Portable chest X-ray in coronavirus disease-19 (COVID-19): A pictorial review. *Clin. Imaging*. 2020;64:35–42. DOI: 10.1016/j.clinimag.2020.04.001.
16. Kunze G., Kovacikova E., Haller H., Kumle B. Lungenultraschall bei Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion. *Notf. Rett. Med.* 2020;7:1–9. DOI: 10.1007/S10049-020-00767-8.
17. Reissig A., Copetti R., Kroegel C. Current role of emergency ultrasound of the chest. *Critical Care Medicine*. 2011;39(4):839–845. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318206d6b8.
18. Lichtenstein D.A. BLUE-protocol and FALLS-protocol: two applications of lung ultrasound in the critically ill. *Chest*. 2015;147(6):1659–1670. DOI: 10.1378/chest.14-1313.
19. Шахов Б.Е., Сафонов Д.В. Диагностические возможности трансторакального ультразвукового исследования легких. *Международный журнал экспериментального образования*. 2008;3–8.
20. Харнас С.С. Новые технологии в диагностике и лечении больных хирургическими заболеваниями легких и плевры. М.: Медицина, 2005:96.
21. Mojoli F., Bouhemad B., Mongodi S., Lichtenstein D. Lung ultrasound for critically ill patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019;199(6):701–714. DOI: 10.1164/rccm.201802-0236CI.
22. Сафонов Д.В., Дианова Т.И., Родионов В.А., Герасимова Л.А. Рентген-ультразвуковые сопоставления и динамический эхографический контроль при пневмониях у детей. *Научный журнал КубГАУ*. 2014;104(10):1591–1605.
23. Husain L.F., Hagopian L., Wayman D., Baker W.E., Carmody K.A. Sonographic diagnosis of pneumothorax. *J. Emerg. Trauma Shock*. 2012;5(1):76–81. DOI: 10.4103/0974-2700.93116.
24. Wang G., Ji X., Xu Y., Xiang X. Lung ultrasound: a promising tool to monitor ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Crit. Care*. 2016;20(1):320. DOI: 10.1186/s13054-016-1487-y.
25. Cortellaro F., Colombo S., Coen D., Duca P.G. Lung ultrasound is an accurate diagnostic tool for the diagnosis of pneumonia in the emergency department. *Emerg. Med. J.* 2012;29(1):19–23. DOI: 10.1136/emj.2010.101584.
26. Cardinale L., Ardisson F., Garetto L., Marci V., Volpicelli G., Solitro F. et al. Imaging of benign solitary fibrous tumor of the pleura: a pictorial essay. *Rare Tumors*. 2010;2(1): e1. DOI: 10.4081/rt.2010.e1.
27. Gargani L., Frassi F., Soldati G., Tesorio P., Gheorghiade M., Picano E. Ultrasound lung comets for the differential diagnosis of acute cardiogenic dyspnoea: a comparison with natriuretic peptides. *Eur. J. Heart Fail.* 2008;10(1):70–77. DOI: 10.1016/j.ejheart.2007.10.009.
28. Lichtenstein D.A., Mézière G.A. Relevance of lung ultrasound in the diagnosis of acute respiratory failure: the BLUE protocol. *Chest*. 2008;134(1):117–125. DOI: 10.1378/chest.07-2800.
29. Репик В.И. Ультразвуковое исследование в диагностике плеврального выпота. *Ультразвуковая диагностика*. 1996;3:62.
30. Trezzi M., Torzillo D., Ceriani E., Costantino G., Caruso S., Damavandi P.T. et al. Lung ultrasonography for the assessment of rapid extravascular water variation: evidence from hemodialysis patients. *Intensive Care Med.* 2013;8(5):409–415. DOI: 10.1007/s11739-011-0625-4.
31. Perrone T., Soldati G., Padovini L., Fiengo A., Lettieri G., Sabatini U. et al. A new lung ultrasound protocol able to predict worsening in patients affected by severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 pneumonia. *J. Ultrasound Med.* 2021;40(8):1627–1635. DOI: 10.1002/jum.15548.
32. Wang M., Luo X., Wang L., Estill J., Lv M., Zhu Y. et al. A Comparison of Lung Ultrasound and Computed Tomography in the Diagnosis of Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(8):1351. DOI: 10.3390/diagnostics11081351.
33. Gibbons R.C., Magee M., Goett H., Murrett J., Genninger J., Mendez K. et al. Lung Ultrasound vs. Chest X-Ray Study for the Radiographic Diagnosis of COVID-19 Pneumonia in a High-Prevalence Population. *J. Emerg. Med.* 2021;60(5):615–625. DOI: 10.1016/j.jemermed.2021.01.041.
34. Moro F., Buonsenso D., Moruzzi M.C., Inchigolo R., Smargiasi A., Demi L. et al. How to perform lung ultrasound in pregnant women with suspected COVID-19infection. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2020;55(5):593–598. DOI: 10.1002/uog.22028.
35. Yee J., Kim W., Han J.M., Lee N., Lee K.E., Gwak H.S. Clinical manifestations and perinatal outcomes of pregnant women with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2020;10(1):18126. DOI: 10.1038/s41598-020-75096-4.
36. Zaigham M., Andersson O. Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: A systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2020;99(7):823–829. DOI: 10.1111/aogs.13867.
37. Moghadam S.A., Dini P., Nassiri S., Motavaselian M., Hajibaba M., Sohrabi M. Clinical features of pregnant women in Iran who died due to COVID-19. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2021;152(2):215–219. DOI: 10.1002/ijgo.13461.
38. Lichtenstein D., Mézière G., Biderman P., Gepner A., Barré O. The comet-tail artifact an ultrasound sign of alveolar-interstitial syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;156(5):1640–1646. DOI: 10.1164/AJRCCM.156.5.96-07096.
39. Lichter Y., Topilsky Y., Taieb P., Banai A., Hochstadt A., Merdler I. et al. Lung ultrasound predicts clinical course and outcomes in COVID-19 patients. *Intensive Care Med.* 2020;46(10):1873–1883. DOI: 10.1007/s00134-020-06212-1.
40. Gargani L., Volpicelli G. How I do it: Lung ultrasound. *Cardiovasc. Ultrasound*. 2014;12:25. DOI: 10.1186/1476-7120-12-25.
41. Buda N., Kosiak W., Welnicki M., Skoczylas A., Olszewski R., Piotrkowski J. et al. Recommendations for lung ultrasound in internal medicine. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(8):597. DOI: 10.3390/diagnostics10080597.
42. Peng Q.Y., Wang X.T., Zhang L.N., Chinese Critical Care Ultrasound Study Group (CCUSG). Findings of lung ultrasonography of novel corona virus pneumonia during the 2019–2020 epidemic. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):849–850. DOI: 10.1007/s00134-020-05996-6.
43. Volpicelli G., Elbarbary M., Blaivas M., Lichtenstein D.A., Mathis G., Kirkpatrick A.W. et al. International evidence-based recommendations for point-of-care lung ultra-

- sound. *Intensive Care Medicine*. 2012;38(4):577–591. DOI: 10.1007/s00134-012-2513-4.
44. Poggiali E., Dacrema A., Bastoni D., Tinelli V., Demichele E., Ramos P.M. et al. Can lung US help critical care clinicians in the early diagnosis of novel Coronavirus (COVID-19) pneumonia? *Radiology*. 2020;295(3):e6. DOI: 10.1148/radiol.2020200847.
 45. Soldati G., Demi M., Smargiassi A., Inchingolo R., Demi L. The role of ultrasound lung artifacts in the diagnosis of respiratory diseases. *Expert Rev. Respir. Med.* 2019;13(2):163–172. DOI: 10.1080/17476348.2019.1565997.
 46. Demi M., Prediletto R., Soldati G., Demi L. Physical mechanisms providing clinical information from ultrasound lung images: hypotheses and early confirmations. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*. 2020;67(3):612–623. DOI: 10.1109/TUFFC.2019.2949597.
 47. Soldati G., Demi M., Inchingolo R., Smargiassi A., Demi L. On the physical basis of pulmonary sonographic interstitial syndrome. *J. Ultrasound Med.* 2016;35(10):2075–2086. DOI: 10.7863/ultra.15.08023.
 48. Bradley B., Branley H.M., Egan J.J., Greaves M.S., Hansell D.M., Harrison N.K. et al. British Thoracic Society Interstitial Lung Disease Guideline Group, British Thoracic Society Standards of Care Committee, Thoracic Society of Australia, New Zealand Thoracic Society, Irish Thoracic Society. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax*. 2008;63. Suppl.5:v1–58. DOI: 10.1136/thx.2008.101691.
 49. Tsung J.W., Kessler D.O., Shah V.P. Prospective application of clinician-performed lung ultrasonography during the 2009 H1N1 influenza A pandemic: distinguishing viral from bacterial pneumonia. *Crit. Ultrasound J.* 2012;4(1):16. DOI: 10.1186/2036-7902-4-16.
 50. Zhao Z., Jiang L., Xi X., Jiang Q., Zhu B., Wang M. et al. Prognostic value of extravascular lung water assessed with lung ultrasound score by chest sonography in patients with acute respiratory distress syndrome. *BMC Pulm. Med.* 2015;15:98. DOI: 10.1186/s12890-015-0091-2.
 51. Khosla R. Lung Sonography. Sonography. K. Thoirs (ed.). University Campus STeP Ri Slavka Krautzeka, 2012:111–130. DOI: 10.5772/27400.
 52. Lichtenstein D., Mezière G. A lung ultrasound sign allowing bedside distinction between pulmonary edema and COPD: the comet-tail artifact. *Intensive Care Med.* 1998;24(12):1331–1334. DOI: 10.1007/s001340050771.
 53. Акилов Х.А., Аминов У.С., Амирова З.Ф. Ультразвуковая семиотика бактериальной деструкции легких у детей. *Вестник экстренной медицины*. 2017;10(2):55–60.
 54. Zhang G., Hu C., Luo L., Fang F., Chen Y., Li J. et al. Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. *J. Clin. Virol.* 2020;127:104364. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104364.
 55. Huttner B., Catho G., Pano-Pardo J.R., Pulcini C., Schouten J. COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! *Clin. Microbiol. Infect.* 2020;26(7):808–810. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.04.024.
 56. Чуяшенко Е.В., Завадовская В.Д., Агеева Т.С., Просекина Н.М., Перова Т.Б. Ультразвуковое исследование легких при пневмонии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(2):47–59. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-2-47-59.
 57. Чуяшенко Е.В., Завадовская В.Д., Агеева Т.С., Зоркальцев М.А., Федорова Е.И., Букреева Е.Б. и др. Возможности ультразвукового исследования в диагностике воспалительной инфильтрации легких. *Лучевая диагностика и терапия*. 2020;11(2):107–115. DOI: 10.22328/2079-5343-2020-11-2-107-115.
 58. Soldati G., Smargiassi A., Inchingolo R., Buonsenso D., Perrone T., Briganti D.F. et al. Proposal for international standardization of the use of lung ultrasound for COVID-19 patients; a simple, quantitative, reproducible method. *J. Ultrasound Med.* 2020;39(7):1413–1419. DOI: 10.1002/jum.15285.
 59. Colombi D., Petrini M., Maffi G., Villani G.D., Bodini F.C., Morelli N. et al. Comparison of admission chest computed tomography and lung ultrasound performance for diagnosis of COVID-19 pneumonia in populations with different disease prevalence. *Eur. J. Radiol.* 2020;133:109344. DOI: 10.1016/j.ejrad.2020.109344.
 60. Sperandeo M., Tinti M.G., Rea G. Chest ultrasound versus chest X-rays for detecting pneumonia in children: Why compare them each other if together can improve the diagnosis? *Eur. J. Radiol.* 2017;93:291–292. DOI: 10.1016/j.ejrad.2017.05.038.
 61. Serafino M.D., Notaro M., Rea G., Iacobellis F., Paoli V.D., Acampora C. et al. The lung ultrasound: facts or artifacts? In the era of COVID-19 outbreak. *Radiol. Med.* 2020;125(8):738–753. DOI: 10.1007/s11547-020-01236-5.
 62. Mozzini C., Pasini A.M.F., Garbin U., Cominacini L. Lung ultrasound in internal medicine: training and clinical practice. *Crit. Ultrasound J.* 2016;8(1):10. DOI: 10.1186/s13089-016-0048-6.

Информация об авторах

Балабанова Александра Анатольевна – врач ультразвуковой диагностики, клиники СибГМУ, г. Томск, balasasha@icloud.com, <http://orcid.org/0000-0003-0974-9213>

Куражов Алексей Петрович – д-р мед. наук, профессор, зав. отделением лучевой диагностики, клиники СибГМУ, г. Томск, kurazhovap@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1316-5421>

Завадовская Вера Дмитриевна – д-р мед. наук, профессор, и. о. зав. кафедрой лучевой диагностики и лучевой терапии, СибГМУ, г. Томск, WDZav@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6231-7650>

(✉) **Куражов Алексей Петрович**, kurazhovap@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2020;
одобрена после рецензирования 22.09.2021;
принята к публикации 05.10.2021

УДК 616.24-002-039.3:575.174.015.3
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-160-169>

Генетические факторы риска тяжелого течения пневмонии: систематический обзор

Карнаушкина М.А.¹, Свиридов Ф.С.^{1, 6}, Корчагин В.И.³, Саламайкина С.А.³,
Васильева И.С.⁴, Литвинова М.М.^{2, 4}, Вацик-Городецкая М.В.⁵

¹ Российский университет дружбы народов (РУДН)
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

² Московский клинический научно-практический центр (МКНЦ) им. А.С. Логинова
Россия, 111123, г. Москва, шоссе Энтузиастов, 86

³ Центральный научно-исследовательский институт (НИИ) эпидемиологии
Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

⁵ Городская клиническая больница (ГКБ) им. В.В. Виноградова
Россия, 117292, г. Москва, ул. Вавилова, 61

⁶ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
Россия, 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1

РЕЗЮМЕ

Представлен систематический обзор публикаций, посвященных поиску генетических маркеров тяжелого течения пневмонии.

Цель исследования: на основании опубликованных данных сформировать перечень генетических маркеров, способствующих тяжелому течению пневмонии.

В ходе исследования выполнен поиск и анализ статей, опубликованных в период с января 2000 г. по апрель 2021 г. В результате проведенного поиска и последующего отбора статей сформирован список из 10 публикаций, в которых продемонстрирована четкая ассоциативная связь определенных генных вариантов с тяжелым и осложненным течением пневмонии, и список генетических маркеров тяжелого течения пневмонии, состоящий из 16 полиморфизмов в 12 генах (*CD86*, *IL6*, *IL10*, *PAN*, *TNFA*, *HMGB1*, *ATG16L1*, *AGTR1*, *GCLC*, *CAT*, *IFN γ* , *FCGR2A*).

Приведенные генетические маркеры тяжелого и осложненного течения пневмонии отвечают за разнообразные реакции врожденного иммунитета. Отношение шансов при наличии рискового аллеля по соответствующим полиморфным локусам этих генов колеблется от 1,39 до 4,28. Необходимо дальнейшее изучение влияния данных генетических факторов на исходы пневмонии в группах пациентов различных популяций с одновременной оценкой совокупного влияния генетических вариантов и взаимодействия генов между собой.

Ключевые слова: пневмония, гены, полиморфизм, врожденный иммунитет, критерии тяжести, цитокины, секретируемые белки

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Карнаушкина М.А., Свиридов Ф.С., Корчагин В.И., Саламайкина С.А., Васильева И.С., Литвинова М.М., Ватик-Городецкая М.В. Генетические факторы риска тяжелого течения пневмонии: систематический обзор. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):160–169. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-160-169>.

Genetic factors contributing to a severe course of pneumonia: a systematic review

Karnaushkina M.A.¹, Sviridov P.S.^{1,6}, Korchagin V.I.³, Salamaikina S.A.³, Vasilyeva I.S.⁴, Litvinova M.M.^{2,4}, Vatsik-Gorodetskaya M.V.⁵

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)
6, Miklukho-Maklaya Str., Moscow, 117198, Russian Federation

² The Loginov Moscow Clinical Scientific Center
86, Entuziastov Highway, Moscow, 111123, Russian Federation

³ Central Research Institute of Epidemiology
3A, Novogireevskaya Str., Moscow, 111123, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)
8–2, Trubetskaya Str., Moscow, 119991, Russian Federation

⁵ Vinogradov City Clinical Hospital
61, Vavilova Str., Moscow, 117292, Russian Federation

⁶ Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye Str., Moscow, 115522, Russian Federation

ABSTRACT

The article presents a systematic review of publications devoted to the study of genetic markers of severe pneumonia.

The aim of the study was to compile a list of genetic markers that contribute to a severe course of pneumonia on the basis of the published data.

In the current study, we searched for and analyzed articles published between January 2000 and April 2021. Following the search for and subsequent selection of articles, a list of 10 publications was compiled, which demonstrated a clear association of certain gene variants with severe and complicated pneumonia. Finally, we made a list of genetic markers of severe pneumonia consisting of 16 polymorphisms in 12 genes (*CD86*, *IL6*, *IL10*, *PAIL*, *TNFA*, *HMGB1*, *ATG16L1*, *AGTR1*, *GCLC*, *CAT*, *IFN γ* , *FCGR2A*).

These genetic markers of severe and complicated pneumonia are responsible for various innate immune responses. The odds ratio for complicated pneumonia with a risk allele in the polymorphisms in the mentioned genes ranges from 1.39 to 4.28. To understand molecular and genetic mechanisms of severe pneumonia, further investigation of the effect of these genetic factors on the outcomes of pneumonia in different groups of patients with a simultaneous assessment of the cumulative effect of genetic variants and genetic interactions is required.

Keywords: pneumonia, genes, polymorphism, innate immunity, severity criteria, cytokines, secreted proteins

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Karnaushkina M.A., Sviridov P.S., Korchagin V.I., Salamaikina S.A., Vasilyeva I.S., Litvinova M.M., Vatsik-Gorodetskaya M.V. Genetic factors contributing to a severe course of pneumonia: a systematic review. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):160–169. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-160-169>.

ВВЕДЕНИЕ

Пневмония представляет собой острое инфекционное заболевание, характеризующееся очаговым поражением респираторных отделов легких с внутриальвеолярной экссудацией [1]. В 2019 г. наиболее смертельной группой инфекционных заболеваний были пневмония и другие инфекции нижних дыхательных путей, занявшие четвертую строчку в списке ведущих причин смерти [2]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время пневмония входит в тройку основных причин смертности в мире, а в структуре смертности от болезней органов дыхания на пневмонию приходится 41,5% [3]. По данным официальной статистики Российской Федерации, заболеваемость внебольничной пневмонией в России за 2019 г. составила 410 на 100 тыс. населения [4].

С этиологической точки зрения, пневмонии являются типичным многофакторным заболеванием, течение и прогноз которого определяются генетическими особенностями человека, факторами окружающей среды и свойствами возбудителя. С целью оптимизации схем лечения и профилактики заболеваемости пневмониями в ходе многоцентровых клинических исследований определено большое количество факторов риска развития ее тяжелого течения и осложнений. Однако у значительной доли больных дополнительные факторы риска так и остались невыявленными [5]. В связи с этим проблема выявления достоверных предикторов тяжелого и осложненного течения пневмонии представляет собой актуальную задачу современной медицины.

Учеными неоднократно предпринимались попытки ее решения, включая определение «генов-кандидатов» и их вариантов, ассоциированных с предрасположенностью, характером течения и клиническими исходами пневмоний. В настоящее время опубликовано достаточно большое количество генетических исследований, посвященных данной проблеме. Так, в систематическом обзоре 2019 г. А.Т. Клоек с соавт. проанализировано 1 219 исследований, опубликованных с 2000 по 2018 г. [5]. При проведении мета-анализа авторы установили статистически значимую ассоциацию между аллелями генов *MBL2* и *CD14* и риском развития пневмококковой пневмонии. Вместе с тем в работе отмечено, что представленные в мировой литературе данные о роли генных полиморфизмов пациента в отношении восприимчивости, характера течения и исхода пневмонии демонстрируют противоречивые результаты, что может быть объяснено методологическими недостатками и плохой воспроизводимостью проведенных исследований [5].

В представленной статье мы систематически проанализировали исследования, посвященные влия-

нию генетических факторов на тяжесть течения пневмонии, и обсудили возможные направления дальнейшей работы в этой области.

Цель исследования: на основании опубликованных данных в области изучения генетических аспектов, определяющих особенности течения пневмоний, сформировать перечень генетических маркеров, способствующих ее тяжелому течению.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ходе исследования выполнен поиск и анализ статей в базе медицинских и биологических публикаций PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), опубликованных в период с января 2000 г. по апрель 2021 г. Поисковый запрос содержал слова «pneumonia» и производные, «gene» и производные, «polymorphism» и производные. Для сужения круга поиска были исключены статьи, содержащие слова «children» и «covid» с их вариациями. Таким образом, поисковый алгоритм выглядел так: (“pneumonia”[MeSH Terms] OR “pneumonia”[All Fields] OR “pneumoniae”[All Fields] OR “pneumonias”[All Fields] OR “pneumoniae s”[All Fields]) AND (“genes”[MeSH Terms] OR “genes”[All Fields] OR “gene”[All Fields]) AND (“polymorphic”[All Fields] OR “polymorphics”[All Fields] OR “polymorphism s”[All Fields] OR “polymorphism, genetic”[MeSH Terms] OR (“polymorphism”[All Fields] AND “genetic”[All Fields]) OR “genetic polymorphism”[All Fields] OR “polymorphism”[All Fields] OR “polymorphisms”[All Fields])) NOT (“child”[MeSH Terms] OR “child”[All Fields] OR “children”[All Fields] OR “child s”[All Fields] OR “children s”[All Fields] OR “childrens”[All Fields] OR “childs”[All Fields])) NOT (“sars cov 2”[MeSH Terms] OR “sars cov 2”[All Fields] OR “covid”[All Fields] OR “covid 19”[MeSH Terms] OR “covid 19”[All Fields])) AND (2000:2021[pdat]). При применении представленного алгоритма поиска первоначально обнаружено 795 статей. В последующем из 795 статей была исключена 761 публикация, которая полностью соответствовала цели настоящего исследования (статьи были посвящены генетическим особенностям микроорганизмов, вызывающих бронхолегочные заболевания, либо исследовалась вероятность возникновения заболевания, но не его течение) и список сократился до 34 статей.

После тщательного анализа содержания публикаций из полученного списка были дополнительно исключены статьи, в которых либо имелось указание на обследование неподходящих групп больных, либо не имелось необходимых для достижения цели настоящего исследования данных. В частности, ис-

ключались статьи с исследованием лиц младше 18 лет и публикации, в которых анализировалась ассоциация генетических маркеров не с тяжестью течения пневмонии, а с предрасположенностью к развитию пневмонии как таковой. В том числе из списка отсеивались работы, в которых ассоциация генного полиморфизма с тяжелым течением оказалась статистически незначимой ($p > 0,05$).

Таким образом, на последнем этапе анализа данных литературы по поднимаемому вопросу из 34 статей было исключено 24 публикации. В результате проведенного поиска был сформирован список из 10 публикаций, в которых продемонстрирована четкая ассоциативная связь определенных генных вариантов с тяжелым и осложненным течением пневмонии (рис.).

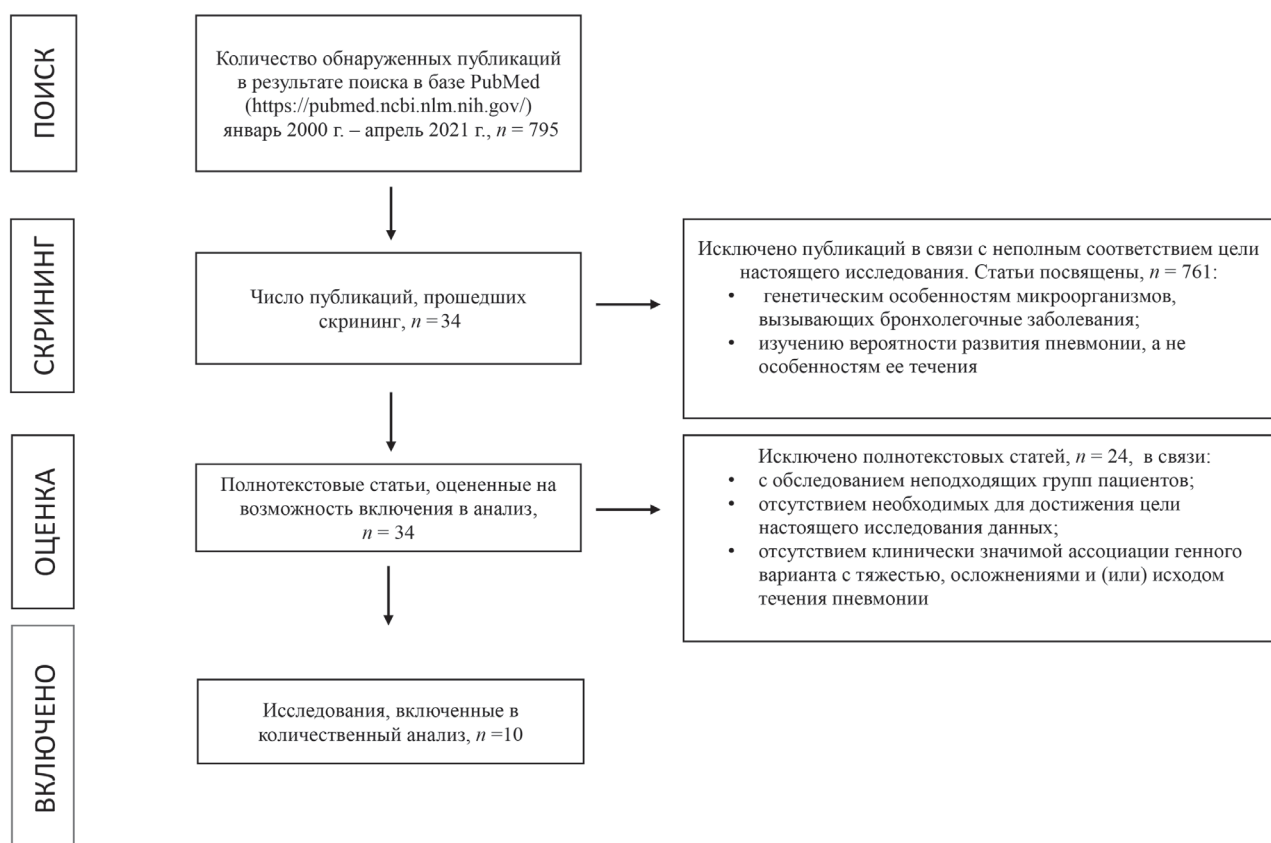


Рисунок. Схематическое изображение отбора литературных источников, посвященных выявлению генетических маркеров, ассоциированных с тяжелым течением пневмонии в соответствии с рекомендациями PRISMA

Вклады различных полиморфизмов в развитие болезни определяли с помощью традиционного для таких исследований показателя – отношения шансов (odds ratio, OR). Полученные результаты трактовали следующим образом: OR = 1 – отсутствие корреляционной связи между полиморфизмом гена и клиничко-лабораторными особенностями течения пневмонии; OR > 1 – повышенный риск тяжелого течения пневмонии; OR < 1 – протективный маркер в отношении развития осложнений пневмонии. Статистически значимыми считали ассоциации с уровнем значимости менее 0,05 ($p < 0,05$).

Для анализа результатов выявленных генетических ассоциаций была также проведена работа с генетическими базами данных и геномными

браузерами dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), SNPedia (<https://www.snpedia.com/>), OMIM (<https://www.omim.org/>), что позволило уточнить частотные характеристики генных полиморфизмов и определить их биологическую роль в процессах, ответственных за реакции врожденного иммунитета. Согласно Российским клиническим рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике тяжелой пневмонии у взрослых, для определения тяжести целесообразно использовать критерии IDSA/ATS, в которых описаны два «больших» и девять «малых» критериев (табл. 1) [6]. Наличие у пациента одного «большого» и трех «малых» критериев свидетельствует о тяжелом течении пневмонии [7].

Таблица 1

Критерии IDSA/ATS, связанные с тяжестью пневмонии	
«Большие» критерии	Выраженная дыхательная недостаточность, требующая ИВЛ
	Септический шок с необходимостью введения вазопрессоров
«Малые» критерии	ЧДД ≥ 30 в минуту
	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 250$
	Мультилобарная инфильтрация
	Нарушение сознания
	Уремия (остаточный азот мочевины ≥ 20 мг/дл)
	Лейкопения (лейкоциты $< 4 \times 10^9/\text{л}$)
	Тромбоцитопения (тромбоциты $< 100 \times 10^9/\text{л}$)
	Гипотермия ($< 36^\circ\text{C}$)
	Гипотензия, требующая интенсивной инфузионной терапии

Примечание. IDSA – Американское общество инфекционистов; ATS – Американское торакальное общество; ИВЛ – искусственная вентиляция легких; ЧДД – частота дыхания; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ – парциальное давление кислорода в артериальной крови/фракция кислорода во вдыхаемом воздухе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как было указано выше, в результате проведенного систематического анализа мировой литературы нами сформирован список генетических маркеров тяжелого течения пневмонии, состоящий из 16 полиморфизмов в 12 генах (табл. 2).

Приведенные генетические маркеры тяжелого и осложненного течения пневмонии отвечают за разнообразные реакции врожденного иммунитета. В целом отобранные гены могут быть сгруппированы по функциональному принципу: внеклеточные цитозольные опсонизирующие белки (провоспалительные цитокины) (*IFNG*, *IL6*, *IL10*, *TNF α*), секретируемые белки (гены системы комплемента и Fc-рецепторы иммуноглобулинов) (*FCGR2A*) и гены, кодирующие синтез иных белков (*CAT*, *GCLC*, *AGTRI*, *PAII*(*SERPINE1*)).

Из табл. 1 видно, что OR при наличии рискового аллеля по представленным полиморфным локусам колеблется от 1,39 до 4,28.

Таблица 2

Генетические факторы, ассоциированные с риском тяжелого и осложненного течения пневмонии				
Ген	Полиморфизм	OR для аллеля и (или) генотипа (осложнение пневмонии)	Особенность исследуемой выборки	Источник (PubMed ID), особенности популяции
<i>CD86</i>	rs17281995 G/C	Аллель С – 1,75 (95% CI; 1,04–2,95). Генотип GC – 1,85 (95% CI; 1,07–3,20) (сепсис)	Китайская популяция, 192 пациента с пневмонией и сепсисом и 201 здоровый	25129060 [8]
	rs2332096 T/G	Аллель G – 1,65 (95% CI; 1,21–2,24). Генотип GG – 2,75 (95% CI; 1,46–5,16) (сепсис)	Китайская популяция, 186 пациента с пневмонией и сепсисом и 196 здоровых	25912130 [9]
<i>IL6</i>	rs1800795 G/C	Аллель С – 2,83 (95% CI; 2,1–3,78). Генотип CC – 4,45 (95% CI; 2,69–5,37) (сепсис)	Китайская популяция, 188 пациента с пневмонией и сепсисом, 162 с пневмонией и 200 здоровых	27388228 [10]
	rs1800795 G/C	Аллель С – 2,42 (95% CI; 1,08–5,45) (септический шок)	Китайская популяция. Группа из 277 больных была разделена на две подгруппы в зависимости от тяжести сепсиса и исхода	26025100 [11]
<i>IL10</i>	rs1800896 A/G	Аллель А – 2,08 (95% CI; 1,15–2,80) (сепсис)	Китайская популяция, 188 пациента с пневмонией и сепсисом, 162 с пневмонией и 200 здоровых	27388228 [10]
<i>PAII</i> (<i>SERPINE1</i>)	rs1799768 4G/5G и 4G/4G	Генотипы 4G/5G и 4G/4G – 2,74 (95% CI; 1,34–5,60) (синдром полиорганной недостаточности), 2,57 (95% CI; 1,18–5,62) (септический шок)	208 пациентов европеоидной расы с пневмонией и сепсисом. Пациенты были стратифицированы в зависимости от наличия полиорганной дисфункции, септического шока или смерти	20429897 [12]
<i>TNFα</i>	rs1800629 G/A	Аллель А – 4,28 (95% CI; 2,24–8,18) (септический шок)	Китайская популяция. Группа из 277 больных была разделена на две подгруппы в зависимости от тяжести сепсиса и исхода	26025100 [11]
<i>HMGB1</i>	rs1412125 T/C	Генотип TC – 1,74 (95% CI; 1,025–2,958) (тяжелое течение). Генотип CC – 4,73 (95% CI; 2,24–10,08) (тяжелое течение)	Китайская популяция, 328 больных внебольничной пневмонией (в зависимости от тяжести состояния больные были разделены на тяжелую (125) и нетяжелую внебольничную пневмонию (203)) и 317 здоровых	30562142 [13]
	rs2249825 C/G	Генотип CG – 1,75 (95% CI; 1,02–3,01) (тяжелое течение). Генотип GG – 3,87 (95% CI; 1,58–9,58) (тяжелое течение)		

Ген	Полиморфизм	OR для аллеля и (или) генотипа (осложнение пневмонии)	Особенность исследуемой выборки	Источник (PubMed ID), особенности популяции
<i>ATG16L1</i>	rs2241880 G/A	Аллель А – 2,4 (95% CI; 1,06–5,60) (септический шок и отказ минимум одного органа у пациентов с ИВЛ-ассоциированной пневмонией)	Популяция Греции, 155 пациентов с ИВЛ-ассоциированной пневмонией	24791954 [14]
<i>AGTRI</i>	rs5186 A/C	Аллель С – 1,86 (95% CI; 1,31–2,64) (осложнения пневмонии)	Популяция России, 350 пациентов с ИВЛ ассоциированной пневмонией, 432 контроль	24068433 [15]
<i>GCLC</i>	rs17883901 C/T	Аллель Т – 1,90 (95% CI; 1,15–3,15) (осложнения пневмонии)		
<i>CAT</i>	rs17880664 T/A	Генотип AA – 1,85 (95% CI; 1,06–3,25) (осложнения пневмонии)		
<i>IFNγ</i>	rs2069705 T/C	Аллель Т – 1,39 (95% CI; 1,03–1,89) (сепсис). Генотип ТТ – 1,22 (95% CI; 0,58–2,57) ТС + ТТ – 1,84 (95% CI; 1,24–2,73) (сепсис)	Популяция Китая, 196 пациентов с сепсисом и пневмонией, 213 здоровых	24475220 [16]
	rs2430561 A/T	Аллель А – 1,49 (95% CI; 1,05–2,12) (сепсис). Генотип AA – 1,70 (95% CI; 0,61–2,12) ТА + AA – 1,68 (95% CI; 1,11–2,54)		
<i>FCGR2A</i>	rs1801274 T/C	Аллель С – 1,57 (95% CI; 1,00–2,45) Генотип CC – 2,55 (95% CI; 1,30–5,00) (пациенты сепсисом)	Нидерланды, 200 пациентов с ИВЛ-ассоциированной пневмонией и сепсисом, 313 здоровых	19494086 [17]

Примечание. SNV – однонуклеотидный вариант; OR – отношение шансов; 95% CI – 95%-й доверительный интервал.

Здесь нам бы хотелось привести более подробную информацию по обнаруженным в мировой литературе генетическим ассоциациям. Ген *CD86* локализован на длинном плече хромосомы 3 (*3q13.33*) и кодирует мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессирующийся на антиген-представляющих клетках. Белок CD86 действует как костимулирующий сигнал для активации и выживания Т-лимфоцитов [18, 19]. В исследовании Н. Song и соавт. (2015), где изучали 192 больных с пневмония-индуцированным сепсисом, показано, что частота генного варианта rs17281995 G/C значительно выше, чем у лиц в контрольной группе. OR для аллеля С и генотипа GC – 1,75 и 1,85 соответственно. В работе С. Wang и соавт. (2015), где исследовали 186 пациентов с пневмония-индуцированным сепсисом, была выявлена корреляция между генным вариантом rs2332096 T/G и тяжелым течением заболевания. OR для аллеля G и генотипа GG 1,65 и 2,75 соответственно [8, 9].

Ген *IL6* локализован на коротком плече хромосомы 7 (*7p15.3*) и кодирует интерлейкин 6. IL6 является провоспалительным цитокином – одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления. Он стимулирует синтез белков острой фазы, пролиферацию и дифференцировку В- и Т-клеток, лейкоцитопоз, участвует в развитии оксидативного стресса.

Секретируется макрофагами, фибробластами, клетками сосудистого эндотелия, Т-клетками, глиальными клетками, эпителиальными и кератиноцитами кожи после их активации патоген-связанными молекулами, опосредованной толл-подобными рецепторами [10]. В исследовании Z.-R. Мао и соавт. (2017), где обследовали 188 больных с пневмония-индуцированным сепсисом и 162 пациента с пневмонией, показано, что вариант rs1800795 G/C увеличивает риск развития сепсиса. OR для аллеля С – 2,83, для генотипа CC – 4,45. В работе В. Feng и соавт., где обследовали 277 пациентов с пневмония-индуцированным сепсисом, выявлена корреляция между генным вариантом rs1800795 G/C и развитием септического шока. OR для аллеля С – 2,42 [11].

Ген *IL10* локализован на длинном плече хромосомы 1 (*1q32.1*) и кодирует интерлейкин 10 (IL-10). IL-10 обладает множественными плейотропными воздействиями на иммунорегуляцию и воспаление. Он снижает экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах. Увеличивает выживаемость В-клеток, их пролиферацию и продукцию антител. Блокирует активность NF-κB и регулирует сигнальный путь JAK-STAT [20]. В исследовании Z.-R. Мао и соавт. (2017), где обследовали 188 больных с пневмония-индуцированным сепсисом и 162 пациента с пневмонией,

показано, что вариант rs1800896 A/G приводит к повышению риска тяжелого течения пневмонии. OR для аллеля А – 1,58 [10].

Ген *PAIL* (*SERPINE1*) локализован на длинном плече хромосомы 7 (7q22.1) и кодирует ингибитор активатора плазминогена 1-го типа, принимающий участие в процессе фибринолиза. Полиморфизмы этого гена обычно рассматривают в качестве факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [21]. В работе K. Madách K и соавт., где было обследовано 208 пациентов с пневмония-индуцированным сепсисом, описывается взаимосвязь между генотипами 4G/5G и 5G/5G гена *PAIL* (*SERPINE1*) и развитием синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) и септического шока. OR для этих двух генотипов – 2,74 (СПОН) и 2,57 (септический шок) [12].

Ген *TNFα* (*TNF*) локализован на длинном плече хромосомы 7 (6p21.33) и кодирует фактор некроза опухоли альфа (TNFα). Это внеклеточный белок, представляющий собой многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами. TNFα влияет на липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия, стимулирует продукцию IL-1, IL-6, IL-8, интерферона гамма, активирует лейкоциты, один из важных факторов защиты от внутриклеточных паразитов и вирусов [22]. В статье B. Feng и соавт., где исследовали 277 пациентов с пневмония-индуцированным сепсисом, выявлена корреляция между генным вариантом rs1800629 G/A и развитием септического шока. OR для аллеля А – 4,28 [11].

Ген *HMGB1* локализован на длинном плече хромосомы 13 (13q12.3) и кодирует белок HMGB1 (амфотерин), который секретируется активированными макрофагами и моноцитами как цитокиновый медиатор. Кроме этого, будучи ядерным белком, HMGB1 может высвобождаться при некрозе клеток и тканей. После высвобождения из клеток белок может связываться с рецептором врожденного иммунитета TLR4, что приводит к секреции цитокинов макрофагами и последующей воспалительной реакции. Из-за высокой токсичности при высвобождении из клеток при значительном повреждении тканей белок HMGB1 рассматривается как одна из возможных терапевтических мишеней при сепсисе [23]. В исследовании W. Song и соавт., где исследовали 328 больных с пневмонией, выявлена взаимосвязь между генными вариантами rs1412125 T/C, rs2249825 C/G и тяжестью пневмонии. При генотипе TC OR = 1,740, генотипе TT OR = 4,728 (rs1412125 T/C). При генотипе CG OR = 1,754, генотипе GG OR = 3,869 (rs2249825 C/G) [13].

Ген *ATG16L1* локализован на длинном плече хромосомы 2 (2q37.1) и ответствен за синтез внутриклеточного белка, участвующего в процессе аутофагии, взаимодействуя с другими белками этого комплекса [24]. В работе A. Savva и соавт., где исследовали 200 больных с сепсисом из-за ИВЛ-ассоциированной пневмонии (ИЛА-АП), показано, что вариант rs2241880 G/A влияет на тяжесть ИВЛ-АП. OR для аллеля А – 2,4 [14].

Ген *AGTR1* локализован на длинном плече хромосомы 3 (3q24) и кодирует выработку рецептора ангиотензина 1В типа, который опосредует основные кардиоваскулярные эффекты ангиотензина II [25]. В исследовании L. Salnikova и соавт., где исследовали 350 (славяне, в том числе русские) больных с пневмонией, найдена взаимосвязь между вариантом rs5186 A/C и осложнениями пневмонии, а также с развитием острой дыхательной недостаточности (ОДН). Риск осложненного течения пневмонии при наличии аллеля С довольно высокий, отношение OR составляет 1,862 [15].

Ген *GCLC* локализован на коротком плече хромосомы 6 (6p12.1) и кодирует тяжелую субъединицу белка глутамат-цистеин лигазы, который участвует в синтезе глутатиона из L-цистеина и L-глутамата [26]. В исследовании L. Salnikova и соавт., где исследовали 350 (славяне, в том числе русские) больных с пневмонией, найдена взаимосвязь между вариантом rs17883901 C/T и осложнениями пневмонии, а также с развитием ОДН. Риск осложненного течения пневмонии выражен для аллеля Т – OR = 3,36 (развитие осложнений) и OR = 1,33 (ОДН) [15].

Ген *CAT* локализован на коротком плече хромосомы 11 (11p13) и кодирует каталазу – фермент, участвующий в клеточном дыхании, а также катализирующий разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород [27]. В исследовании L. Salnikova и соавт. (2013), где исследовали 350 (славяне, в том числе русские) больных с пневмонией, найдена взаимосвязь между вариантом rs17880664 T/A и осложнениями пневмонии. OR для генотипа AA – 1,85 [15].

Ген *IFNG* локализован на длинном плече хромосомы 12 (12q15) и кодирует растворимый цитокин, являющийся членом класса интерферонов II типа. Он секретируется клетками как адаптивного, так и приобретенного иммунитета. В активной форме этот белок связывается с рецептором интерферона гамма и активирует клеточный ответ на вирусную или бактериальную инфекцию [28]. В исследовании D. Wang и соавт. (2014), где приняли участие 196 больных пневмония-индуцированным сепсисом, показано, что генные варианты rs2069705 T/C и rs2430561

A/T связаны с развитием сепсиса у больных с пневмонией. Для единичной нуклеотидной замены rs2069705 T/C, OR генотипа TC – 1,99, генотипа TT – 1,22, TC+TT – 1,84, OR для аллеля T – 1,39. Для единичной нуклеотидной замены rs2430561 A/T, OR генотипа TA – 1,68, генотипа AA – 1,70, TA+AA – 1,68, аллеля A – 1,49 [16].

Ген *FCGR2A* локализован на длинном плече хромосомы 1 (1q23.3) и кодирует рецептор II-A области Fc иммуноглобулина с низкой аффинностью (он же CD32A) и участвует в активации клеточного ответа [29]. В работе Н. Endeman и соавт. (2009), в которой обследовали 201 пациента с пневмониями и пневмония-индуцированным сепсисом, выявлена корреляция между вариантом rs1801274 T/C и развитием тяжелого сепсиса. OR генотипа CC – 2,55 [17].

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным проанализированных нами исследований, тяжесть течения пневмонии и ее исход ассоциированы с развитием осложнений и формированием системной воспалительной реакции [8–17]. С прогностической точки зрения исхода пневмонии наиболее значимыми осложнениями являются синдром системной воспалительной реакции, острый респираторный дистресс-синдром, синдром полиорганной недостаточности, а также плеврит, эмпиема и деструктивная пневмония [30].

Исходя из приведенных выше результатов систематического обзора по представленной проблеме в настоящее время доказана связь по меньшей мере 12 генов и полиморфизмов в них с тяжелым течением пневмонии. В основном это гены, отвечающие за различные реакции врожденного иммунитета.

Однако несмотря на строго проведенный отбор генов, генетические варианты которых ассоциированы с риском тяжелого течения пневмонии, обращает на себя внимание, что в числе отобранных оказались гены, отвечающие за синтез многофункциональных, часто неспецифических факторов, таких как белки, регулирующие сосудистый гомеостаз (гены *PAII* и *AGTRI*). Это значительно понижает уровень достоверности интерпретации роли данных полиморфизмов как предикторов клинических особенностей течения пневмоний и требует дальнейшего более углубленного изучения обозначенной проблемы.

Кроме того, каждый из представленных генных вариантов не оказывает действие изолированно, а вносит свой вклад в риск развития заболевания в контексте общей совокупности генетической конституции пациента. Несколько лет назад рядом исследователей была выдвинута гипотеза, что большее значение для оценки прогноза и характера течения

пневмонии имеет сочетание двух и более рискованных аллелей генов-кандидатов. Так, в исследовании J.N. Siebert и соавт. (2018) продемонстрировано, что комбинированные нуклеотидные полиморфизмы в *TLR1* или *TLR6* и *TIRAP* ассоциированы с уменьшением высвобождения IL-6 и предрасполагают к развитию пневмонии [31].

В связи с этим особое внимание должно быть уделено изучению взаимодействия генетических факторов между собой и исследованию роли сочетания полиморфизмов генов рецепторов и опсонизирующих белков, участвующих в реакциях врожденного иммунитета. Поэтому предпочтительными являются такие подходы в определении наличия генетических ассоциаций, которые включают в себя множество генетических маркеров.

В настоящем обзоре мы сознательно не поднимаем тему генетических особенностей человека, способствующих преимущественному развитию инфекционного процесса, ассоциированного с инфицированием определенными видами микроорганизмов. Это отдельная большая область для изучения. В настоящий момент описано более 100 микроорганизмов, которые при определенных условиях могут явиться возбудителями пневмонии. В большинстве случаев это *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *H. influenzae*, респираторные вирусы, энтеробактерии (*K. pneumoniae* и *E. coli*) и *S. aureus* [30].

Вопрос влияния генетических факторов на течение пневмонии в зависимости от вызвавшего ее возбудителя требует отдельного детального разбора и анализа имеющихся данных мировой литературы и результатов осуществленных работ по этой проблеме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного анализа опубликованных данных с 2000 по 2021 г. идентифицировано 16 полиморфизмов в 12 генах человека, способных влиять на тяжесть течения пневмонии. Отношение шансов тяжелого течения пневмонии при наличии рискованных аллелей составляет 1,4–4,3. Необходимо дальнейшее изучение влияния данных генетических факторов на исходы пневмонии в группах пациентов различных популяций с одновременной оценкой совокупного влияния генетических вариантов и взаимодействия генов между собой. С этой целью возникает необходимость разработки молекулярно-биологических систем детекции интересующих генетических маркеров.

Кроме того, для лучшего понимания структуры генетической предрасположенности к тяжелому течению пневмонии в России необходимо провести анализ частот аллелей искомым полиморфизмов в

отечественных популяциях. Чтобы улучшить наше понимание значимости генетических полиморфизмов в развитии респираторных заболеваний, следующим шагом должно стать исследование их молекулярных эффектов в сочетании с широкомасштабными клиническими исследованиями пациентов с пневмониями.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2013;2(3):91–123.
2. WHO statistics on mortality and disability worldwide: URL: <https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019> (дата обращения: 11.02.2022).
3. Рачина С.А., Синопальников А.И. Клинические рекомендации по внебольничной пневмонии у взрослых: что нас ждет в 2019 г. *Практическая пульмонология*. 2018;3:8–13.
4. Шаповал И.Н., Никитина С.Ю., Агеева Л.И., Александрова Г.А., Зайченко Н.М., Кириллова Г.Н. и др. Общественное здравоохранение в России. 2019. М.: Росстат, 2019:170.
5. Kloek A.T., Brouwer M.C., Van de Beek D. Host genetic variability and pneumococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2019;12(1):130. DOI: 10.1186/s12920-019-0572-x.
6. Metlay J.P., Waterer G.W., Long A.C., Anzueto A., Brozek J., Crothers K. et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019;200(7):e45–e67. DOI: 10.1164/rccm.201908-1581ST.
7. Rachina S.A., Dekhnich N.N., Kozlov R.S., Bobylev A.A., Batishcheva G.A., Gordeeva S.A. et al. Severity assessment of community-acquired pneumonia in real clinical practice in a multi-profile hospital in Russia. *Pulmonologiya [Pulmonology]*. 2016;26(5):521–528. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-5-521-528.
8. Song H., Tang L., Xu M., Li H., Xu S., Li G. et al. CD86 polymorphism affects pneumonia-induced sepsis by decreasing gene expression in monocytes. *Inflammation*. 2015;38(2):879–885. DOI: 10.1007/s10753-014-9997-8.
9. Wang C., Gui Q., Zhang K. Functional polymorphisms in CD86 gene are associated with susceptibility to pneumonia-induced sepsis. *APMIS*. 2015;123(5):433–438. DOI: 10.1111/apm.12364.
10. Mao Z.R., Zhang S.L., Feng B. Association of IL-10 (-819T/C, -592A/C and -1082A/G) and IL-6 -174G/C gene polymorphism and the risk of pneumonia-induced sepsis. *Biomarkers*. 2017;22(2):106–112. DOI: 10.1080/1354750X.2016.1210677.
11. Feng B., Mao Z.R., Pang K., Zhang S.L., Li L. Association of tumor necrosis factor α -308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *J. Crit. Care*. 2015;30(5):920–923. DOI: 10.1016/j.jcrc.2015.04.123.
12. Madách K., Aladzsity I., Szilágyi A., Fust F., Gál J., Péntes I. et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. *Crit. Care*. 2010;14(2):R79. DOI: 10.1186/cc8992.
13. Song W., Tan H., Wang S., Zhang Y., Ding Y. Association of High Mobility Group Box Protein B1 Gene Polymorphisms with Pneumonia Susceptibility and Severity. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2019;23(1):3–11. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0174.
14. Savva A., Plantinga T.S., Kotanidou A., Farcas M., Baziaka F., Raftogiannis M. et al. Association of autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1) gene polymorphism with sepsis severity in patients with sepsis and ventilator-associated pneumonia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014;33(9):1609–1614. DOI: 10.1007/s10096-014-2118-7.
15. Salnikova L.E., Smelaya T.V., Golubev A.M., Rubanovich A.V., Moroz V.V. CYP1A1, GCLC, AGT, AGTR1 gene-gene interactions in community-acquired pneumonia pulmonary complications. *Mol. Biol. Rep.* 2013;40(11):6163–6176. DOI: 10.1007/s11033-013-2727-8.
16. Wang D., Zhong X., Huang D., Chen R., Bai G., Li Q. et al. Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PLoS One*. 2014;9(1):e87049. DOI: 10.1371/journal.pone.0087049.
17. Endeman H., Cornips M.C.A., Grutters J.C., Van den Bosch J., Ruven H.J.T., Van Velzen-Blad H. et al. The Fc γ receptor IIA-R/R131 genotype is associated with severe sepsis in community-acquired pneumonia. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009;16(7):1087–1090. DOI: 10.1128/CI.00037-09.
18. Van Coillie S., Wiernicki B., Xu J. Molecular and cellular functions of CTLA-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020;1248:7–32. DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5_2.
19. Rose-John S. The Soluble interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2017;102(4):591–598. DOI: 10.1002/cpt.782.
20. Feng H., Feng J., Zhang Z., Xu Q., Hu M., Wu Y. et al. Role of IL-9 and IL-10 in the pathogenesis of chronic spontaneous urticaria through the JAK/STAT signaling pathway. *Cell Biochem. Funct.* 2020;38(4):480–489. DOI: 10.1002/cbf.3481.
21. Jacobs A., Schutte A.E., Ricci C., Pieters M. Plasminogen activator inhibitor-1 activity and the 4G/5G polymorphism are prospectively associated with blood pressure and hypertension status. *J. Hypertens.* 2019;37(12):2361–2370. DOI: 10.1097/HJH.0000000000002204.
22. Holbrook J., Lara-Reyna S., Jarosz-Griffiths H., McDermott M. Tumour necrosis factor signaling in health and disease. *F1000Res*. 2019;8:F1000. DOI: 10.12688/f1000research.17023.1.
23. Andersson U., Yang H., Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2018;22(3):263–277. DOI: 10.1080/14728222.2018.1439924.
24. Gammoh N. The multifaceted functions of ATG16L1 in autophagy and related processes. *J. Cell Sci.* 2020;133(20):jcs249227. DOI: 10.1242/jcs.249227.
25. Carlus S.J., Carlus F.H., Al-Harbi M.K., Al-Mazroea A.H., Al-Harbi K.M., Abdallah A.M. The Polymorphism at the microRNA-155 binding site in the AGTR1 gene is not significant.

- cantly associated with rheumatic heart disease in Saudi Arabia Population. *Microna*. 2020; 9(4):266–270. DOI: 10.2174/2211536609666200108093657.
26. Lu S.C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1830(5):3143–3153. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
 27. Bašić J., Vojinović J., Jevtović-Stoimenov T., Despotović M., Cvetković T., Lazarević D. et al. The association of CAT-262C/T polymorphism with catalase activity and treatment response in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol. Int.* 2019;39(3):551–559. DOI: 10.1007/s00296-019-04246-3.
 28. Wu S., Wang Y., Zhang M., Wang M., He J.Q. Genetic variants in IFNG and IFNGR1 and tuberculosis susceptibility. *Cytokine*. 2019;123:e154775. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154775.
 29. Anania J.C., Chenoweth A.M., Wines B.D., Hogarth P.M. The Human FcγRII (CD32) family of leukocyte FcR in health and disease. *Front. Immunol.* 2019;10:e464. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00464.
 30. Клинические рекомендации по внебольничной пневмонии Российского пульмонологического общества (дата обращения: 11.02.2022).
 31. Siebert J.N., Hamann L., Verole C.M., Gameiro C., Grillet S., Siegrist C.A. et al. Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein 180l single-nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to recurrent pneumococcal lower respiratory tract infections in children. *Front. Immunol.* 2018;9:e1780. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01780.

Вклад авторов

Карнаушкина М.А. – разработка концепции и дизайна исследования, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи. Литвинова М.М. – разработка концепции и дизайна исследования, редактирование, статистическая обработка результатов и подготовка текста. Корчагин В.И., Саламайкина С.А., Васильева И.С., Свиридов Ф.С., Вацик-Городецкая М.В. – поиск и анализ литературы, обработка результатов исследования.

Информация об авторах

Карнаушкина Мария Александровна – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева, РУДН, г. Москва, kar3745@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8791-2920>

Свиридов Филипп Спартакович – науч. сотрудник, лаборатория мутагенеза, Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова; лаборант-исследователь, научный центр интегративной и трансляционной медицины медицинского института, РУДН, г. Москва, philipp.sviridov96@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3767-9339>

Корчагин Виталий Игоревич – канд. мед. наук, науч. сотрудник, группа по разработке новых методов выявления генетических полиморфизмов, Центральный НИИ эпидемиологии, г. Москва, vity_korchagin@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Саламайкина Светлана Андреевна – мл. науч. сотрудник, Центральный НИИ эпидемиологии, г. Москва.

Васильева Ирина Сергеевна – канд. мед. наук, ассистент кафедры госпитальной терапии № 2, Сеченовский Университет, г. Москва, emmans@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2654-1561>

Литвинова Мария Михайловна – канд. мед. наук, доцент кафедры медицинской генетики, Сеченовский Университет; клинический генетик, МКНЦ им. Логина, г. Москва, mariya.litvinova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-1863-3768>

Вацик-Городецкая Мария Васильевна – канд. мед. наук, зам. гл. врача по анестезиологии-реаниматологии, ГКБ им. В.В. Виноградова, г. Москва, m.vatsyk@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-6874-8213>

(✉) **Васильева Ирина Сергеевна**, emmans@rambler.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022;
одобрена после рецензирования 16.05.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 577.218:577.216

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-170-182>

Методы оценки влияния микроРНК на гены стволовой пластичности

Першина А.Г.¹, Невская К.В.¹, Морозов К.Р.¹, Литвяков Н.В.^{1,2}

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, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Согласно современным представлениям, для перехода микрометастаза в макрометастаз дифференцированная раковая клетка должна перейти в дедифференцированное состояние. Ключевую роль в данном переходе играет активация генов стволовой пластичности. Подавление экспрессии генов стволовой пластичности с использованием микроРНК может стать основой для разработки эффективных антиметастатических препаратов. Приведен обзор существующих методов оценки влияния микроРНК на гены стволовой пластичности и процесс дедифференцировки раковой клетки.

Ключевые слова: микроРНК, рак, гены стволовой пластичности

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1073 от 29.09.2021).

Для цитирования: Першина А.Г., Невская К.В., Морозов К.Р., Литвяков Н.В. Методы оценки влияния микроРНК на гены стволовой пластичности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):170–182. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-170-182>.

Methods for assessing the effect of microRNA on stemness genes

Pershina A.G.¹, Nevskaya K.V.¹, Morozov K.R.¹, Litviakov N.V.^{1,2}

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Sciences
5, Kooperativnii Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

ABSTRACT

According to the latest concepts, for micrometastasis to develop into macrometastasis, differentiated cancer cells must revert to a dedifferentiated state. Activation of stemness genes plays a key role in this transition. Suppression of stemness gene expression using microRNAs can become the basis for the development of effective anti-metastatic

drugs. This article provides an overview of the existing methods for assessing the effect of microRNAs on stemness genes and cancer cell dedifferentiation.

Keywords: microRNA, cancer, stemness genes

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

Source of financing. The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2021-1073 of 29.09.2021).

For citation: Pershina A.G., Nevskaya K.V., Morozov K.R., Litviakov N.V. Methods for assessing the effect of microRNA on stemness genes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):170–182. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-170-182>.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение фундаментальных механизмов канцерогенеза и поиск новых препаратов для терапии злокачественных новообразований являются одними из ведущих задач онкологии [1]. Серьезной проблемой, осложняющей успешное лечение злокачественных новообразований, является метастатическая болезнь. В зависимости от локализации опухоли и стадии заболевания, доля больных, у которых развиваются метастазы, варьирует от 15 до 90%. При подавляющем большинстве локализаций онкологические пациенты умирают от метастазов [2, 3]. На сравнительно ранних этапах развития опухоли часть раковых клеток экстравазирует в сосуды и разносится кровеносной системой по разным органам и тканям – формируются так называемые микрометастазы. В микрометастазах раковые клетки могут находиться длительное время в покое (дорматном) состоянии и при определенных условиях давать начало макрометастадам. Согласно современным представлениям, для перехода микрометастаза в макрометастаз дифференцированная раковая клетка должна перейти в дедифференцированное состояние. Ключевую роль в данном переходе играют гены стволовой пластичности.

Было показано, что стволовая пластичность клетки связана с экспрессией ряда генов (*SOX2*, *MYC*, *OCT*, *NANOG* и т.д.) [4–6]. Изменение экспрессии данных генов может быть опосредовано влиянием широкого спектра факторов, в том числе некодирующих РНК (длинной некодирующей РНК, малой интерферирующей РНК, микроРНК) [7–9]. В настоящее время активно изучаются подходы к изменению экспрессии генов стволовой пластичности с использованием микроРНК [10], так как они могут лечь в основу создания эффективного антиметастатического препарата. В данной статье приведен обзор существующих методов оценки влияния микроРНК на гены стволовой пластичности и процесс дедифференцировки раковой клетки.

ГЕНЫ СТВОЛОВОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Транскрипционные факторы, ассоциированные со стволовостью, играют ключевую роль в процессах канцерогенеза. Гены *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *MYC* необходимы для самообновления, перепрограммирования и поддержания гомеостаза стволовых клеток. Гиперэкспрессия генов данных транскрипционных факторов ассоциирована с развитием и прогрессией широкого спектра онкологических заболеваний – рака молочной железы [11–14], меланомы [15–17], остеосаркомы [18–20], плоскоклеточного рака головы и шеи [21–23], колоректального рака [24–26], рака шейки матки [27, 28], поджелудочной железы [29–31], желудка [32–35]. При этом наиболее высоким уровнем экспрессии *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *MYC* характеризуются агрессивные, метастазирующие и химиорезистентные опухоли [17, 35–42].

Экспрессия генов стволовости обеспечивает поддержание стволового фенотипа, самообновление опухолевых стволовых клеток, пролиферацию прогениторных опухолевых клеток, стимулирует дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток [43, 44]. Гены стволовости обеспечивают свои функции, участвуя практически во всех сигнальных путях, связанных с пролиферацией (WNT/β-catenin, сигнальный путь Notch, передача сигналов Hedgehog (HH) и Sonic Hedgehog (SHH), передача сигналов NRF2, передача сигналов PI3K/AKT/mTOR и др.) [45]. Активация программы самообновления является неотъемлемой частью стволовости опухолевых стволовых клеток (ОСК), активно способствуя прогрессированию и метастазированию опухоли, вызывая высокий клеточный оборот и продукцию прогениторных клеток [46]. Более того, способность ОСК к длительному самообновлению – одна из основных причин развития устойчивости к противоопухолевым препаратам [47, 48]. Так, например, развитие *SOX2*-опосредованной резис-

стентности к химиотерапии показано при колоректальном раке, плоскоклеточном раке головы и шеи, аденокарциноме протоков поджелудочной железы, раке молочной железы [21, 38, 49, 50]. Эктопическая коэкспрессия Oct4/Nanog приводит к тому, что клетки немелкоклеточного рака легких (NSCLC) приобретают свойства ОСК, включая самообновление, лекарственную устойчивость, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и высокую опухоль-иницирующую активность [51]. Уже непосредственно в очаге возможного метастазирования эктопическая экспрессия генов стволовости может обеспечивать приобретение дифференцированными опухолевыми клетками метастатического потенциала за счет дедифференцировки до ОСК [5, 52]. Таким образом, гены стволовости можно считать ключевыми факторами метастазирования опухолей, резистентности опухолевых клеток к лечению и поддержания популяции ОСК.

ВЛИЯНИЕ микроРНК НА ГЕНЫ СТВОЛОВОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

МикроРНК (miRNAs) – короткие двухцепочечные РНК длиной 20–23 нуклеотида, которые на 5'-конце имеют уникальную последовательность seed sequence длиной 6–7 нуклеотидов; данная последовательность связывается с мРНК и таким образом реализуется посттранскрипционная регуляция экспрессии генов (рис. 1). В настоящее время в геноме человека известно более 2 500 микроРНК, которые регулируют нормальные процессы развития и гомеостаза в клетке. Информация о микроРНК может быть получена с использованием баз данных, например <https://www.mirbase.org/>, в которой можно найти описание опубликованных последовательностей микроРНК, или <https://miRTarBase.cuhk.edu.cn/>, где приведены экспериментально подтвержденные гены-мишени для микроРНК и др.

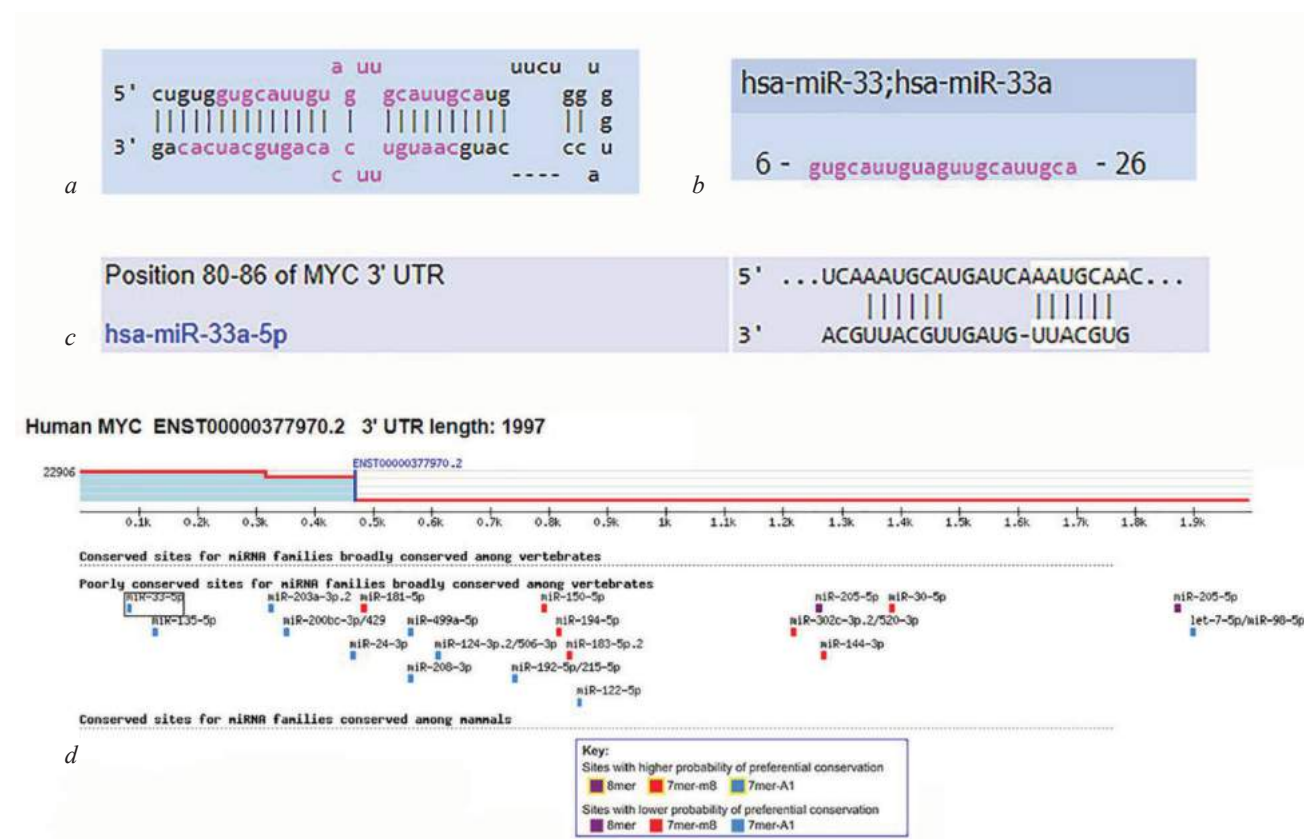


Рис. 1. Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов: *a* – структура незрелой микроРНК; *b* – зрелой микроРНК, поступающей в активный сайт белка-аргоната, hsa-miR-33 (база данных miRBase); *c* – связывание hsa-miR-33 с 3'-нетранслируемой областью мРНК, кодирующей транскрипционный фактор с-Мус (*d*). Сайты связывания для различных микроРНК в 3'-нетранслируемой области мРНК гена *MYC*, предсказанные программой TargetScan

Внеклеточные микроРНК в микровезикулах, попадая в клетки-мишени, способны действовать как аутокринные, паракринные и (или) эндокринные регуляторы клеточных процессов [53]. В совокупности микроРНК-опосредованная регуляция может затрагивать до 60% транскриптома клетки, оказывая существенное влияние как на экспрессию белков, так и на функцию клетки в целом [54–56]. Более подробно о биогенезе и механизме действия микроРНК можно прочитать в статьях [57, 58].

В опухолевых клетках наблюдается глобальная дисрегуляция микроРНК [59]. В литературе можно найти подтверждение вовлеченности микроРНК в регуляцию всех процессов, приводящих к измене-

ниям, характерным для опухолевой клетки (рис. 2) [60] – поддержание пролиферативного сигналинга, избегание супрессии (угнетения) клеточного роста, сопротивление клеточной гибели, неограниченное деление («клеточное бессмертие»), индукция ангиогенеза (прорастания новых сосудов), активация инвазии (проникновения в окружающие ткани) и метастазирования, перепрограммирование энергетического метаболизма, избегание уничтожения со стороны иммунной системы, эпигенетическое перепрограммирование, влияние полиморфных микробиомов, клеточное старение, фенотипическая пластичность и, соответственно, тесно связанная с ней регуляция генов стволовой пластичности.

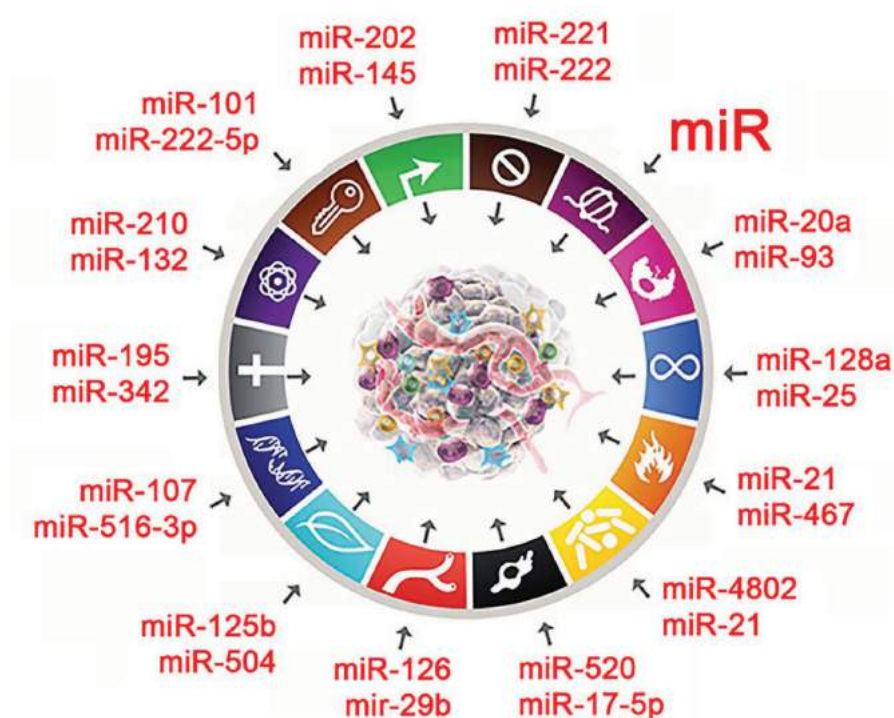


Рис. 2. Примеры микроРНК, участвующих в регуляции процессов в клетке, которые отвечают за отличие нормальной клетки от раковой (адаптировано из [60])

Необходимо отметить, что выявление про- или антионкогенных свойств для каждой конкретной микроРНК – достаточно сложная задача, поскольку паттерны их экспрессии являются тканеспецифичными. Каждый вид микроРНК может связываться со множеством мРНК и в то же время один тип мРНК может быть мишенью для подмножества микроРНК [61]. Более того, одна микроРНК способна регулировать несколько мишеней, контролируемых разными сигнальными путями [62] (см. рис. 1, d). Роль специфической микроРНК зависит от контекста – она может выступать в одной ситуации в качестве опухолевого супрессора и в качестве онкогена – в другой. Раз-

ные ткани (клетки) экспрессируют разные наборы длинных некодирующих РНК (нкРНК) и кольцевых РНК, РНК-связывающих белков, РНК-модифицирующих и РНК-редактирующих белков [63]. Взаимодействие с данными белками позволяет делать сайты связывания микроРНК на мРНК доступными или недоступными. Длинные нкРНК и кольцевые РНК, имеющие сайт связывания микроРНК, могут действовать как «РНК-губки» или ловушки, выводящие микроРНК из игры. Дополнительным фактором является альтернативное полиаденилирование мРНК, влияющее на наличие сайта связывания для микроРНК [63].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ микроРНК НА ЦЕЛЕВЫЕ ГЕНЫ

Способность микроРНК поддерживать стволовую пластичность, регулировать ЭМП и мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), аутофагию, резистентность и дедифференцировку опухолевых клеток изучают с использованием относительно небольшого спектра методов *in vitro* и *in vivo* (см. таблицу). На первом этапе для подтверждения возможности влияния конкретной микроРНК на определенный ген используют биоинформатический анализ наличия сайтов связывания и люциферазный репортерный анализ, позволяющий валидировать гены-мишени микроРНК. Второй этап включает в себя оценку влияния микроРНК на экспрессию целевого гена (например, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени) и, как следствие, продукцию белка (например, методом вестерн-блот). Третий этап включает в себя оценку влияния микроРНК на функциональную активность клеток – пролиферацию, маммосферообразование, миграционную активность и др.

Для прогнозирования генов-мишеней конкретных микроРНК используют инструменты онлайн-анализа в базах данных, таких как TargetScan (<https://www.targetscan.org/>) и miRDB (<https://www.mirdb.org>) [83, 84]. После проведения биоинформатического анализа данных для проверки функциональной релевантности предсказанных пар микроРНК-мРНК целевого гена-мишени используют различные модификации люциферазного репортерного анализа, в котором люцифераза выступает в качестве репортерного белка [85]. Методом генетического клонирования на 3'-конец гена люциферазы добавляют последовательность 3'-нетранслируемой области мРНК гена интереса. Если клетка успешно синтезировала репортерный белок (люциферазу), то добавление субстрата приводит к химической реакции, протекание которой можно регистрировать по появлению биolumинесценции, причем интенсивность биolumинесценции пропорциональна количеству успешно транслированных мРНК [86]. Таким образом, снижение биolumинесценции после обработки клеток микроРНК свидетельствует о ее взаимодействии с мРНК.

Для определения уровня экспрессии генов под влиянием микроРНК также широко используют ПЦР в реальном времени, позволяющую оценивать экспрессию гена на основании данных определения количества мРНК в образце [87]. Определение белкового продукта целевого гена проводят преимущественно методом вестерн-блота. Данный метод включает в себя проведение SDS-PAGE электрофо-

реза биообразца, перенос белков-мишеней на гидрофобную мембрану и их детектирование с использованием специфических антител [88].

Для анализа пролиферативной активности клеток под действием микроРНК используют различные способы подсчета клеток – от базовых с окраской трипановым синим до более сложных многоэтапных протоколов. Одним из наиболее распространенных методов оценки пролиферативной активности клеток является МТТ-тест, основанный на ферментативном восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (желтого растворимого тетразолиевого красителя) митохондриальными дегидрогеназами до пурпурно-фиолетовых кристаллов формазана. Кристаллы растворяют в ДМСО, после чего анализируют оптическую плотность полученных образцов [89]. Аналогами МТТ-теста являются MTS-тест, для проведения которого используется другой тип тетразолиевого красителя – (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий), и ССК-8-тест с применением тетразолиевой соли WST-8. Данные типы красителей растворимы в воде и не требуют этапа солиubilизации, что снижает вероятность погрешности при проведении анализа [90].

Другим подходом к оценке пролиферативной активности клеток является анализ включения аналога нуклеотида BrdU, который способен встраиваться в реплицирующуюся ДНК и может быть определен с использованием специфических антител [91]. Новым видом оценки пролиферативной активности и гибели клеток в режиме реального времени является использование прибора RTCA iCELLigence по измерению импеданса. При этом не требуется никаких красителей, а клетки можно наблюдать в течение длительного времени. Однако метод применим только к адгезионным клеточным культурам [92]. Также для анализа выживаемости клеток и их способности к пролиферации после обработки микроРНК используют клоногенный анализ, основанный на способности отдельных клеток давать начало колонии. Клетки рассаживают в очень низкой плотности и инкубируют в течение 1–3 нед, после чего фиксируют, окрашивают кристаллическим фиолетовым и проводят подсчет количества образовавшихся колоний [93].

Жизнеспособность клеток в ряде исследований оценивают по наличию или отсутствию цитофлуориметрических признаков некроза, апоптоза и вторичного некроза с использованием соответствующих флуоресцентно-меченных антител, таких как Annexin V, caspase-Glo 3/7 и ДНК-связывающих красителей (пропидий йодид или 7-аминоактиномицин D) [94]. Также методом проточной цитофлуоримет-

трии возможно определение влияния микроРНК на фазы клеточного цикла предварительно фиксированных клеток с использованием ДНК-связывающих красителей [95].

Для оценки фенотипического профиля клеток изучают экспрессию маркеров стволовых клеток CD24, CD44, CD133, ALDH, используя флуоресцентно-меченные антитела [96]. Экспрессию белков – маркеров стволовой пластичности CD44, CD24, CD133, LGR5 и ЭМП Snail, Slug, Zeb1, Cloudin1, B-catenin, E-кадгерина, виментина – оценивают методом иммуноцитохимии и вестерн-блот анализа.

Для изучения миграционной способности клеток используют несколько тестов. Одна из вариаций миграционного теста заключается в том, что после достижения клетками монослоя на дне плашки проводят полосу с использованием скребка для клеток или наконечника пипетки, после чего оценивают в динамике миграцию клеток и восстановление конфлюентности [97]. Также распространен миграционный тест с использованием вкладышей Transwell для плашек. Дно данных вкладышей имеет поры, позволяющие клеткам перемещаться из вкладыша в лунку планшета. Таким образом, оценка миграционной способности осуществляется исходя из количества клеток, прошедших через поры вкладыша и оказавшихся в лунке планшета [97]. С использованием вкладышей Transwell также проводят оценку способности клеток к инвазии. Перед проведением теста дно вкладыша покрывают солубилизованным внеклеточным матриксом Matrigel, при полимеризации которого формируется структура, сходная по составу и свойствам с базальной мембраной. В результате количество клеток, способных пройти через Matrigel и оказавшихся в основной лунке, коррелирует с их способностью к инвазии [97].

Способность опухолевых клеток инициировать опухолевый рост определяют методом образования сфероидов (для клеток рака молочной железы – маммосфер). Для этого суспензию единичных клеток рассаживают в лунки с гидрофобным покрытием дна в бессывороточной среде с добавлением ростовых факторов или в коммерческой среде Mammocult. Через 5–14 дней оценивают количество образовавшихся сфероидов диаметром от 35–100 мкм в зависимости от используемой клеточной линии и дизайна эксперимента [98, 99]. Формирование сфероидов в данном случае является *in vitro* прототипом метастазирования. Также возможно оценить способность клеток в составе сфероидов к самообновлению, деагрегируя первичные сфероиды и рассаживая их вновь на низкоадгезионный пластик в бессывороточной среде для образования вторичных и, по анало-

гии, третичных сфероидов [100]. Для предотвращения миграции сфероидов и их агрегации используют модификацию метода – образование сфероидов в мягком агаре [101].

Отдельным блоком работ при исследовании роли микроРНК в канцерогенезе являются эксперименты *in vivo* на иммунодефицитных мышах (nude, NOD/SCID). Для оценки туморогенности используют клетки, трансфецированные микроРНК миметиками, либо генетически модифицированные клеточные линии, экспрессирующие целевую микроРНК. После подкожного введения клеток оценивают скорость роста опухоли, ее гистологическую структуру и экспрессию интересующих маркеров с помощью иммуногистохимического окрашивания [69, 71, 73, 75].

МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

За последние 5–7 лет микроРНК были широко исследованы как компонент опухолевых супрессирующих и онкогенных путей. Есть отдельные исследования регуляции генов стволовости при помощи микроРНК в опухолевых тканях различных локализаций. Нокдаун *SOX2* при помощи антисмысловых РНК ингибирует инвазию и миграцию клеток рака молочной железы [8]. МикроРНК miR-302b, P21 и miR-145 подавляют экспрессию генов стволовости *SOX2* и *MYC* при интестинальном и диффузном раке желудка [102]. Гиперэкспрессия miR-145 ингибирует стволовые факторы транскрипции *SOX2*, *NANOG* и *OCT4* в стволовых опухолевых клетках шейки матки, а также уменьшает инвазию опухоли и образование колоний *in vitro*. Нокдаун miR-145 приводит к значительному уменьшению роста опухоли шейки матки у мышей линии nude [9].

Было показано, что miR-148a ингибирует стволовые свойства глиобластомы и метастатический потенциал глиомы посредством ингибирования *SOX2* и *OCT4*. Кроме этого, пониженная экспрессия pre-miR-29a, pre-miR-181, pre-miR-let7b и pre-miR-124a наблюдается в опухолевых стволовых клетках, экспрессирующих *SOX2* и *OCT4*. miR-148a была признана одной из наиболее значимых микроРНК, осуществляющих негативную регуляцию в ответ на коэкспрессию *OCT4* и *Sox2*. Экспрессия miR-148a ингибирует индуцированные *OCT4/Sox2*-опухолевые стволовые фенотипы при глиоме, включая сферообразующую активность *in vitro* и образование опухоли *in vivo* [103]. Показано, что мишенями для miR-221-3p и miR-221-5p являются 3'-нетранслируемые области транскриптов мРНК основных факторов плюрипотентности *OCT4*, *Nanog* и *Sox2* в мышинных эмбриональных клетках [104].

Таблица

Методы исследования способности микроРНК поддерживать стволовую пластичность клеток, стимулировать ЭМП и дифференцировку опухолевых клеток						
Ген	miR	Локализация опухоли	Линия клеток	Экспрессия гена	Эффекты	Метод
<i>c-MYC</i>	miR-340	Рак молочной железы	MDA-MB231	↓ RT, WB	↓ пролиферации ↓ миграции ↓ инвазии	MTT-тест Transwell-миграция Transwell-миграция в матрикеле
	miR-320a	Гепатоцеллюлярная карцинома	HerG2, QGY-7703	↓ RT, WB	↓ пролиферации ↓ инвазии	MTT-тест Transwell-миграция в матрикеле
	miR-320a	Рак молочной железы	MCF-7, T47D	↓ RT, WB	↓ пролиферации ↓ устойчивости к тамоксифену ↓ количества маммофер	MTT-тест ССК-8-тест Маммоферобразование в мягком агаре
	miR-145	Рак поджелудочной железы	PDAC	↓ RT, WB	↓ миграции	Миграционный тест
	miR-34a	Рак поджелудочной железы	MiaPaCa2	↓ WB	↓ формирования колоний	Метод образования колоний
	miR-590-5p	Рак молочной железы	MCF-7, ZR75-1	↓ RT, WB	↓ экспрессии ALDH ↓ количества маммофер ↓ туморогенности <i>in vivo</i>	Проточная цитофлуориметрия Маммоферобразование Ксеноплантация под-SCID мышам
<i>SOX2</i>	miR-590-5p	Немелкоклеточный рак легкого	A549, H1299	↓ RT, WB	↑ экспрессии E-кадгерина ↓ экспрессии виментина, Snail, Slug	WB WB
	miR-101	Рак молочной железы	MCF-7, MDA-MB231	↓ RT, WB	↓ образования колоний ↓ миграции ↓ инвазии ↓ пролиферации ↑ апоптоза ↓ туморогенности <i>in vivo</i>	Метод образования колоний Миграционный тест Transwell-миграция в матрикеле MTT-тест Проточная цитофлуориметрия Ксеноплантация nude мышам
	miR-129-5p	Рак молочной железы	MCF-7, MDA-MB231	↓ RT	↓ миграции ↓ инвазии ↑ апоптоза ↓ образования колоний ↓ резистентности к адриамицину	Миграционный тест Transwell-миграция в матрикеле Проточная цитофлуориметрия Метод образования колоний ССК-8-тест
<i>NANOG</i>	miR-760	Рак молочной железы	MCF-7, BT-549	↓ RT, WB	↓ пролиферации ↓ миграции ↓ туморогенности <i>in vivo</i>	MTT-тест Transwell-миграция Ксеноплантация nude мышам

miR-142-3p	Рак молочной железы	MCF-7, MDA-MB468	↓ RT	↓ формирования колоний ↓ количества маммосфер ↑ апоптоза ↑ клеток в G2M фазе ↓ экспрессии SOX2, ALDH, c-MYC	Метод образования колоний Маммосферообразование Протоочная цитофлуориметрия Протоочная цитофлуориметрия WB	74
miR-134	Глиобластома	U87	↓ RT, WB	↓ инвазии ↓ миграции ↓ опухоленности <i>in vivo</i>	Transwell-миграция в матрикеле Transwell-миграция Митрационный тест Ксеноплантация nude мышам	75
miR-128a	Рак простаты	PC3, DU145, PPC-1, LAPC9, LNCaP, VCAP, NHP9	↓ RT, WB	↓ пролиферации ↓ инвазии ↓ количества клеток в S-фазе ↓ количества маммосфер ↓ самообновления ↓ опухоленности <i>in vivo</i>	Transwell-миграция в матрикеле Протоочная цитофлуориметрия Сферообразование Образование вторичных сферидов Ксеноплантация NOD/SCID-мышам	76
miR-203	Рак молочной железы	MDA-MB231	↓ RT	↓ популяции стволовых клеток CD44+CD24-	Протоочная цитофлуориметрия	77
miR-150	Рак молочной железы	MDA-MB231	↑ RT	↑ популяции стволовых клеток CD44+CD24-	Протоочная цитофлуориметрия	77
miR-126	Рак простаты	PC3, DU145, LNCaP	↑ RT	↑ пролиферации	MTS-тест	78
miR-149	Рак простаты	PC3, DU145, LNCaP	↑ RT	↑ пролиферации	MTS-тест	78
miR-598	Рак желудка	MKN-45	↓ RT, WB	↓ пролиферации ↓ образований колоний ↓ миграции ↓ инвазии ↑ апоптоза	Метод образования колоний Митрационный тест Transwell-миграция в матрикеле Протоочная цитофлуориметрия	79
miR-299-3p	Рак молочной железы	MDA-MB231, HT1080	↓ RT, WB	↓ инвазии ↓ пролиферации ↑ апоптоза	LOC-анализ CellToxGreen Протоочная цитофлуориметрия	80
miR-145	Аденокарцинома легких	A549	↓ RT, WB	↓ инвазии ↓ пролиферации ↓ количества клеток в S-фазе ↓ CD133+ клеток ↓ количества туморосфер	Transwell-миграция в матрикеле ССК 8-тест Протоочная цитофлуориметрия Протоочная цитофлуориметрия Маммосферообразование	81
miR-3658	Колоректальный рак	SW480	↓ RT, WB	↓ экспрессии CyclinD1, PCNA ↓ пролиферации ↓ миграции ↓ экспрессии Snail, Zeb1 ↑ экспрессии Clouidin1, B-catenin ↑ доли клеток в SubG1-фазе	WB MTT-тест Митрационный тест WB WB Протоочная цитофлуориметрия	82

NANOG

Oct4

Примечание. ↑ – повышение, ↓ – снижение, RT – ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени, WB – вестерн-блот.

miR-296, miR-470 и miR-134 и многие другие регулируют мышинные эмбриональные стволовые клетки путем ингибирования Nanog, OCT4 и Sox2 [105]. miR-371-5p способна подавлять ЭМП, связанный с индукцией стволовости, через Wnt-бета-катенин-сигналинг. miR-371-5p уменьшает образование сфероидов клетками колоректального рака. Деметилирование гена *Sox17* индуцирует экспрессию miR-371-5, которая подавлена экспрессией Sox2. Ингибирующий Wnt-1 белок (WIF1) является членом семейства белков, который связывает Wnt и ингибирует передачу Wnt-сигналинга. WIF1 стимулирует экспрессию miR-200с, которая уменьшает экспрессию маркеров плюрипотентности и стволовости OCT4, *c-MYC*, *c-KIT* и *MYB*, а также *BM1*, *ZEB1* и *ZEB2*, что приводит к увеличению экспрессии Е-кадгерина [106].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время известны микроРНК, способные регулировать экспрессию генов стволовой пластичности в эмбриональных стволовых клетках, а также в опухолевых стволовых клетках при разных локализациях. Активные исследования в этом направлении ведутся с момента доказательства происхождения опухоли от опухолевых стволовых клеток, и уже имеются значительные достижения, позволяющие надеяться на разработку лекарственных препаратов, которые будут регулировать активность опухолевых стволовых клеток и, тем самым, контролировать рост опухоли. В целом сейчас еще идет этап накопления знаний о механизмах регуляции метастатического каскада и идентификация мишеней с целью разработки лекарственных препаратов на основе микроРНК для подавления метастазирования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
2. Sopik V., Narod S.A. The relationship between tumour size, nodal status and distant metastases: on the origins of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2018;170(3):647–656. DOI: 10.1007/s10549-018-4796-9.
3. Yu K.D., Jiang Y.Z., Shao Z.M. Difference between observed and expected number of involved lymph nodes reflects the metastatic potential of breast cancer independent to intrinsic subtype. *Oncotarget.* 2015;6(18):16686–16697. DOI: 10.18632/oncotarget.3647.
4. Miranda A., Hamilton P.T., Zhang A.W., Pattnaik S., Becht E., Mezheyski A. et al. Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(18):9020–9029. DOI: 10.1073/pnas.1818210116.
5. Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., Kazantseva P., Deryusheva I., Pevzner A. et al. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis. *Oncotarget.* 2020;11:1988–2001. DOI: 10.18632/oncotarget.27608.
6. Hatina J., Kripnerová M., Houdek Z., Pešta M., Tichánek F. Pluripotency stemness and cancer: more questions than answers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2022;1376:77–100. DOI: 10.1007/5584_2021_663.
7. Almairac F., Turchi L., Sakakini N., Debruyne D.N., Elkeurti S., Gjernes E. et al. ERK-mediated loss of miR-199a-3p and induction of EGR1 act as a “Toggle Switch” of GBM cell differentiation into NANOG- and OCT4-positive cells. *Cancer Res.* 2020;80(16):3236–3250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0855.
8. Liu K., Xie F., Gao A., Zhang R., Zhang L., Xiao Z. et al. SOX2 regulates multiple malignant processes of breast cancer development through the SOX2/miR-181a-5p, miR-30e-5p/TUSC3 axis. *Mol. Cancer.* 2017;16(1):62. DOI: 10.1186/s12943-017-0632-9.
9. Zhou X., Yue Y., Wang R., Gong B., Duan Z. MicroRNA-145 inhibits tumorigenesis and invasion of cervical cancer stem cells. *Int. J. Oncol.* 2017;50(3):853–862. DOI: 10.3892/ijo.2017.3857.
10. Jiao X., Qian X., Wu L., Li B., Wang Y., Kong X. et al. MicroRNA: the impact on cancer stemness and therapeutic resistance. *Cells.* 2019;9(1):8. DOI: 10.3390/cells9010008.
11. Cho Y., Kang H.G., Kim S.J., Lee S., Jee S., Ahn S.G. et al. Post-translational modification of OCT4 in breast cancer tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2018;25(10):1781–1795. DOI: 10.1038/s41418-018-0079-6.
12. Leis O., Eguirra A., Lopez-Arribillaga E., Alberdi M.J., Hernandez-Garcia S., Elorriaga K. et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2012;31(11):1354–1365. DOI: 10.1038/ncr.2011.338.
13. Fallah Y., Brundage J., Allegakoen P., Shajahan-Haq A.N. MYC-driven pathways in breast cancer subtypes. *Biomolecules.* 2017;7(3):53. DOI: 10.3390/biom7030053.
14. Lu X., Mazur S.J., Lin T., Appella E., Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene.* 2014;33(20):2655–2664. DOI: 10.1038/ncr.2013.209.
15. Santini R., Pietrobono S., Pandolfi S., Montagnani V., D’Amico M., Penachioni J.Y. et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene.* 2014;33(38):4697–4708. DOI: 10.1038/ncr.2014.71.
16. Silva C.T.X., Saddi V.A., Silva K.S.F.E., Sugita D.M., Guillo L.A. Expression of the cancer stem cell marker OCT4 is associated with worse prognosis and survival in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2021;31(5):439–448. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000767.
17. Lin X., Sun R., Zhao X., Zhu D., Zhao X., Gu Q. et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J. Mol. Med. (Berl.).* 2017;95(1):53–67. DOI: 10.1007/s00109-016-1452-x.
18. Basu-Roy U., Seo E., Ramanathapuram L., Rapp T.B., Perry J.A., Orkin S.H. et al. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene.* 2012;31(18):2270–2282. DOI: 10.1038/ncr.2011.405.

19. Feng W., Dean D.C., Hornicek F.J., Spentzos D., Hoffman R.M., Shi H. et al. Myc is a prognostic biomarker and potential therapeutic target in osteosarcoma. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2020;12:1758835920922055. DOI: 10.1177/1758835920922055.
20. Yan G.N., Tang X.F., Zhang X.C., He T., Huang Y.S., Zhang X. et al. TSSC3 represses self-renewal of osteosarcoma stem cells and Nanog expression by inhibiting the Src/Akt pathway. *Oncotarget.* 2017;8(49):85628–85641. DOI: 10.18632/oncotarget.20429.
21. Lee S.H., Oh S.Y., Do S.I., Lee H.J., Kang H.J., Rho Y.S. et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2014;111(11):2122–2130. DOI: 10.1038/bjc.2014.528.
22. Lin S.H., Wang H.K., Yeh K.T., Tai H.C., Wang H.Y., Huang L.R. et al. c-MYC expression in T (III/IV) stage oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. *Cancer Manag. Res.* 2019;11:5163–5169. DOI: 10.2147/CMAR.S20194.
23. Pedregal-Mallo D., Hermida-Prado F., Granda-Díaz R., Montoro-Jiménez I., Allonca E., Pozo-Agundo E. et al. Prognostic significance of the pluripotency factors NANOG, SOX2, and OCT4 in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1794. DOI: 10.3390/cancers12071794.
24. Lundberg I.V., Edin S., Eklöf V., Öberg Å., Palmqvist R., Wikberg M.L. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2016;16:471. DOI: 10.1186/s12885-016-2509-5.
25. He W.L., Weng X.T., Wang J.L., Lin Y.K., Liu T.W., Zhou Q.Y. et al. Association Between c-Myc and Colorectal Cancer Prognosis: A Meta-Analysis. *Front. Physiol.* 2018;9:1549. DOI: 10.3389/fphys.2018.01549.
26. Roudi R., Barodabi M., Madjd Z., Roviello G., Corona S.P., Panahei M. Expression patterns and clinical significance of the potential cancer stem cell markers OCT4 and NANOG in colorectal cancer patients. *Mol. Cell Oncol.* 2020;7(5):1788366. DOI: 10.1080/23723556.2020.1788366.
27. Liu X.F., Yang W.T., Xu R., Liu J.T., Zheng P.S. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e87092. DOI: 10.1371/journal.pone.0087092.
28. Kim B.W., Cho H., Choi C.H., Ylaya K., Chung J.Y., Kim J.H. et al. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. *BMC Cancer.* 2015;15:1015. DOI: 10.1186/s12885-015-2015-1.
29. Herreros-Villanueva M., Zhang J.S., Koenig A., Abel E.V., Smyrk T.C., Bamlet W.R. et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis.* 2013;2(8):e61. DOI: 10.1038/onscis.2013.23.
30. Gzil A., Zarębska I., Bursiewicz W., Antosik P., Grzanka D., Szyłberg Ł. Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *Mol. Biol. Rep.* 2019;46(6):6629–6645. DOI: 10.1007/s11033-019-05058-1.
31. Schneider G., Wirth M., Keller U., Saur D. Rationale for MYC imaging and targeting in pancreatic cancer. *EJNMMI Res.* 2021;11(1):104. DOI: 10.1186/s13550-021-00843-1.
32. Tian T., Zhang Y., Wang S., Zhou J., Xu S. Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer. *J. Biomed. Res.* 2012;26(5):336–345. DOI: 10.7555/JBR.26.20120045.
33. Calcagno D.Q., Leal M.F., Assumpcao P.P., Smith M.A., Burbano R.R. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World. J. Gastroenterol.* 2008;14(39):5962–5968. DOI: 10.3748/wjg.14.5962.
34. Chen B., Zhu Z., Li L., Ye W., Zeng J., Gao J. et al. Effect of overexpression of Oct4 and Sox2 genes on the biological and oncological characteristics of gastric cancer cells. *Oncotargets Ther.* 2019;12:4667–4682. DOI: 10.2147/OTT.S209734.
35. Lin T., Ding Y.Q., Li J.M. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Med. Oncol.* 2012;29(2):878–885. DOI: 10.1007/s12032-011-9860-9.
36. Annovazzi L., Mellai M., Caldera V., Valente G., Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics.* 2011;8(3):139–147.
37. Auffinger B., Spencer D., Pytel P., Ahmed A.U., Lesniak M.S. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert. Rev. Neurother.* 2015;15(7):741–752. DOI: 10.1586/14737175.2015.1051968.
38. Rothenberg S.M., Concannon K., Cullen S., Boulay G., Turke A.B., Faber A.C. et al. Inhibition of mutant EGFR in lung cancer cells triggers SOX2-FOXO6-dependent survival pathways. *Elife.* 2015;4:e06132. DOI: 10.7554/eLife.06132.
39. Piva M., Domenici G., Iriando O., Rábano M., Simões B.M., Comaills V. et al. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol. Med.* 2014;6(1):66–79. DOI: 10.1002/emmm.
40. Keysar S.B., Le P.N., Miller B., Jackson B.C., Eagles J.R., Nieto C. et al. Regulation of head and neck squamous cancer stem cells by PI3K and SOX2. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016;109(1):d189. DOI: 10.1093/jnci/d189.
41. Rasti A., Mehrazma M., Madjd Z., Abolhasani M., Saeednejad Zanjani L., Asgari M. Co-expression of cancer stem cell markers OCT4 and NANOG predicts poor prognosis in renal cell carcinomas. *Sci. Rep.* 2018;8(1):11739. DOI: 10.1038/s41598-018-30168-4.
42. Gao S., Pan Y., Song L., Dong L., Weng L.I., Wang P. et al. Nanog predicts poor prognosis in human pancreatic cancer and is downregulated by oingyihuaJi formula in pancreatic cancer stem cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016;2016:7028289. DOI: 10.1155/2016/7028289.
43. Zhang Q., Han Z., Zhu Y., Chen J., Li W. The Role and Specific Mechanism of OCT4 in Cancer Stem Cells: A Review. *Int. J. Stem Cells.* 2020;13(3):312–325. DOI: 10.15283/ijsc20097.
44. Jing N., Gao W.Q., Fang Y.X. Regulation of formation, stemness and therapeutic resistance of cancer stem cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021 9:641498. DOI: 10.3389/fcell.2021.641498.
45. Ibragimova M., Tsyganov M., Litviakov N. Tumour stem cells in breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(9):5058. DOI: 10.3390/ijms23095058.
46. Cabrera M.C., Hollingsworth R.E., Hurt E.M. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J. Stem Cells.* 2015;7(1):27–36. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i1.27.
47. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L. et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on can-

- cer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339–9344. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.
48. Dean M., Fojo T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer.* 2005;5(4):275–284. DOI: 10.1038/nrc1590.
 49. Han X., Fang X., Lou X., Hua D., Ding W., Foltz G. et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One.* 2012;7(8):e41335. DOI: 10.1371/journal.pone.0041335.
 50. Mukherjee P., Gupta A., Chattopadhyay D., Chatterji U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci. Rep.* 2017;7:9170. DOI: 10.1038/s41598-017-08971-2.
 51. Liu L., Zhu H., Liao Y., Wu W., Liu L., Liu L. et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway reverses multi-drug resistance and EMT in Oct4+/Nanog+ NSCLC cells. *Biomed. Pharmacother.* 2020;127:110225. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110225.
 52. Fumagalli A., Oost K.C., Kester L., Morgner J., Bornes L., Bruens L. et al. Plasticity of Lgr5-negative cancer cells drives metastasis in colorectal cancer. *Cell Stem Cell.* 2020;26(4):569–578.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2020.02.008.
 53. Iftikhar H., Carney G.E. Evidence and potential *in vivo* functions for biofluid miRNAs: from expression profiling to functional testing: potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *Bioessays.* 2016;38:367–378. DOI: 10.1002/bies.201500130.
 54. Bartel D.P. Metazoan microRNAs. *Cell.* 2018;173(1):20–51. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
 55. Gebert L.F.R., MacRae I.J. Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019;20(1):21–37. DOI: 10.1038/s41580-018-0045-7.
 56. Thomson D.W., Dinger M.E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17(5):272–283. DOI: 10.1038/nrg.2016.20.
 57. Van Rooij E., Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* 2014;6(7):851–864. DOI: 10.15252/emmm.201100899.
 58. Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2016;7(5):637–660. DOI: 10.1002/wrna.1356.
 59. Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10(10):704–714. DOI: 10.1038/nrg2634.
 60. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery.* 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
 61. Bartel D.P. MicroRNAs. *Cell.* 2004;116:281–297. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
 62. Krek A., Grün D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J. et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 2005;37(5):495–500. DOI: 10.1038/ng1536.
 63. Chen P., Liao K., Xiao C. MicroRNA says no to mass production. *Nat. Immunol.* 2018;19(10):1040–1042. DOI: 10.1038/s41590-018-0215-y.
 64. Mohammadi-Yeganeh S., Paryan M., Arefian E., Vasei M., Ghanbarian H., Mahdian R. et al. MicroRNA-340 inhibits the migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells by targeting Wnt pathway. *Tumour Biol.* 2016;37(7):8993–9000. DOI: 10.1007/s13277-015-4513-9.
 65. Xie F., Yuan Y., Xie L., Ran P., Xiang X., Huang Q. et al. miRNA-320a inhibits tumor proliferation and invasion by targeting c-Myc in human hepatocellular carcinoma. *Onco. Targets Ther.* 2017;10:885–894. DOI: 10.2147/OTT.S122992.
 66. Lü M., Ding K., Zhang G., Yin M., Yao G., Tian H. et al. MicroRNA-320a sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells to tamoxifen by targeting ARPP-19 and ERR γ . *Sci. Rep.* 2015;5:8735. DOI: 10.1038/srep08735.
 67. Azmi A.S., Li Y., Muqbil I., Aboukameel A., Senapedis W., Baloglu E. et al. Exportin 1 (XPO1) inhibition leads to restoration of tumor suppressor miR-145 and consequent suppression of pancreatic cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget.* 2017;8(47):82144–82155. DOI: 10.18632/oncotarget.19285.
 68. Gibori H., Eliyahu S., Krivitsky A., Ben-Shushan D., Epshtein Y., Tiram G. et al. Amphiphilic nanocarrier-induced modulation of PLK1 and miR-34a leads to improved therapeutic response in pancreatic cancer. *Nat. Commun.* 2018;9(1):16. DOI: 10.1038/s41467-017-02283-9.
 69. Zhou L., Zhao L.C., Jiang N., Wang X.L., Zhou X.N., Luo X.L. et al. MicroRNA miR-590-5p inhibits breast cancer cell stemness and metastasis by targeting SOX2. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017;21(1):87–94.
 70. Chang Z. Downregulation of SOX2 may be targeted by miR-590-5p and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer. *Exp. Ther. Med.* 2019;18(2):1189–1195. DOI: 10.3892/etm.2019.7642.
 71. Wang J., Zeng H., Li H., Chen T., Wang L., Zhang K. et al. MicroRNA-101 Inhibits Growth, Proliferation and Migration and Induces Apoptosis of Breast Cancer Cells by Targeting Sex-Determining Region Y-Box 2. *Cell Physiol. Biochem.* 2017;43:717–732. DOI: 10.1159/000481445.
 72. Zeng H., Wang L., Wang J., Chen T., Li H., Zhang K. et al. MicroRNA-129-5p suppresses Adriamycin resistance in breast cancer by targeting SOX2. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018;651:52–60. DOI: 10.1016/j.abb.2018.05.018.
 73. Han M.L., Wang F., Gu Y.T., Pei X.H., Ge X., Guo G.C. et al. MicroR-760 suppresses cancer stem cell subpopulation and breast cancer cell proliferation and metastasis: By down-regulating NANOG. *Biomed. Pharmacother.* 2016;80:304–310. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.03.024.
 74. Mansoori B., Duijf P.H.G., Mohammadi A., Safarzadeh E., Ditzel H.J., Gjerstorff M.F. et al. MiR-142-3p targets HMGA2 and suppresses breast cancer malignancy. *Life Sci.* 2021;276:119431. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119431.
 75. Niu C.S., Yang Y., Cheng C.D. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression. *Int. J. Oncol.* 2013;42(5):1533–1540. DOI: 10.3892/ijo.2013.1844.
 76. Jin M., Zhang T., Liu C., Badeaux M.A., Liu B., Liu R. et al. miRNA-128 suppresses prostate cancer by inhibiting BMI-1 to inhibit tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 2014;74(15):4183–4195. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0404.
 77. El-Osaily H.H., Ibrahim I.H., Essawi M.L., Salem S.M. Impact of miRNAs expression modulation on the methylation status

- of breast cancer stem cell-related genes. *Clin. Transl. Oncol.* 2021;23(7):1440–1451. DOI: 10.1007/s12094-020-02542-0.
78. Fujii T., Shimada K., Tatsumi Y., Fujimoto K., Konishi N. Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;456(1):183–189. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.056.
 79. Ma Y., Yan F., Wei W., Deng J., Li L., Liu L. et al. MicroRNA-598 inhibits the growth and maintenance of gastric cancer stem-like cells by down-regulating RRS1. *Cell Cycle.* 2019;18(20):2757–2769. DOI: 10.1080/15384101.2019.1657338.
 80. Göhring A.R., Reuter S., Clement J.H., Cheng X., Theobald J., Wölfl S. et al. Human microRNA-299-3p decreases invasive behavior of cancer cells by downregulation of Oct4 expression and causes apoptosis. *PLoS One.* 2017;12(4):e0174912. DOI: 10.1371/journal.pone.0174912.
 81. Yin R., Zhang S., Wu Y., Fan X., Jiang F., Zhang Z. et al. microRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma-initiating cell proliferation by targeting OCT4. *Oncol. Rep.* 2011;25(6):1747–1754. DOI: 10.3892/or.2011.1252.
 82. Hosseini F., Soltani B.M., Baharvand H., Hosseinkhani S. Hsa-miR-3658 down-regulates OCT4 gene expression followed by suppressing SW480 cell proliferation and migration. *Biochem. J.* 2020;477(12):2281–2293. DOI: 10.1042/BCJ20190619.
 83. Chen Y., Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127–D131. DOI: 10.1093/nar/gkz757.
 84. Moradi S., Kamal A., Aboulkheyr Es.H., Farhadi F., Ebrahimi M., Chitsaz H. et al. Pan-cancer analysis of microRNA expression profiles highlights microRNAs enriched in normal body cells as effective suppressors of multiple tumor types: A study based on TCGA database. *PLoS One.* 2022;17(4):e0267291. DOI: 10.1371/journal.pone.0267291.
 85. Clément T., Salone V., Rederstorff M. Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA function. *Methods Mol. Biol.* 2015;1296:187–198. DOI: 10.1007/978-1-4939-2547-6_17.
 86. Tomasello L., Cluts L., Croce C.M. Experimental Validation of MicroRNA Targets: Luciferase Reporter Assay. *Methods Mol. Biol.* 2019;1970:315–330. DOI: 10.1007/978-1-4939-9207-2_17.
 87. Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005;5(2):209–219. DOI: 10.1586/14737159.5.2.209.
 88. Mahmood T., Yang P.C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* 2012;4(9):429–434. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
 89. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018;2018(6). DOI: 10.1101/pdb.prot095505.
 90. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers.* 2020;1(3):332–349. DOI: 10.1002/fft2.44.
 91. Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(7):2415–2420. DOI: 10.1073/pnas.0712168105.
 92. Türker Şener L., Albeniz G., Dinç B., Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp. Ther. Med.* 2017;14(3):1866–1870. DOI: 10.3892/etm.2017.4781.
 93. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* 2006;1(5):2315–2319. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.
 94. Telford W.G. Multiparametric analysis of apoptosis by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2018;1678:167–202. DOI: 10.1007/978-1-4939-7346-0_10.
 95. Kim K.H., Sederstrom J.M. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2015;111:28.6.1–28.6.11. DOI: 10.1002/0471142727.mb2806s111.
 96. Walcher L., Kistenmacher A.K., Suo H., Kitte R., Dluczek S., Strauß A. et al. Cancer stem cells-origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. *Front. Immunol.* 2020;11:1280. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01280.
 97. Pijuan J., Barceló C., Moreno D.F., Maiques O., Sisó P., Martí R.M. et al. *In vitro* cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7:107. DOI: 10.3389/fcell.2019.00107.
 98. Bailey P.C., Lee R.M., Vitolo M.I., Pratt S.J., Ory E., Chakrabarti K. et al. Single-cell tracking of breast cancer cells enables prediction of sphere formation from early cell divisions. *Iscience.* 2018;8P:29–39. DOI: 10.1016/j.isci.2018.08.015.
 99. Lombardo Y., de Giorgio A., Coombes C.R., Stebbing J., Castellano L. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2015;97:e52671. DOI: 10.3791/52671.
 100. Yousefnia S., Ghaedi K., Seyed Forootan F., Nasr Esfahani M.H. Characterization of the stemness potency of mammospheres isolated from the breast cancer cell lines. *Tumor Biology.* 2019;41(8). DOI: 10.1177/1010428319869101.
 101. Du F., Zhao X., Fan D. Soft agar colony formation assay as a hallmark of carcinogenesis. *Bio. Protoc.* 2017;7(12):e2351. DOI: 10.21769/BioProtoc.2351.
 102. Khalili M., Vasei M., Khalili D., Alimoghaddam K., Sadeghizadeh M., Mowla S.J. Downregulation of the genes involved in reprogramming (SOX2, c-MYC, miR-302, miR-145, and P21) in gastric adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Cancer.* 2015;46(3):251–258. DOI: 10.1007/s12029-015-9695-2.
 103. Lopez-Bertoni H., Lal B., Li A., Caplan M., Guerrero-Cázares H., Eberhart C.G. et al. DNMT-dependent suppression of microRNA regulates the induction of GBM tumor-propagating phenotype by Oct4 and Sox2. *Oncogene.* 2015;34(30):3994–4004. DOI: 10.1038/onc.2014.334.
 104. Chen T.Y., Lee S.H., Dhar S.S., Lee M.G. Protein arginine methyltransferase 7-mediated microRNA-221 repression maintains Oct4, Nanog, and Sox2 levels in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 2018;293(11):3925–3936. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000425.
 105. Beh-Pajoo A., Cantz T. The role of microRNAs in embryonic and induced pluripotency. *J. Stem. Cells Regen. Med.* 2018; 14 (1): 3–9. DOI: 10.46582/jsrm.1401002.
 106. McCubrey J.A., Lertpiriyapong K., Steelman L.S., Abrams S.L., Yang L.V., Murata R.M. et al. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging (Albany NY).* 2017;9(6):1477–1536. DOI: 10.18632/aging.101250.

Информация об авторах

Першина Александра Геннадьевна – канд. биол. наук, зав. центром биологических исследований и биоинженерии, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, allsysz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7604-9722>

Невская Ксения Владимировна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, центр биологических исследований и биоинженерии, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, nevskayaksenia@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

Морозов Константин Русланович – студент, СибГМУ, г. Томск, morozov.tom@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1847-2685>

Литвяков Николай Васильевич – д-р биол. наук, профессор РАН, науч. сотрудник, лаборатория генетических технологий, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ; зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, nvlitv72@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

(✉) **Невская Ксения Владимировна**, nevskayaksenia@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2022;
одобрена после рецензирования 19.09.2022;
принята к публикации 26.09.2022.

УДК 616.314.18-002.4-002.2:616.72-002:616.517]-092
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-183-192>

Патогенетические аспекты взаимосвязи хронического генерализованного пародонтита и псориатического артрита

Порядин Г.В.¹, Захватов А.Н.², Паршина А.Ю.²

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

² Медицинский институт, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет (МГУ) им. Н.П. Огарёва Россия, Республика Мордовия, 430005, г. Саранск, ул. Большевистская, 68

РЕЗЮМЕ

Патогенетическое единство механизмов прогрессирования хронического пародонтита и псориатического артрита подтверждается общими звеньями иммуновоспалительных реакций.

Патогенез хронического пародонтита заключается во взаимодействии микробного и иммунологического компонентов. Как хроническое иммуновоспалительное заболевание и следствие инфекционного триггера, который первоначально поражает мягкие ткани десен, пародонтит классически характеризуется разрушением периодонта и окружающих соединительных тканей. Нейтрофилы способствуют развитию пародонтита и участвуют в его прогрессировании, рекрутируя Т-хелперы 17 и стимулируя синтез активатора мембраносвязанного рецептора ядерного фактора каппа-β (RANKL), способствуя остеорезорбции.

Макрофаги как продуценты провоспалительных цитокинов (интерлейкин (IL)-1β, IL-6, IL-22, IL-23, фактор некроза опухоли), свободных радикалов, матриксных металлопротеиназ способствуют хронизации процесса. Деструкция тканей влечет за собой генерацию нейтрофилами активных форм кислорода, что на фоне снижения антиоксидантного потенциала ведет к развитию оксидативного стресса. Данные процессы в совокупности ведут к формированию патологической подвижности зубов, пародонтальных карманов, процессам остеорезорбции.

Ключевым фактором в формировании псориатического артрита на фоне пародонтита является гиперпродукция провоспалительных цитокинов в тканях-мишенях (кожа, суставы, микросреда десен) и развитие чрезмерного системного иммунного ответа на микробиоту, населяющую поверхность эпителия и ткани пародонта. Статистически подтвержденная корреляция развития деструкции пародонта с наличием псориатического артрита доказывает значимость эффектов воспалительного процесса как фона для развития коморбидной патологии. Повышенный синтез IL-17 выполняет ключевую роль в развитии иммунных реакций патологического костного ремоделирования и остеорезорбции при пародонтите и псориатическом артрите.

Ключевые слова: пародонтит, псориатический артрит, цитокины, свободнорадикальное окисление, воспалительный ответ, остеорезорбция

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Порядин Г.В., Захватов А.Н., Паршина А.Ю. Патогенетические аспекты взаимосвязи хронического генерализованного пародонтита и псориатического артрита. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):183–192. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-183-192>.

Pathogenetic aspects of the development of psoriatic arthritis in people with generalized chronic periodontitis

Poryadin G.V.¹, Zakhvatov A.N.², Parshina A.Yu.²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University
1, Ostrovityanova Str., Moscow, 117997, Russian Federation

² Medical institute, National Research Ogarev Mordovia State University
68, Bolshevistskaya Str., Saransk, 430005, Republic of Mordovia, Russian Federation

ABSTRACT

The pathogenetic mechanisms of progression of chronic periodontitis and psoriatic arthritis have common components in immune and inflammatory responses.

The pathogenesis of chronic periodontitis involves interaction of microbial and immunological components. As a chronic immune-mediated inflammatory disease and a consequence of an infectious trigger that originally affects gingival soft tissue, periodontitis is typically characterized by periodontal destruction and damage to adjacent connective tissues. Neutrophils contribute to the development of periodontitis and participate in its progression by recruiting T helper 17 cells and stimulating synthesis of the receptor activator of the nuclear factor kappa- β ligand (RANKL), contributing to bone resorption.

Macrophages as producers of proinflammatory cytokines (interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-22, IL-23, tumor necrosis factor (TNF)), free radicals, and matrix metalloproteinases contribute to the chronic course of the disease. Tissue destruction results in generation of reactive oxygen species by neutrophils, which, against the background of a decrease in the antioxidant potential, leads to development of oxidative stress. These processes together lead to tooth mobility, formation of periodontal pockets, and bone resorption.

The key factors in the formation of psoriatic arthritis against the background of periodontitis are overproduction of proinflammatory cytokines in target tissues (skin, joints, gingival microflora) and development of an excessive systemic immune response to the microbiota inhabiting the epithelial and periodontal tissues. A statistically confirmed correlation of the progression of periodontal destruction with the presence of psoriatic arthritis proves the significance of the effects of inflammation as a background for the progression of a comorbidity. Increased IL-17 synthesis plays a crucial role in the development of immune responses of pathological bone remodeling and bone resorption in periodontitis and psoriatic arthritis.

Keywords: periodontitis, psoriatic arthritis, cytokines, free radical oxidation, inflammatory response, bone resorption

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Poryadin G.V., Zakhvatov A.N., Parshina A.Yu. Pathogenetic aspects of the development of psoriatic arthritis in people with generalized chronic periodontitis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):183–192. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-183-192>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время воспалительные заболевания пародонта являются одной из актуальных проблем здравоохранения, приобретая высокую социальную значимость [1]. Данной патологией страдают около 95% взрослого населения в мире, которая в случае отсутствия должного и своевременного лечения приводит к появлению дефектов зубного ряда, снижая тем самым трудоспособность и качество жизни насе-

ления [2–6]. Распространенность заболевания пародонта в России составляет около 85%, у 53% населения отмечаются начальные воспалительные явления, у 12% – поражения средней и тяжелой степени [7–9].

При хроническом пародонтите возникают системные поражения с вовлечением в патологический процесс не только тканей пародонта, но и других органов и систем, приводящих к нарушению различных звеньев гомеостаза, в том числе иммунной системы [10]. Воспалительный процесс, повышенный

синтез провоспалительных цитокинов приводят к формированию ряда системных аутоиммунных патологий, из которых наибольшей значимостью обладают ревматические заболевания, а также тяжелые формы псориаза с поражением суставов [11].

Несмотря на широкий интерес к пародонтиту и системным расстройствам в течение последнего десятилетия, лишь в немногих работах рассматривалась связь между псориатическим артритом (ПсА) и хроническим пародонтитом [12, 13].

Анализ проведенных исследований показал повышение частоты встречаемости пародонтита у пациентов с ПсА. Так, например, в Дании в крупном когортном исследовании 6 428 пациентов, которые имели диагноз «псориатический артрит», было обнаружено, что частота пародонтита значительно выше, чем в контрольной популяции [14]. С. Ancuta и соавт. (2017) показали значительное снижение активности заболевания и улучшение состояния пародонта у пациентов с ПсА через 6 мес после начала приема антицитокиновых препаратов [15].

Связь между хроническим пародонтитом и ПсА носит двунаправленный характер. Повышенный риск развития псориаза был отмечен у пациентов с хроническими заболеваниями пародонта [13, 15–17]. Это дает основание предположить существование общих механизмов, определяющих взаимноеотягчение течения этих распространенных заболеваний.

ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА

Патогенез хронического генерализованного пародонтита носит многофакторный характер и рассматривается как результат продолжающегося перекрестного взаимодействия бактериальных, иммунологических, воспалительных и генетических факторов [18]. Как хроническое иммуновоспалительное заболевание и следствие инфекционного триггера, который первоначально поражает мягкие ткани десен, пародонтит классически характеризуется разрушением периодонта и окружающей соединительнотканной матрицы [19].

Микробиологические аспекты развития хронического пародонтита заключаются в колонизации, главным образом, области поддесневых карманов грамотрицательными микроорганизмами, из которых наибольшей значимостью обладают *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* [17].

Воспалительный иммунный ответ запускается взаимодействием резидентных клеток с бактериальной биопленкой, прикрепленной к поверхности зуба, которая, фиксируясь, делает невозможным уничто-

жение иммунной системой грамотрицательных микроорганизмов, тем самым усиливая повреждение тканей пародонта [20]. Эпителий соединительной связки является первой структурой пародонта, которая сталкивается с бактериальным воздействием [21]. Выработка грамотрицательными анаэробными микроорганизмами основных ферментов (протеиназы, пептидил-аргинин дезаминазы (PPAD), гемолизина), а также метаболитов (метилмеркаптан и диметилсульфид) способствует разрушению фибронектина и ламинина, гидролизации коллагена, что облегчает прохождение бактерий через периодонт в соединительную ткань десны, где стимулируют эпителиальные клетки десен и фибробласты для запуска начальных воспалительных реакций [22].

Резидентные клетки пародонта обнаруживают бактериальные PAMP (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) [23], которые связываются с толл-подобными рецепторами (TLR4/2), запуская рекрутирование протеинкиназ, что, в конечном счете, вызывает активацию провоспалительных факторов транскрипции, таких как ядерный фактор каппа В (NFkB) и белок-активатор 1 (AP-1), стимулирующих экспрессию генов, отвечающих за синтез провоспалительных цитокинов, тем самым приводя к усилению воспаления [24]. Кроме того, фибробласты десневой ткани стимулируют разрушение и дезорганизацию волокнистого компонента внеклеточного матрикса пародонта за счет увеличения продукции и активности матриксных металлопротеиназ (MMP) [25].

Вследствие миграции иммунокомпетентных клеток в десневую щель возникает инфильтрация пародонтальных тканей нейтрофилами, что ведет к увеличению синтеза цитокинов и хемокинов, обладающих провоспалительными и противовоспалительными свойствами [22]. Нейтрофилы индуцируют рекрутирование CD4⁺ Т-хелперов 17 (Th17), отвечающих за продукцию IL-17, а также стимулируют синтез активатора мембраносвязанного рецептора ядерного фактора каппа-β (RANKL), что ведет к резорбции альвеолярной кости остеокластами [25].

Макрофаги представляют собой важные источники провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 (IL-1), фактора некроза опухоли (TNF), MMP и простагландина E2 [26], которые повышаются в десневой ткани больных с хроническим пародонтитом [25]. Исследования показали прямую корреляцию макрофагальной инфильтрации с тяжестью пародонтита, что в значительной степени способствует усилению деградации коллагенового матрикса в соединительной ткани пародонта [27]. Макрофаги могут подвергаться классической (M1)

или альтернативной (M2) активации. Макрофаги M1 индуцируются микробными агентами или цитокинами Th1 и демонстрируют высокую фагоцитарную способность и повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов, костимулирующих и антимикробных молекул. Напротив, макрофаги M2 индуцируются цитокинами Th2 и секретируют высокие уровни IL-10 и трансформирующего фактора роста β 1. Следовательно, они обладают иммунорегулирующими свойствами и способствуют пролиферации клеток и регенерации тканей [28]. В экспериментальных моделях пародонтита отмечалось наличие как макрофагов M1, так и макрофагов M2, но с преобладанием подвида M1, что говорит об активации иммунного ответа с повышенной выработкой провоспалительных цитокинов [27].

При хронизации воспалительного процесса лимфоциты проникают в ткани пародонта, высвобождая воспалительные и иммунные молекулярные медиаторы, изменяющие баланс метаболизма костной ткани, определяя переход от гингивита к пародонтиту [25]. Активация адаптивного иммунитета оказывает большое влияние на потерю костной массы, связанную с В- и Т-лимфоцитами, поскольку эти клетки являются основными клеточными источниками активатора RANKL во время воспаления пародонта [28].

RANKL является цитокином, относящимся к семейству TNF, который может связываться с рецепторами на мембранах и стимулировать дифференцировку остеокластов, слияние клеток и их активацию, что приводит к остеорезорбции [28]. Остеобласты и стромальные клетки костного мозга преимущественно экспрессируют рецептор к RANKL, связанный с мембраной, который индуцирует остеокластогенез посредством контакта клеток с предшественниками остеокластов. Активированные Т- и В-клетки продуцируют как мембраносвязанные, так и растворимые формы RANKL [22]. Растворимый RANKL может индуцировать остеокластогенез независимо от прямого контакта между инфильтрирующими лимфоцитами и предшественниками остеокластов на поверхности кости. RANKL является активатором остеокластов и молекулярным сигналом, непосредственно ответственным за резорбцию кости, который взаимодействует с ассоциированным с ним рецептором RANK на поверхности остеокластов и их предшественников, что запускает его рекрутирование на поверхности кости с последующей активацией клеток [29].

Остеопротегерин (OPG) представляет собой растворимый белок, который обладает способностью блокировать биологические функции RANKL путем конкурентного ингибирования [30]. При пародонтите увеличение RANKL/OPG способствует ре-

крутированию предшественников остеокластов, которые во взаимодействии с провоспалительными цитокинами, экспрессированными лимфоцитами Th1, способствуют резорбции кости [29].

Кроме того, Th1-лимфоциты играют важную роль в возникновении и прогрессировании пародонтита за счет повышения уровня интерферона γ (IFN- γ) [24]. IL-1 β и TNF, секретируемые Th1-лимфоцитами, вызывают расширение сосудов, стимулируют активацию эндотелиальных клеток, увеличивают выработку хемокинов; участвуют в активации нейтрофилов и стимулируют секрецию MMP [25]. Th2-лимфоциты являются основным клеточным источником IL-4, который способствует секреции IgE плазматическими клетками и альтернативной активации макрофагов по IFN-зависимому пути.

В патогенезе хронического пародонтита значительная роль отводится процессам перекисного окисления липидов [31]. Прогрессирующие деструктивные процессы в пародонтальных тканях влекут за собой генерацию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами и последующее перекисное окисление липидных структур мембран клеток [32]. Недостаточный антиоксидантный потенциал клеток, проявляющийся невозможностью нейтрализации АФК, ведет к развитию оксидативного стресса, формированию метаболических нарушений и развитию вторичных деструктивных изменений [32]. В таких условиях отмечается нарушение процессов регенерации, формирование пародонтальных карманов и прогрессирование процессов остеорезорбции [30].

ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ ПСОРИАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

Псориатический артрит представляет собой хронический прогрессирующий воспалительный процесс, ассоциированный с псориазом, характеризующийся преимущественной локализацией в тканях опорно-двигательного аппарата и приводящий к развитию эрозивного артрита, внутрисуставного остеолита и спондилоартрита [33].

Этиологические факторы, лежащие в основе развития ПсА, в настоящее время недостаточно изучены. Заболевание развивается в результате сложного взаимодействия генетических, иммунологических факторов и факторов внешней среды [34]. Около 40% пациентов с ПсА имеют отягощенный семейный анамнез, в связи с чем риск развития данного заболевания у них увеличивается в 27–50 раз [35, 36]. В последние годы проводились исследования по выявлению генетических маркеров ПсА, в ходе которых у каждого третьего пациента выявлялся антиген комплекса гистосовместимости HLA-B27

[33–36]. Генетические ассоциации при ПсА включают HLA-B*08:01, HLA-B*27:05, HLA-B*38:01, HLA-B*39:01, HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02 [36]. HLA-B27 связан с аксиальным поражением, тогда как HLA-B38 и HLA-B39 – с полиартритом [37]. Не-HLA-гены, связанные с ПсА, включают IL-23R [34].

Бактериальная инфекция, курение, ожирение, стресс и травма являются факторами внешней среды, повышающими риск развития ПсА, особенно у лиц молодого возраста [38]. Псориатический артрит считают Т-клеточно-опосредованным заболеванием, при котором происходит активация клеточного иммунитета в коже и синовии с последующей гиперпродукцией и дисбалансом ключевых про- и противовоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23 и хемокинов [39].

Генетическая предрасположенность в совокупности с факторами окружающей среды (бактериальная инфекция, механическая травма) инициируют хронический воспалительный процесс, затрагивающий в первую очередь ткани суставов [38]. Повторяющееся механическое воздействие способствует образованию воспалительных инфильтратов, состоящих из моноцитов, дендритных клеток, нейтрофилов, а также Т-клеток в синовиальной оболочке [40]. Дендритные клетки высвобождают IL-12 и IL-23, что приводит к дифференцировке наивных Т-клеток в Th1 и Th17 соответственно и к снижению выработки Т-регуляторных (Treg) клеток [41]. Аномальная активация оси IL-23/Th17 является доминирующей патологией при ПсА. IL-23 запускает активацию сигнальных путей тирозинкиназы 2 (TYK2), Янус-киназы 2 (JAK2), которые способствуют фосфорилированию и активации сигнального белка STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), увеличивающего экспрессию фактора транскрипции ROR γ t. Последний стимулирует выработку IL-17, IL-21, IL-22, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и TNF, тем самым способствуя воспалению тканей [42]. Помимо IL-23, дифференцировка наивных Т-клеток в клетки Th17 стимулируется IL-1 β , IL-6 и трансформирующим фактором роста β [41].

При ПсА энтезис считается начальным очагом воспалительного процесса, который распространяется на другие периартикулярные и суставные структуры, приводя к развитию синовита, дактилита, спондилита, остита [43]. Важным ранним медиатором энтезита является простагландин E2 (PGE2), который вызывает вазодилатацию и облегчает рекрутирование нейтрофилов из костного мозга в ме-

ста прикрепления сухожилий к костям. Нейтрофилы усиливают воспаление, высвобождая протеазы и АФК. PGE2 также способствует продукции IL-17 Т-клетками [44].

Прогрессирование воспаления из внесуставных структур, т.е. энтезита сухожилий разгибателей и воспаления перитендона, распространяется на внутрисуставное воспаление, принимая форму синовита [43]. Синовит ПсА характеризуется гиперплазией слизистого слоя с увеличением количества фибробластоподобных синовиоцитов и макрофагов, извитой гиперваскуляризацией, наличием гиперемизированных ворсин и субсиновиального инфильтрата из Т- и В-клеток, нейтрофилов, тучных клеток и моноцитов/макрофагов. Удлиненные, расширенные, густые и извилистые сосуды указывают на повышенный ангиогенез [45, 46]. В синовиальной оболочке при ПсА наблюдается высокая экспрессия IL-17A, рецепторов IL-17, где цитокин IL-17A принимает непосредственное участие в костно-хрящевой деструкции [44].

Ремоделирование является уникальной особенностью ПсА [46]. При ПсА IL-17 усиливает остеокластогенез, тогда как IL-22 способствует остеобластогенезу. Таким образом, наличие баланса между IL-17, IL-22 и IL-23 необходимо для поддержания костного гомеостаза [47]. Яркими признаками ПсА являются субхондральный периэнтезиальный отек и диффузный отек костной ткани [45]. Субэнтезисная кость при ПсА представляет собой повышенную васкуляризацию и гиперостеокластические кистозные и эрозивные изменения [47]. Физиологически костный гомеостаз поддерживается балансом между остеокластами, способными к резорбции кости, и остеобластами, ответственными за остеобластогенез. При системном воспалении стимуляция моноцитов CD14+ макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF), TNF и RANKL приводит к образованию предшественников остеокластов в периферической крови.

Кроме того, IL-23 и IL-17 независимо индуцируют образование остеокластов в миелоидных клетках [43]. В субхондральной кости присоединение рецепторного активатора ядерного фактора каппа В (RANK), находящегося на поверхности моноцитов/макрофагов, с RANKL, мембранным белком, присутствующим на поверхности клеток Th17, стимулирует дифференцировку моноцитов/макрофагов в остеокласты [47]. Активированные остеокласты начинают секретировать ферменты деградации костного матрикса: кислые фосфатазы, матриксные металлопротеиназы-9 (MMP-9) и катепсин К (CatK), которые способствуют резорбции костной ткани. Кроме того, рецептор, ассоциированный с остеокла-

стами (OSCAR), находящийся на поверхности моноцитов, после индукции TNF потенцирует действие RANKL, тем самым усиливая остеокластогенез [46]. RANKL также увеличивает активацию Т-клеток и их продукцию провоспалительных цитокинов, в том числе TNF, IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17, IL-23 [45].

При ПсА IL-22 индуцирует остеопролиферацию в энтезисе и надкостнице посредством активации STAT3 на остеобластах, вызывая образование новой костной ткани, проявляющееся сращением периферических суставов, энтезофитами, шпорами, анкилозом, а также синдесмофитами в осевом скелете и изменениями в крестцово-подвздошных суставах [43, 47].

Провоспалительные цитокины, секретируемые при псориазе, могут стимулировать хондроциты к продукции деструктивных протеаз, что приводит к потере протеогликанов, повреждению коллагеновых пучков с сопутствующим высвобождением хрящевого олигомерного матриксного белка (COMP). COMP – гликопротеин, принадлежащий к семейству тромбоспондинов, является одним из компонентов внеклеточного суставно-хрящевого матрикса. Повышенный уровень COMP в синовиальной жидкости и сыворотке способствует процессам ремоделирования и восстановления хряща [48].

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Ряд авторов считают поражение суставов при псориазе на фоне пародонтита сложным взаимодействием иммунологических и воспалительных явлений с участием бактериальной инфекции [12, 35]. Псориаз может возникать у генетически предрасположенных людей с аномальным врожденным и (или) адаптивным иммунным ответом на элементы микробиоты ротовой полости при хроническом пародонтите (такие как *Porphyromonas gingivalis*), которые могут вызывать различные псориазические проявления [49]. Кроме того, определенный состав микробиоты в складках тела, у больных, пораженных обратным типом псориаза, также может играть роль в запуске местного воспаления в тканях пародонта [50].

Более пристальный взгляд указывает на связь иммунопатогенеза заболеваний: гиперсекреция провоспалительных цитокинов, продуцированных активированными Т-лимфоцитами и другими мононуклеарными клетками (моноцитами, макрофагами); повышенная пролиферативная активность фибробластов синовиальной оболочки и тканей пародонта, их способность секретировать тромбоцитарные факторы роста; повышение коллагенолитической активности MMP и усиление протеолиза тканей, на-

рушения гуморального иммунитета (аутоантитела к ядерным антигенам, цитокератины); патологическое ремоделирование костной ткани [49, 51].

Имеющееся при хроническом пародонтите взаимодействие между врожденным и адаптивным иммунитетом, поддерживающее хроническое воспаление, приводит к нарушению регуляции и избыточной продукции различных провоспалительных цитокинов, таких как TNF, IL-17, IL-1 β , IL-22 и IL-23 [49, 52]. Активация рецепторов IL-23R индуцирует фосфорилирование протеинкиназ Jak2 и Tyk2, которые опосредуют активацию факторов транскрипции STAT3 и ROR γ , тем самым способствуя дифференцировке клеток Th17. Образующиеся Th17 продуцируют IL-17 – мощный провоспалительный цитокин [52].

IL-17 вместе с TNF индуцируют синтез MMP в синовиальной жидкости и хряще, что опосредует потерю структур коллагена и эрозию поверхности хряща. Он также стимулирует выработку макрофагами IL-1 и TNF, индуцирует секрецию IL-6 и IL-8 синовиальными фибробластами и способствует привлечению нейтрофилов и других иммунных клеток в синовиальную оболочку [53]. IL-17 стимулирует синтез активатора рецептора ядерного фактора каппа- β -лиганда (RANKL) в остеобластах и его лигирование с активатором рецептора ядерного фактора каппа- β (RANK) в предшественниках остеокластов, способствуя дифференцировке и активации остеокластов [30]. Зрелые остеокласты, будучи клетками, резорбирующими кость, секретируют лизосомальные ферменты, приводя к разрушению костного матрикса [53]. Таким образом, важную роль в патогенезе костно-хрящевой деструкции при ПсА играет Th17-опосредованная индукция остеокластогенеза [49].

Кроме того, клеточная лимфоцитарная инфильтрация при ПсА локализована не только на коже или суставах, но также была обнаружена в изолятах клеток крови, тем самым подтверждая наличие системной воспалительной реакции у таких пациентов [55].

Выработка макрофагами TNF способствует активации и привлечению иммунных клеток к синовиальной оболочке, синовиальной гиперплазии, индуцирует секрецию MMP, участвующих в деградации хряща, а также вместе с другими ангиогенными факторами способствует образованию новых кровеносных сосудов [56]. Фактор некроза опухоли отвечает за регуляцию генов, ответственных за синтез IL-1, интерферона γ , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующего фактора (GM-CSF), IL-6, провоспалительного хемокина IL-8 и других медиаторов воспаления [53]. Предполагается, что ангиогенез и развитие окислительного стресса за счет увеличения продукции АФК, по-видимому, присутствуют

в раннем периоде заболеваний и могут рассматриваться как важные процессы, связывающие пародонтит и ПсА [50].

Таким образом, псориатический артрит и пародонтит представляют собой хронические воспалительные заболевания, имеющие сходные патофизиологические механизмы: гиперпродукция провоспалительных цитокинов в тканях-мишенях (кожа, суставы, микросреда десен) и развитие чрезмерного системного иммунного ответа на микробиоту, населяющую поверхность эпителия и ткань пародонта [52]. Имеющиеся при хроническом пародонтите нарушения взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета приводят к системной гиперэкспрессии провоспалительных цитокинов (TNF, IL-17, IL-1 β , IL-22 и IL-23) и дифференцировке Th0 в Th17, играющих важную роль во взаимоотношении данных патологий. Кроме того, среди общих патофизиологических механизмов развития данных патологий можно выделить патологическое костное ремоделирование и остеорезорбцию [49, 54].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из вышеперечисленных исследований можно с достаточной обоснованностью подтвердить наличие патогенетической взаимосвязи между хроническим пародонтитом и псориатическим артритом.

Достоверность превалирования в обоих случаях гиперергической системной воспалительной реакции организма, единство цитокинового профиля и процессов остеорезорбции подтверждают данное утверждение.

Ключевым фактором в формировании и прогрессировании псориатического артрита на фоне пародонтита является нарушение взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета, приводящее к гиперэкспрессии провоспалительных цитокинов (TNF, IL-17, IL-1 β , IL-22 и IL-23) и дифференцировке Th0 в Th17, что в дальнейшем ведет к повышенному синтезу IL-17, играющего значимую роль в инициации иммунных реакций при псориатическом артрите. IL-17 стимулирует выработку макрофагами IL-1 и TNF, секрецию привлекающих нейтрофилы IL-6 и IL-8 синовиальными фибробластами, индуцирует синтез ими и остеобластами RANKL, опосредуя таким образом секрецию остеокластогенных факторов – TNF и IL-1 β и патологическое костное ремоделирование и остеорезорбцию (рис.) [31, 33, 45–47]. Статистически подтвержденная корреляция развития деструкции тканей пародонта с тяжестью течения псориатического артрита доказывает общность иммунологических и воспалительных процессов в развитии и взаимном отягощении исследуемой коморбидной патологии [6, 7, 9, 14].

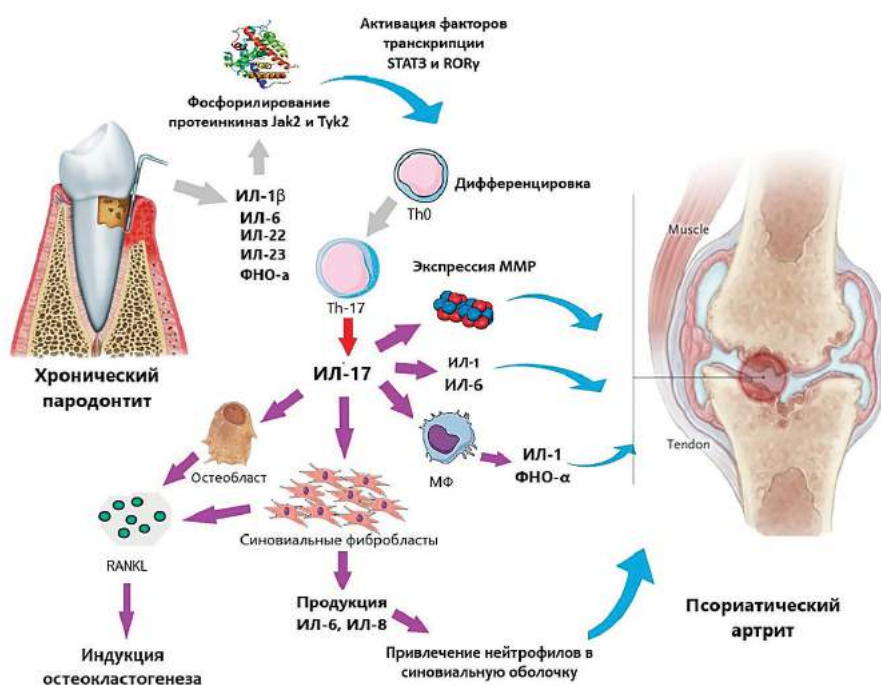


Рисунок. Патогенетическая связь хронического генерализованного пародонтита и псориатического артрита [31, 33, 45–47]. IL-1 β – интерлейкин-1 β ; IL-1 – интерлейкин-1; IL-6 – интерлейкин-6; IL-8 – интерлейкин-8; IL-22 – интерлейкин-22; IL-23 – интерлейкин-23; TNF – фактор некроза опухоли; Th0 – наивный T-хелпер; Th17 – T-хелпер 17-го типа; IL-17 – интерлейкин-17; MMP – матриксные металлопротеиназы; МФ – макрофаг; RANKL – активатор мембраносвязанного рецептора ядерного фактора каппа- β

Таким образом, установленная патогенетическая связь позволяет разработать новые способы диагностики, лечения и профилактики для раннего выявления и предотвращения прогрессирования данных патологий. Тесная совместная работа стоматологов и ревматологов для назначения комплексной терапии заболеваний, а также проведение скрининговых иммунологических обследований лиц с хроническим пародонтитом, особенно трудоспособного возраста, позволит выявлять на ранних стадиях и прогнозировать развитие псориатического артрита.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Tibúrcio-Machado C.S., Michelon C., Zanatta F.B., Gomes M.S., Marin J.A., Bier C.A. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int. Endod. J.* 2021;54(5):712–735. DOI: 10.1111/iej.13467.
2. Jakovljevic A., Nikolic N., Jacimovic J., Pavlovic O., Milić B., Beljić-Ivanović K.R. et al. Prevalence of Apical Periodontitis and Conventional Nonsurgical Root Canal Treatment in General Adult Population: An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Cross-sectional Studies Published between 2012 and 2020. *J. Endod.* 2020;46(10):1371–1386. DOI: 10.1016/j.joen.2020.07.007.
3. Nijakowski K., Gruszczyński D., Surdacka A. Oral Health Status in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2021;18(21):11521. DOI: 10.3390/ijerph182111521.
4. González-Febles J., Sanz M. Periodontitis and rheumatoid arthritis: What have we learned about their connection and their treatment? *Periodontology 2000.* 2021;87(1):181–203. DOI: 10.1111/prd.12385.
5. Xiao F., Li C., Lin Y., Peng Z., Xu X., Wen Y. et al. Increased risk of periodontitis occurrence in patients with rheumatoid arthritis and its association with the levels of IL-1 β and TNF- α in gingival crevicular fluid. *Annals of Palliative Medicine.* 2021;10(8):9078–9087. DOI: 10.21037/apm-21-1782.
6. Dannewitz B., Holtfreter B., Eickholz P. Periodontitis-therapy of a widespread disease. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz.* 2021;64(8):931–940. DOI: 10.1007/s00103-021-03373-2.
7. Блашкова С.Л., Мартянова М.В. Роль средств гигиены в предупреждении кариеса и заболеваний пародонта у лиц молодого возраста. *Российская стоматология.* 2016;9(4):51–53. DOI: 10.17116/rosstomat20169451-53.
8. Сабирова А.И., Акрамов И.А., Рамазанова З.Д., Сергеева В.В., Ибишева Л.К. Современные аспекты эпидемиологических вопросов заболеваний тканей пародонта. *The Scientific Heritage.* 2021;73(2):31–38. DOI: 10.24412/9215-0365-2021-73-2-31-38.
9. Аванесов А.М., Кульченко А.А., Меладзе З.А., Арзуни В.А., Цветкова Е.П., Мариничева Е.Г. и др. Оценка состояния пародонта на фоне применения витамина е в комплексе лечебных мероприятий при генерализованном пародонтите. *Научное обозрение. Медицинские науки.* 2014;1:23–24.
10. Barros F.C., Sampaio J.N., Figueredo C.M., Carneiro S., Fischer R.G. Higher prevalence of periodontitis and decayed, missing and filled teeth in patients with psoriasis. *European Journal of Dentistry.* 2020;14(3):366–370. DOI: 10.1055/S-0040-1713465.
11. Madianos P.N., Bobetsis Y.A., Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology.* 2013;40(14):170–180. DOI: 10.1111/jcpe.12082.
12. Monson C.A., Silva V., Porfirio G., Riera R., Tweed J.A., Petri V., Atallah Á.N. Oral Health Issues in Psoriasis: An Overview of the Literature. *International Journal of Clinical Dermatology & Research.* 2016;4(4):94–98. DOI: 10.19070/2332-2977-1600025.
13. Monson C.A., Porfirio G.J., Riera R., Tweed J.A., Petri V., Nagi A. et al. Periodontal Aspects for Psoriasis: A Systematic Review. *Journal of Clinical Research in Dermatology.* 2016;3(1):1–8. DOI: 10.15226/2378-1726/3/4/00141.
14. Egeberg A., Mallbris L., Gislason G., Hansen P.R., Mrowietz U. Risk of periodontitis in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2017;31(2):288–293. DOI: 10.1111/jdv.13814.
15. Ancuta C., Ancuta E., Chiriac R.M., Anton C.R., Surlari Z., Iordache C. TNF inhibitors and periodontal inflammation in psoriatic arthritis. *Rev. Chim.* 2017;68(8):1914–1918. DOI: 10.37358/RC.17.8.5790.
16. Esberg A., Johansson L., Johansson I., Dahlqvist S.R. Oral microbiota identifies patients in early onset rheumatoid arthritis. *Microorganisms.* 2021;9(8):1657. DOI: 10.3390/microorganisms9081657.
17. Lundmark A., Hu Y.O.O., Huss M., Johannsen G., Andersson A.F., Yucel-Lindberg T. Identification of salivary microbiota and its association with host inflammatory mediators in periodontitis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019;9:216. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00216.
18. Banjar W., Alshammari M.H. Genetic factors in pathogenesis of chronic periodontitis. *Journal of Taibah University Medical Sciences.* 2014;9(3):245–247. DOI: 10.1016/j.jtumed.2014.04.003.
19. Yousef A. AlJehani. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *International Journal of Dentistry.* 2014;2014:182513. DOI: 10.1155/2014/182513.
20. Fadel H.T., Flytström I., Calander A., Bergbrant I.M., Heijl L., Birkhed D. Profiles of dental caries and periodontal disease in individuals with or without psoriasis. *Journal of Periodontology.* 2013;84(4):477–485. DOI: 10.1902/jop.2012.120119.
21. Noguchi S., Ukai T., Kuramoto A., Yoshinaga Y., Nakamura H., Takamori Y. et al. The histopathological comparison on the destruction of the periodontal tissue between normal junctional epithelium and long junctional epithelium. *Journal of Periodontal Research.* 2017;52(1):74–82. DOI: 10.1111/jre.12370.
22. Cavalla F., Osorio C., Paredes R., Valenzuela M.A., García-Sesnich J., Sorsa T. et al. Matrix metalloproteinases regulate extracellular levels of SDF-1/CXCL12, IL-6 and VEGF in hydrogen peroxide-stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine.* 2015;73(1):114–121. DOI: 10.1016/j.cyt.2015.02.001.

23. Han M.X., Ding C., Kyung H.M. Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: Evidence based on 12,793 subjects. *Human Immunology*. 2015;76(7):496–504. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.06.006.
24. Song B., Zhang Y., Chen L., Zhou T., Huang W., Zhou X. et al. The role of Toll-like receptors in periodontitis. *Oral Diseases*. 2017;23(2):168–180. DOI: 10.1111/odi.12468.
25. Hajishengallis G., Korostoff J.M. Revisiting the Page & Schroeder model: The good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontology 2000*. 2017;75(1):116–151. DOI: 10.1111/prd.12181.
26. Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., Van Dyke T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):57–80. DOI: 10.1111/prd.12002.
27. Gupta M., Chaturvedi R., Jain A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*. 2013;61(3):892–897. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.12.012.
28. Braga T.T., Agudelo J.S., Camara N.O. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front. Immunology*. 2015;6:602. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00602.
29. Huang N., Dong H., Luo Y., Shao B. Th17 Cells in Periodontitis and Its Regulation by A20. *Front. Immunology*. 2021;12:125–137. DOI: 10.3389/fimmu.2021.742925.
30. Kikuta J., Wada Y., Kowada T., Wang Z., Sun-Wada G.H., Nishiyama I. et al. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(2):866–873. DOI: 10.1172/JCI65054.
31. Belibasakis G.N., Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012;39(3):239–248. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x.
32. Almubarak A., Tanagala K.K.K., Papapanou P.N., Lalla E., Momen-Heravi F. Disruption of monocyte and macrophage homeostasis in periodontitis. *Front. Immunol.* 2020;11:330. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00330.
33. Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунопатогенез псориаза и псориатического артрита. *Медицинская иммунология*. 2014;16(2):127–138.
34. Fang C., Wu L., Zhao M.J., Deng T., Gu J.M., Guo X.P. et al. Periodontitis exacerbates benign prostatic hyperplasia through regulation of oxidative stress and inflammation. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2021;2021:2094665. DOI: 10.1155/2021/2094665.
35. Коротаева Т.В., Корсакова Ю.Л., Логинова Е.Ю., Губарь Е.Е., Чамурлиева М.Н. Псориатический артрит. Клинические рекомендации по диагностике и лечению. *Современная ревматология*. 2018;12(2):22–35. DOI: 10.14412/1996-7012-2018-2-22-35.
36. Mease P., Hall S., FitzGerald O., van der Heijde D., Mero-la J.F., Avila-Zapata F. et al. Tofacitinib or adalimumab versus placebo for psoriatic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(16):1537–1550. DOI: 10.1056/NEJMoa1615975.
37. FitzGerald O., Haroon M., Giles J.T., Winchester R. Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Research and Therapy*. 2015;17(1):115. DOI: 10.1186/s13075-015-0640-3.
38. Kavanaugh A., Gladman D.D., Edwards C.J., Schett G., Gutterette B., Delev N. et al. Long-term experience with apremilast in patients with psoriatic arthritis: 5-year results from a PAL-ACE 1-3 pooled analysis. *Arthritis Res. Ther.* 2019;21(1):118. DOI: 10.1186/s13075-019-1901-3.
39. Coates L.C., Savage L.J., Chinoy H., Laws P.M., Lovell C.R., Korendowych E. et al. Assessment of two screening tools to identify psoriatic arthritis in patients with psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. 2018;32(9):1530–1534. DOI: 10.1111/jdv.14971.
40. Emmungil H., İlgen U., Direskeneli R.H. Autoimmunity in psoriatic arthritis: pathophysiological and clinical aspects. *Turk. J. Med. Sci.* 2021;51(4):1601–1614. DOI: 10.3906/sag-2011-235.
41. Chimenti M.S., Triggianese P., De Martino E., Conigliaro P., Fonti G.L., Sunzini F. et al. An update on pathogenesis of psoriatic arthritis and potential therapeutic targets. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2019;15(8):823–836. DOI: 10.1080/1744666X.2019.1627876.
42. Tateiwa D., Yoshikawa H., Kaito T. Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells*. 2019;8(8):818. DOI: 10.3390/cells8080818.
43. Eder L., Aydin S.Z. Imaging in psoriatic arthritis-insights about pathogenesis of the disease. *Current Rheumatology Reports*. 2018;20(12):77. DOI: 10.1007/s11926-018-0793-6.
44. Coras R., Kavanaugh A., Boyd T., Huynh Q., Pedersen B., Armando A.M. et al. Pro- and anti-inflammatory eicosanoids in psoriatic arthritis. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*. 2019;15(4):65. DOI: 10.1007/s11306-019-1527-0.
45. Adebajo A., Boehncke W.H., Gladman D.D., Mease P.J. Psoriatic arthritis and psoriasis: pathology and clinical aspects. *Springer*. 2016;45:52. DOI: 10.1007/978-3-319-19530-8.
46. Celis R., Cuervo A., Ramírez J., Cañete J.D. Psoriatic synovitis: singularity and potential clinical implications. *Front. Medicine*. 2019;6:14. DOI: 10.3389/fmed.2019.00014.
47. Paine A., Ritchlin C. Bone remodeling in psoriasis and psoriatic arthritis: an update. *Current Opinion in Rheumatology*. 2016;28(1):66–75. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000232.
48. Bartosińska J., Michalak-Stoma A., Juskiewicz-Borowicz M., Kowal M., Chodorowska G. The Assessment of selected bone and cartilage biomarkers in psoriatic patients from Poland. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:194535. DOI: 10.1155/2015/194535.
49. Mishra S., Johnson L., Agrawal S., Rajput S. Assessment of Periodontal status in Patients with Psoriatic Arthritis: A retrospective, case-control study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2021;13(8):776–783. DOI: 10.4317/jced.58125.
50. Wójcik P., Biernacki M., Wroński A., Łuczaj W., Waeg G., Žarković N. et al. Altered lipid metabolism in blood mononuclear cells of psoriatic patients indicates differential changes in psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(17):4249. DOI: 10.3390/ijms20174249.
51. Üstün K., Sezer U., Kısacık B., Şenyurt S.Z., Özdemir E.Ç.,

- Kimyon G. et al. Periodontal disease in patients with psoriatic arthritis. *Inflammation*. 2013;36(3):665–669. DOI: 10.1007/s10753-012-9590-y.
52. Carvalho A.L., Hedrich C.M. The Molecular pathophysiology of psoriatic arthritis – the complex interplay between genetic predisposition, epigenetics factors, and the microbiome. *Front. Molecular Biosciences*. 2021;8:190–205. DOI: 10.3389/fmolb.2021.662047.
53. Захватов А.Н., Беляев А.Н., Тарасова Т.В., Аванесов А.М., Захаркин И.А., Чекмаева А.А. Патогенетическая коррекция цитокинового дисбаланса при экспериментальном посттравматическом артрите. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2018;3:101–108. DOI: 10.23648/UMBJ.2018.31.17221.
54. Hawkes J.E., Chan T.C., Krueger J.G. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;140(3):645–653. DOI: 0.1016/j.jaci.2017.07.004.
55. Blauvelt A., Chiricozzi A. The Immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2018;55(3):379–390. DOI: 10.1007/s12016-018-8702-3.
56. Seeling M., Hillenhoff U., David J.P., Schett G., Tuckermann J., Lux A. et al. Inflammatory monocytes and Fcγ receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(26):10729–10734. DOI: 10.1073/pnas.1301001110.

Информация об авторах

Порядин Геннадий Васильевич – чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, poradin_gv@rsmu.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Захватов Алексей Николаевич – д-р мед. наук, профессор кафедры общей хирургии им. профессора Н.И. Атясова, Медицинский институт, МГУ им. Н.П. Огарёва, г. Саранск, zachvatan78@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1433-0337>

Паршина Алина Юрьевна – студентка, Медицинский институт, МГУ им. Н.П. Огарёва, г. Саранск, alinaparshina2000@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-0415-1132>

(✉) **Захватов Алексей Николаевич**, zachvatan78@mail.ru

Поступила в редакцию 04.02.2022;
одобрена после рецензирования 16.05.2022;
принята к публикации 09.06.2022

УДК 616.12-005.4:616.894-053.8:577.2.08
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-193-204>

Биоинформационный анализ биологических путей при ишемической болезни сердца и болезни Альцгеймера

Часовских Н.Ю., Чижик Е.Е.

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

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – провести анализ обогащения биологических путей при болезни Альцгеймера и ишемической болезни сердца (ИБС) с помощью биоинформационных инструментов.

Гены предрасположенности к ИБС и гены предрасположенности к болезни Альцгеймера извлечены из публичной базы данных DisGeNET (база данных ассоциаций генов и заболеваний). Анализ обогащения биологических путей проведен в плагине ClueGO Cytoscape version 3.6.0 при помощи гипергеометрического теста с использованием баз данных KEGG и REACTOME.

Выявленные гены предрасположенности к болезни Альцгеймера и ИБС включены в 69 общих сигнальных путей, объединенных в следующие подгруппы: сигнальные пути, участвующие в гибели клеток (1); сигнальные пути, вовлеченные в процессы иммунной системы (2); сигнальные пути, ответственные за метаболизм жирных кислот (3); сигнальные пути, принимающие участие в функционировании нервной системы (4), сердечно-сосудистой системы (5), эндокринной системы (6).

В результате проведенного анализа выявлены возможные общие процессы, в которые вовлечены генетические факторы и их продукты при ишемической болезни сердца и болезни Альцгеймера. В частности, предполагается, что гены предрасположенности, участвующие в реализации данных путей, регулируют процессы апоптоза, выработки воспалительных цитокинов и хемокинов, метаболизма липидов, формирования β -амилоида, ангиогенеза.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, болезнь Альцгеймера, ClueGO Cytoscape, гены предрасположенности, анализ обогащения путей

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Часовских Н.Ю., Чижик Е.Е. Биоинформационный анализ биологических путей при ишемической болезни сердца и болезни Альцгеймера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):193–204. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-193-204>.

Bioinformatic analysis of biological pathways in coronary heart disease and Alzheimer's disease

Chasovskikh N.Y., Chizhik E.E.

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

ABSTRACT

Aim. Using bioinformatic tools, to perform a pathway enrichment analysis in Alzheimer's disease and coronary heart disease (CHD).

✉ Чижик Евгения Евгеньевна, evgenika06@gmail.com

Materials and methods. Genes contributing to susceptibility to CHD and Alzheimer's disease were obtained from the public database DisGeNET (Database of Gene – Disease Associations). A pathway enrichment analysis was performed in the ClueGO Cytoscape plug-in (version 3.6.0) using hypergeometric distribution and the KEGG and Reactome databases.

Results. The identified genes contributing to susceptibility to Alzheimer's disease and CHD are included in 69 common signaling pathways, grouped into the following subgroups: cell death signaling pathways (1); signaling pathways regulating immune responses (2); signaling pathways responsible for fatty acid metabolism (3); signaling pathways involved in the functioning of the nervous system (4), cardiovascular system (5), and endocrine system (6).

Conclusion. Following the performed analysis, we identified possible associations between processes involving genetic factors and their products in CHD and Alzheimer's disease. In particular, we assumed that susceptibility genes involved in the implementation of these pathways regulate apoptosis, production of inflammatory cytokines and chemokines, lipid metabolism, β -amyloid formation, and angiogenesis.

Keywords: coronary heart disease, Alzheimer's disease, ClueGO Cytoscape plug-in, susceptibility genes, pathway enrichment analysis

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Chasovskikh N.Y., Chizhik E.E. Bioinformatic analysis of biological pathways in coronary heart disease and Alzheimer's disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):193–204. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-193-204>.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) на сегодняшний день представляет собой серьезную проблему для здравоохранения. По оценкам Alzheimer's Disease International, на 2019 г. данным заболеванием страдают более 50 млн человек по всему миру [1]. Многочисленные исследования наследственных основ болезни Альцгеймера выявили гены, влияющие на развитие данного заболевания [2, 3]. Также результаты исследований генетических ассоциаций различных заболеваний показывают, что проявления БА могут сочетаться с другими патологиями, например с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, такими как инфаркт миокарда [4], фибрилляция предсердий [5]. По данным М.К. Aronson и соавт., исследовавших взаимосвязь между деменцией и ишемической болезнью сердца (ИБС) у пожилых пациентов, ИБС, особенно длительная, связана с меньшей толщиной коры и объемом головного мозга (на магнитно-резонансной томографии) [6]. Кроме того, ряд эпидемиологических исследований показывает, что у пациентов с патологией коронарных артерий заболеваемость БА выше [7, 8].

Тем не менее наличие связи БА с ИБС остается дискутируемой, поскольку данные одних исследований говорят о том, что ИБС связана с когнитивными нарушениями [9], данные других – о том, что свя-

зи нет [10]. Например, Роттердамское исследование (проспективное когортное исследование, начатое в 1990 г. в Нидерландах и направленное на поиск причин хронических заболеваний, которые часто встречаются у пожилых людей и количество которых возрастает в связи со старением населения) показало, что нераспознанный (бессимптомный) инфаркт миокарда связан с риском БА, тогда как распознанный ИМ – нет [5, 11].

В 2014 г. G. Liu с соавт. для выявления новых факторов риска развития болезни Альцгеймера интегрировали данные трех GWAS исследований, используя метаанализ на основе генов. Анализ путей проводили с применением Киотской энциклопедии генов и геномов и базы данных геномной онтологии [12]. Авторы впервые выявили вовлеченность сигнальных путей, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, клеточными процессами и инфекционными заболеваниями, в развитие болезни Альцгеймера. Вместе с тем других исследований, рассматривающих совместные процессы сигнальной трансдукции при БА и ИБС, нет. Таким образом, анализ обогащения биологических путей, позволяющий оценить участие генов предрасположенности в возможных механизмах совместного течения исследуемых патологий, представляет особый интерес.

Цель данной работы – выявить сигнальные и метаболические пути, вовлеченные в процессы сигнальной трансдукции как при БА, так и при ИБС.

Гены предрасположенности к ИБС и гены предрасположенности к БА были извлечены из публичной базы данных DisGeNET [13]. DisGeNET представляет собой платформу, содержащую полный каталог генов и их вариантов, связанных с заболеваниями человека. Каталог объединяет данные из экспертных баз данных, таких как CTD, UniProt, ClinVar, Orphanet, GWAS, GAD, с информацией, полученной путем анализа текстов научной литературы [13]. Анализ обогащения биологических путей, предположительно вовлеченных в механизмы совместного проявления ишемической болезни сердца и болезни Альцгеймера, был проведен в плагине ClueGO Cytoscape v. 3.6.0 [14] с использованием баз данных KEGG [15], REACTOME [16]. Исследуемые гены предрасположенности к ишемической болезни сердца и болезни Альцгеймера в плагине ClueGO Cytoscape были представлены в виде 1 и 2 кластеров соответственно. Для анализа использовался гипергеометрический тест с $p < 0,05$ и значением каппа $K = 0,4$.

Списки генов предрасположенности к БА и предрасположенности к ИБС были сформированы на

основании анализа данных DisGeNET. В случае БА список генов составил 446, а в случае ИБС – 324 протеинкодирующих гена. По результатам проведенного анализа биологических путей было выявлено 90 путей, включающих гены предрасположенности к БА, 28 путей к ИБС, и 69 путей, ассоциированных с обоими заболеваниями (последние представлены в таблице).

По вовлеченности в биологические процессы и функционирование систем организма данные пути были объединены нами в следующие блоки: 1) сигнальные пути, участвующие в гибели клеток; 2) сигнальные пути, связанные с процессами иммунной системы; 3) сигнальные пути, ответственные за метаболизм жирных кислот; сигнальные пути, принимающие участие в функционировании нервной системы (4), сердечно-сосудистой системы (5), эндокринной системы (6). Кроме того, отдельно рассматривались пути, в реализации которых участвуют гены, необходимые для реализации физиологических процессов, и изменений при развитии типовых патологических процессов (например, воспаление, гипоксия).

Т а б л и ц а

Общие биологические пути, ассоциированные с ИБС и болезнью Альцгеймера	
Биологический путь	Общие для заболеваний гены, входящие в сигнальный путь
<i>1. Сигнальные пути, участвующие в гибели клеток</i>	
Апоптоз	<i>NFKB1, TNF</i>
Некроптоз	<i>IL1A, IL1B, TLR4, TNF</i>
Сигнальный путь TNF	<i>CCL2, IL1B, IL6, MMP3, MMP9, NFKB1, PTGS2, TNF</i>
Сигнальный путь p53	<i>SERPINE1</i>
<i>2. Сигнальные пути, вовлеченные в процессы иммунной системы</i>	
Линия кроветворных клеток	<i>IL1A, IL1B, IL6, IL6R, TNF</i>
Врожденная иммунная система	<i>AGER, CFH, CRP, F2, IGF2R, IL1B, MMP9, MPO, NFKB1, NOS3, OLR1, PLA-2G2A, PLCG2, TLR4</i>
Сигналинг с помощью интерлейкинов	<i>AGER, CCL2, CCR5, HMOX1, ICAM1, IL10, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL6R, IRS1, MMP3, MMP9, NFKB1, PTGS2, TGFB1, TNF, VEGFA</i>
Каскад комплемента	<i>CFH, CRP, F2</i>
Fc γ-R-опосредованный фагоцитоз	<i>PLCG2</i>
Фагосома	<i>MPO, OLR1, TLR4</i>
Взаимодействие клеточной поверхности с сосудистой стенкой	<i>F2, OLR1, TGFB1</i>
Трансэндотелиальная миграция лейкоцитов	<i>MMP9, PLCG2</i>
Сигналинг IL-4 и IL-13	<i>CCL2, HMOX1, IL10, IL18, IL1A, IL1B, IL6, IL6R, MMP3, MMP9, PTGS2, TGFB1, TNF, VEGFA</i>
Сигнальный путь IL-17	<i>CCL2, IL1B, IL6, MMP3, MMP9, NFKB1, PTGS2, TNF</i>
Сигнальный путь PI3K-Akt	<i>BDNF, IL6, IL6R, IRS1, NFKB1, NOS3, TLR4, VEGFA</i>
Сигнальный путь Fc-ε RI	<i>PLCG2</i>
Сигнальный путь рецептора лектина C-типа	<i>IL10, IL1B, IL6, NFKB1, PLCG2, PTGS2, TNF</i>
Сигнальный путь Toll-подобного рецептора	<i>IL1B, IL6, NFKB1, TLR4, TNF</i>
Клатрин-опосредованный эндоцитоз	<i>IGF2R, LDLR</i>

Продолжение табл.

Биологический путь	Общие для заболеваний гены, входящие в сигнальный путь
<i>3. Сигнальные пути, ответственные за метаболизм жирных кислот</i>	
Сборка плазменного липопротеина	<i>ABCA1, APOA1, APOE</i>
Ремоделирование липопротеинов плазмы	<i>ALB, APOA1, APOE, CETP, LPL</i>
Сборка, ремоделирование и клиренс липопротеинов в плазме	<i>ABCA1, ALB, APOA1, APOE, CETP, LDLR, LPL, NPC1</i>
Метаболизм холестерина	<i>ABCA1, APOA1, APOE, CETP, LDLR, LPA, LPL, LRP1, NPC1, SORT1</i>
Эфирный липидный обмен	<i>PLA2G1B, PLA2G2A</i>
Переваривание и всасывание жира	<i>ABCA1, APOA1, PLA2G1B, PLA2G2A</i>
Секреция желчи	<i>ABCB1, HMGCR, LDLR</i>
Сфинголипидный сигнальный путь	<i>NFKB1, NOS3, TNF</i>
<i>4. Сигнальные пути, вовлеченные в функционирование нервной системы</i>	
Сигналинг с помощью NTRKs	<i>BDNF, IRS1</i>
Сигналинг с помощью NTRK2 (TRKB)	<i>BDNF</i>
Сигнальный путь нейротрофина	<i>BDNF, IRS1, NFKB1, PLCG2, SORT1</i>
Формирование амилоидных волокон	<i>APOA1</i>
Аксональное наведение (управление аксонами)	<i>MMP9, UNC5C</i>
Серотонинергический синапс	<i>PTGS2</i>
Клиренс нейротрансмиттера	<i>ALDH2</i>
Эндокринные и другие факторы регулируемой реабсорбции кальция	<i>ESR1, VDR</i>
<i>5. Сигнальные пути, вовлеченные в функционирование сердечно-сосудистой системы</i>	
VEGFA-VEGFR2 путь	<i>NOS3, VEGFA</i>
Сигналинг с помощью VEGF	<i>NOS3, VEGFA</i>
Каскады комплемента и коагуляции	<i>F2, PLG, SERPINE1</i>
Активация, сигналинг и агрегация тромбоцитов	<i>ALB, APOA1, F2, PLCG2, PLG, SERPINE1, TGFB1, VEGFA</i>
Активация тромбоцитов	<i>F2, NOS3, PLCG2</i>
Сигналинг с помощью PDGF	<i>PLG</i>
Напряжение сдвига при атеросклерозе	<i>CCL2, HMOX1, IL1A, IL1B, MMP9, NFKB1, NOS3, TNF, VEGFA</i>
Тромбоцитарный гемостаз	<i>NOS3</i>
Сигнальный путь ангиотензина	<i>NOS3, SERPINE1</i>
Синтез и секреция альдостерона	<i>AGT, LDLR</i>
<i>6. Сигнальные пути, вовлеченные в реализацию функций эндокринной системы</i>	
Стероидогенез яичников	<i>LDLR, PTGS2</i>
Метаболизм пептидных гормонов	<i>ACE, AGT</i>
Альдостерон-регулируемая реабсорбция натрия	<i>IRS1</i>
<i>7. Сигнальные пути процессов, протекающих в норме и при патологии</i>	
Передача сигнала	<i>AGT, APOA1, APOE, BDNF, CCR5, ESR1, ESR2, F2, IL6, IL6R, IRS1, LDLR, LPL, LRP1, MMP3, MMP9, NFKB1, NOS3, NR3C1, PLCG2, PLG, PPARG, SERPINE1, TGFB1, TNF, VEGFA</i>
Сигнальный путь клеточных ответов на стресс	<i>IL1A, IL6, NFKB1, NR3C1, VEGFA</i>
Сигналинг рецепторных тирозинкиназ	<i>BDNF, ESR1, IRS1, MMP9, NOS3, PLG, VEGFA</i>
FOXO-опосредованная транскрипция	<i>NR3C1</i>
Сигнальный путь FoxO	<i>IL10, IL6, IRS1, TGFB1</i>
Сигнальный путь MAPK	<i>BDNF, IL1A, IL1B, NFKB1, TGFB1, TNF, VEGFA</i>
Сигнальный путь фосфолипазы D	<i>AGT, F2, PLCG2</i>
Сигнальный путь TGFβ	<i>TGFB1, TNF</i>

Биологический путь	Общие для заболеваний гены, входящие в сигнальный путь
Сигнальный путь HIF-1	<i>HMOX1, IL6, IL6R, NFKB1, NOS3, PLCG2, SERPINE1, TLR4, VEGFA</i>
Биологическое окисление	<i>ALDH2, HPGDS</i>
Организация внеклеточного матрикса	<i>MMP3, MMP9, PLG, SERPINE1, TGFB1</i>
Деградация внеклеточного матрикса	<i>MMP3, MMP9, PLG</i>
Фокальная адгезия	<i>VEGFA</i>
Регуляция транспорта и поглощения инсулиноподобного фактора роста (IGF) белками, связывающимися с инсулиноподобным фактором роста (IGFBPs)	<i>ALB, APOA1, APOE, F2, IL6, PLG</i>
Сигнальный путь Ras	<i>BDNF, NFKB1, PLA2G1B, PLA2G2A, PLCG2, VEGFA</i>
Сигнальные события G-α(i)	<i>AGT, APOA1, APOE, LDLR, LPL, LRP1</i>
Циркадные ритмы	<i>NR3C1, SERPINE1</i>
АВС транспортеры	<i>ABCA1, ABCB1</i>
Сумоилирование внутриклеточных рецепторов	<i>ESR1, NR3C1, PPARG, VDR</i>
Сигнальные события G-α (q)	<i>AGT, F2, MMP3</i>
Гликолиз/Глюконеогенез	<i>ALDH2</i>

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Данные пути включают гены, ассоциированные с БА и ИБС. Сигнальный путь TNF [KEGG:04668] является начальным в реализации апоптотического или некроптотического пути. А именно, передача сигналов от TNFR1 запускает сигнальный путь NF-κB, а также апоптоз и некроптоз [17]. Помимо этого, апоптоз может запускаться в результате инициации сигнального пути p53 [18]. Сигнальный путь некроптоза [KEGG:04217] участвует в реализации патогенеза многих заболеваний, включая неврологические заболевания, ишемическое повреждение и вирусную инфекцию [19].

Изменение регуляции и активации данных путей имеет большое значение для развития как ИБС, так и БА. Однако при БА роль апоптоза неоднозначна. Одни исследователи сообщают, что при БА активируются каспазы, в частности каспаза-6, которая запускает процесс апоптоза в головном мозге [20]. Другие исследователи утверждают, что теория апоптотической гибели клеток при БА и клиническая картина заболевания несовместимы, поскольку клетки, в отношении которых запущена программа апоптоза, умирают в течение нескольких дней, при этом сохраняется высокий уровень каспазы-3, что должно приводить к острой и массовой потере нейронов. И в таком случае клинические симптомы БА должны быть выявлены на ранней стадии заболевания, а не через десятки лет после начала заболевания [21]. Также известно, что при ИБС апоптоз является ключевым звеном патогенеза [22].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПРОЦЕССЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Сигнальный путь линии кроветворных клеток [KEGG:04640] отражает цепочку развития клеток крови от гемопоэтических стволовых клеток до зрелых клеток крови, в том числе являющихся клетками иммунной системы. Известно, что повышение общего количества лейкоцитов и отдельно каждого их подтипа позволяет прогнозировать развитие ИБС, кроме того, практически все клеточные элементы крови, включая лейкоциты, эритроциты и тромбоциты, вовлечены в патогенез атеросклероза [23]. Также известно, что тромбоциты принимают участие в развитии белка-предшественника β-амилоида, и их некоторая функциональная схожесть с нейронами позволяет использовать тромбоциты как модель для исследования болезни Альцгеймера [24].

Сигналинг, опосредованный интерлейкинами (IL) [R-HSA:449147], связан с их плеiotропным действием на клетки (влияние на рост и восстановление тканей, гематопоезический гомеостаз, а также на многочисленные уровни защиты организма от патогенов) [25]. Например, IL-1β является основным медиатором при реализации острофазного ответа на уровне организма, а также в процессе развития местной воспалительной реакции [26]. Известно, что нарушение коронарного кровотока с ишемией миокарда повышает его концентрацию в крови [27]. Также при болезни Альцгеймера наблюдается повышенный уровень данного интерлейкина, что свидетельствует о процессе воспаления при данном заболевании [28].

Сигналинг IL-4 и IL-13 [R-HSA:6785807] в центральной нервной системе связан с нейропротекторным действием IL-4 и IL-13 – подавлением выработки медиаторов воспаления, что подтверждается результатами экспериментального моделирования на животных болезни Альцгеймера [29].

Сигнальный путь IL-17 [KEGG:04657] включает в себя семейство цитокинов, состоящих из IL-17A-F, и играет важную роль при острых и хронических воспалительных реакциях [30]. Семейство IL-17 передает сигналы через соответствующие им рецепторы и активирует нижестоящие пути, которые включают NF-κB, MAPK и C/EBP, индуцирующие экспрессию антимикробных пептидов, цитокинов и хемокинов [31].

Фагоцитоз является важным процессом в реализации защитной функции организма от инфекционных патогенов. Биологический путь Fc-γ-R-опосредованного фагоцитоза [KEGG:04666] реализует данную функцию с помощью γ рецепторов Fc клеток, опсонизированных антителами, которые распознают чужеродный материал. Перекрестное связывание Fc-γ-рецепторов инициирует серию сигналов, опосредованных фосфорилированием тирозина нескольких белков, которые, в свою очередь, приводят к образованию фagosом в результате перегруппировки актина цитоскелета и ремоделирования мембран [32]. Сигнальный путь фagosомы [KEGG:04145] запускается тогда, когда специфические рецепторы на поверхности фагоцитов распознают лиганды на поверхности чужеродных частиц. Приобретение фagosомами лизосомальных протеаз в процессе созревания, а также выделение активных форм кислорода важны для расщепления чужеродных веществ, находящихся в них [33].

Выявленный в ходе биоинформатического анализа сигнальный путь Fc-ε-RI [KEGG:04664] в тучных клетках инициируется взаимодействием антигена с IgE, связанным с внеклеточным доменом α-цепи Rε-RI. Тучные клетки активируют высвобождение предварительно образованных гранул, содержащих биоактивные амины и протеогликанов. Активация фосфолипазы A2 вызывает высвобождение мембранных липидов с последующим развитием липидных медиаторов, таких как лейкотриены, а именно LTC4, LTD4, LTE4, и простагландины, в частности PDG2. Секретируются цитокины, наиболее важные из них: TNFα, IL-4 и IL-5 [34, 35].

Сигнальный путь рецепторов лектина C-типа [KEGG:04625] отвечает за функционирование CLR как рецепторов распознавания образов (PRR) для лигандов, происходящих из патогенов в дендритных клетках, макрофагах, нейтрофилах и т.д. После связывания лигандов CLR стимулируют внутриклеточные сигнальные каскады, которые индуцируют

выработку воспалительных цитокинов и хемокинов, следовательно, запускают врожденный и адаптивный иммунитет к патогенам [36].

Вовлеченность общих генов предрасположенности к исследуемым заболеваниям в вышеперечисленные биологические пути может влиять:

- на процессы выработки цитокинов и хемокинов, участвующих в развитии воспаления в нервной и сердечно-сосудистой системах. Так, показано, что микроглия играет ключевую роль в активации воспалительного процесса. Количество микроглии увеличивается у людей с БА и в эксперименте с моделированием БА у трансгенных мышей [37]. Исследования *in vitro* показывают, что секретируемые клетками микроглии цитокины, в частности IL-1β, IL-6, TNF-α, INF-γ, и хемокины способны усиливать иммунный ответ [37]. Также известно, что многие цитокины, например IL-12, IL-23, IL-6, IL-1β, участвуют как в развитии нейродегенерации, так и являются ключевыми элементами при нейровоспалении, опосредованном вторжением лейкоцитов в головной мозг [38]. При ИБС повышение уровня IL-6 и C-реактивного белка свидетельствует об увеличении поражения коронарных сосудов [39, 40];

- на изменение ответа при воздействии патогенов. При экспериментальной постановке БА на мышцах было выявлено, что введение микробных миметиков помимо вызывания сильного системного воспалительного ответа усиливает нейродегенерацию [41]. При ИБС различные патогенные микроорганизмы могут находиться в атеросклеротической бляшке и поддерживать местную воспалительную реакцию [42]. Однако, независимо от патогенов, обнаруженных в бляшке, развивается системное воспаление за счет высвобождения цитокинов. Например, пародонтальные патогены, такие как *P. gingivalis* и *Actinomyces comitans*, способствуют ответам субпопуляции Th17 как в селезенке, так и в атеросклеротических поражениях, что, в свою очередь, увеличивает высвобождение множества мощных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и IL-17 [42].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Выявленные общие гены предрасположенности к исследуемым заболеваниям также участвуют в сборке плазменного липопротеина [R-HSA:8963898] и ремоделировании липопротеинов плазмы [R-HSA:8963899]. Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) образуются в печени и переносят синтезированный там триацилглицерин в другие ткани организма. Частицы липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) образуются в основном в пече-

ни и перемещают несколько видов липидов между тканями и другими липопротеинами [43]. Ремоделирование липопротеинов плазмы представляет собой последовательность событий, начинающуюся с того, что хиломикроны, циркулируя в организме, приобретают молекулы аполипротеинов С и Е и, взаимодействуя с эндотелиальными липазами, зачастую теряют большую часть своего триацилглицерина. Подвергаясь описанным изменениям, они становятся остатками хиломикронов, которые связываются с рецепторами ЛПНП, прежде всего на поверхности клеток печени. По мере циркулирования хиломикронов, на ЛПОНП воздействуют липопротеиновые липазы, расположенные на эндотелиальных поверхностях кровеносных сосудов и выделяющие жирные кислоты и глицерин. Затем происходит их поглощение тканями и ЛПОНП превращаются сначала в липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), и далее в липопротеины низкой плотности (ЛПНП) [44]. Ремоделирование ЛПВП включает в себя превращение связанного с ЛПВП холестерина в эфиры холестерина (ремоделирование сферических ЛПВП), перенос липидов ЛПВП в клетки-мишени с регенерацией пре-βЛПВП и превращение пре-β ЛПВП в дискоидальные ЛПВП [45].

Идентифицированный в данном исследовании биологический путь метаболизма холестерина [KEGG:04979] при нарушении его функционирования может привести к повышенному риску различных эндокринных расстройств и сердечно-сосудистых заболеваний [46]. Общие гены предрасположенности к ИБС и болезни Альцгеймера PLA2G1B, PLA2G2A участвуют в реализации эфирного липидного обмена [KEGG:00565].

Выявленные пути переваривания и всасывания жира [KEGG:04975] и секреции желчи [KEGG:04976] являются путями, которые принимают участие в снижении уровня холестерина. Сфинголипидный сигнальный путь [KEGG:04071] отражает роль сфингомиелина и продуктов его метаболизма в качестве вторичных мессенджеров при различных метаболических процессах.

Таким образом, изменение липидного обмена при участии данных сигнальных и метаболических путей может приводить к нарушению состояния сосудистой стенки, а именно инфильтрации стенок артерий атерогенными липопротеидами, формированию склеротических бляшек и стенозированию, а также образованию тромбов, и являться ключевым звеном патогенеза ИБС [47].

В головном мозге при БА нарушение метаболизма липидов, а именно повышение уровня холестерина, способствует интеграции β-амилоида в клеточную

мембрану, что в конечном итоге повышает уровень цитозольного кальция в астроцитах и приводит к гибели нейрона [48]. Высокий уровень холестерина в плазме при определенных условиях способен разрушать гематоэнцефалический барьер, что позволяет системным макрофагам проникнуть в паренхиму мозга и инициировать нейровоспаление [49]. Высокий уровень липопротеинов низкой плотности усиливает активность VACE-1, влияет на белок-предшественник β-амилоида и ухудшает синаптическую активность [49]. Также аполипротеин-Е, действующий как переносчик холестерина, может связываться с поверхностными рецепторами клеток и позволяет производить продукты окисления холестерина [50]. Нарушения метаболизма сфинголипидов, в частности его гидролиз, могут приводить к образованию церамида, который при болезни Альцгеймера вызывает апоптоз клеток головного мозга [51].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Гены предрасположенности к ИБС и болезни Альцгеймера участвуют в передаче сигнала посредством NTRK2 (TRKB) [RHSА:9006115] и в сигнальном пути нейротрофина [KEGG:04722], при этом передача сигнала посредством NTRK2 (TRKB) [RHSА:9006115] является частью идентифицированного пути передачи сигнала посредством NTRKs [R-HSA:166520]. Передача сигнала посредством NTRKs представляет собой передачу сигналов от нейротрофинов (NGF, BDNF, NTF3 и NTF4) через рецепторы тирозинкиназы NTRK, обладающие предпочтительным нейротрофиновым лигандом, и рецептор смерти p75NTR, который взаимодействует со всеми нейротрофинами [52].

Идентифицированный биологический путь формирования амилоидных волокон [R-HSA:977225] изначально описывался как реакция полимеризации, зависящая от нуклеации [53], но в настоящее время считается, что она более сложная, с множественными событиями вне пути, приводящими к формированию множества олигомерных структур, помимо фибрилл [54].

Таким образом, рассмотренные в данном блоке сигнальные пути влияют на формирование амилоидных волокон и передачу сигнала с помощью нейротрофинов, что может опосредовать изменения в нервной системе при БА и в сердечно-сосудистой при ИБС.

При БА сигнальный путь формирования амилоидных волокон ответствен за образование β-амилоида (Aβ), который лежит в основе гипотезы амилоидного каскада БА. Она предполагает, что продукция

фрагментов $A\beta_{42}$ накапливается в мозге с возрастом [55]. Нейротрофические факторы модулируют синаптическую пластичность и участвуют в процессах формирования памяти, пониженные уровни, например BDNF, могут способствовать дегенерации и прогрессирующей атрофии нейронов в головном мозге, пораженном БА [56].

У пациентов с БА уровень $A\beta_{42}$ увеличен и также наблюдается отложение данного белка в миокарде [57, 58]. Циркулирующий $A\beta_{40}$ ухудшает атеросклероз сосудов и предсказывает прогрессирование заболевания и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с установленной ИБС [58].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Биологический путь VEGFA-VEGFR2 [R-HSA:4420097] является составной частью сигналинга посредством VEGF [R-HSA:194138] и относится к процессу ангиогенеза. Передача сигналов VEGFA посредством VEGFR2 является основным путем, активирующим ангиогенез через индукцию пролиферации, выживания, прорастания и миграцию эндотелиальных клеток, а также с помощью увеличения проницаемости эндотелия [59]. Нарушение функции VEGF связано с воспалительными заболеваниями, включая атеросклероз [60, 61].

Идентифицированный биологический путь каскадов комплемента и коагуляции [KEGG:04610] объединяет в себе систему комплемента и коагуляцию крови. Основными последствиями активации комплемента являются опсонизация патогенов, рекрутирование воспалительных и иммунокомпетентных клеток и прямое уничтожение патогенов [62].

Биологические пути активации, сигналинга и агрегации тромбоцитов [R-HSA:76002] и активация тромбоцитов [KEGG:04611] являются аналогами и реализуются при помощи общих генов предрасположенности к ИБС и болезни Альцгеймера. Активация интегрин $\alpha IIb\beta 3$ (гликопротеина $IIb/IIIa$), наиболее распространенного рецептора тромбоцитов, усиливает адгезию и приводит к взаимодействию тромбоцитов между собой и их агрегации [63].

Гены предрасположенности к исследуемым заболеваниям участвуют в сигналинге с помощью PDGF [R-HSA:186797]. Фактор роста тромбоцитов (PDGF) является мощным стимулятором роста и подвижности клеток соединительной ткани, таких как фибробласты и клетки гладких мышц, а также капиллярных эндотелиальных клеток и нейронов. PDGF связывает и активирует рецепторы α и β протеинтирозинкиназы (РТК), которые в свою очередь димеризуются и

подвергаются аутофосфорилированию. Затем сайты фосфорилирования привлекают нижестоящие эффекторы для передачи сигнала в клетку [64].

Биологический путь тромбоцитарного гемостаза [R-HSA:418346] регулируется генами предрасположенности к ИБС и болезни Альцгеймера. При нормальных условиях эндотелий сосудов поддерживает расширение сосудов, ингибирует адгезию и активацию тромбоцитов, подавляет коагуляцию, усиливает расщепление фибрина и обладает противовоспалительным характером. При острой сосудистой травме преобладают вазоконстрикторные механизмы, и эндотелий приобретает протромботический, прокоагуляционный и провоспалительный характер. Это достигается за счет уменьшения эндотелиальных дилатационных агентов: аденозина, NO и простагличина; и прямым воздействием АДФ, серотонина и тромбоксана на клетки гладких мышц сосудов, чтобы вызвать их сокращение. В нормальных условиях ламинарный поток индуцирует экспрессию сосудистого эндотелиального COX-2 и синтез простагличина (PGI₂), который, в свою очередь, стимулирует активность эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). PGI₂ и NO противодействуют активации и агрегации тромбоцитов, как и экто-АДФаза CD39, которая уменьшает активацию и рекрутирование тромбоцитов путем метаболизма АДФ, высвобождаемых тромбоцитами [65].

Таким образом, гены предрасположенности, общие для БА и ИБС, вовлечены в реализацию сигнальной трансдукции, влияющей на процессы ангиогенеза, свертываемость крови, выработку воспалительных цитокинов, нарушение которых имеет большое значение при развитии ИБС, а также БА.

Повышенный уровень VEGF, индуцируемого гипоксией фактора роста эндотелия сосудов, был обнаружен в стенках сосудов, периваскулярных отложениях, астроцитах и интратекальном пространстве пациентов с болезнью Альцгеймера и соответствовал хронической церебральной гипоперфузии и гипоксии, которые наблюдались у этих людей [66]. Также, помимо VEGF, сосуды головного мозга при БА высвобождают молекулы, способные влиять на ангиогенез, в том числе IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, TGF β , MCP1, тромбин, ангиопоедин 2, интегрин $\alpha V\beta 3$ и $\alpha V\beta 5$ и HIF1 α [66].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В РЕАЛИЗАЦИЮ ФУНКЦИЙ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

Метаболизм пептидных гормонов [R-HSA:2980736] включает в себя модификацию пептидных гормонов после секреции и их разложение внеклеточ-

ными протеазами. Например, метаболизм инсулина протекает в 4 этапа: образование внутримолекулярных дисульфидных связей, образование комплексов проинсулин-цинк-кальций, протеолитическое расщепление проинсулина с помощью PCSK1 (PC1/3) и PCSK2 с образованием инсулина, транслокация гранул через цитозоль к плазматической мембране. А во время метаболизма ангиотензиногена в ангиотензин ренин расщепляет ангиотензиноген с образованием ангиотензина I. Два С-концевых аминокислотных остатка ангиотензина I затем удаляются ангиотензин-превращающим ферментом, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток, с образованием ангиотензина II, активного пептида, который вызывает сужение сосудов, резорбцию натрия и хлорида, экскрецию калия, задержку воды и секрецию альдостерона [67].

Биологический путь альдостерон-регулируемой реабсорбции натрия [KEGG:04960] отражает роль альдостерона в метаболизме натрия и калия, связываясь с рецепторами эпителиальных минералокортикоидов в клетках почечного собирательного протока, локализованных в дистальном нефроне, способствуя реабсорбции натрия и экскреции калия [68].

В ходе анализа обогащения также были выявлены пути, повсеместно встречающиеся в норме, и изменения регуляции которых наблюдаются при большом числе различных заболеваний. К данной группе были отнесены следующие пути: передача сигнала внутрь клетки [R-HSA:162582], сигнальный путь клеточных ответов на стресс [R-HSA:2262752], сигналинг рецепторных тирозинкиназ [R-HSA:9006934], сигнальный путь MAPK [KEGG:04010], сигнальный путь FoxO [KEGG:04068] и FOXO-опосредованная транскрипция [R-HSA:9614085], сигнальный путь фосфолипазы D [KEGG:04072], сигнальный путь TGF- β [KEGG:04350], сигнальный путь HIF-1 [KEGG:04066], биологическое окисление [R-HSA:211859], биологический путь организации внеклеточного матрикса [R-HSA:1474244], деградация внеклеточного матрикса [R-HSA:1474228], фокальной адгезии [KEGG:04510], регуляция транспорта и поглощения инсулиноподобного фактора роста (IGF) белками, связывающими инсулиноподобный фактор роста (IGFBPs) [R-HSA:381426], сигнальный путь Ras [KEGG:04014].

Отдельно следует отметить роль гена *ApoE4* в развитии исследуемых заболеваний. В исследовании, изучающем связь между посмертной невропатологией болезни Альцгеймера и ишемической болезни сердца, было выявлено, что у носителей аллеля *ApoE4* существует значительная взаимосвязь [69]. Аполипопротеин E (*ApoE*), участвующий

в восприимчивости к БА, регулирует транспорт и метаболизм липидов [44]. Также в 2018 г. вышла статья W. Chen и соавт., которые рассматривали ген *ApoE4* в качестве мишени для лечения ИБС и болезни Альцгеймера. Было показано, что мутация гена аполипротеина E ведет к нарушению обмена холестерина, что может привести к развитию ИБС и болезни Альцгеймера; мутация *ABCA1* приводит к тому же самому результату [6].

Полученные результаты согласуются с результатами исследования, в котором изучались варианты генов, способствующие воспалению и метаболизму холестерина, в связи с острым инфарктом миокарда и болезнью Альцгеймера. В результате было установлено, что острый инфаркт миокарда и БА имеют общие генетические предпосылки, связанные с метаболизмом холестерина и усилением регуляции воспаления [70].

Таким образом, проведенное исследование сигнальных и метаболических путей демонстрирует, что гены, ассоциированные с болезнью Альцгеймера и ишемической болезнью сердца, участвуют в процессах, связанных с гибелью клеток, поддержанием воспаления, метаболизмом жирных кислот, а также с функционированием нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выявлены 69 общих для БА и ИБС биологических путей, среди которых важную роль в изменении внутри и межклеточных взаимодействий клеточного гомеостаза могут играть пути, участвующие в гибели клеток; связанные с врожденной иммунной системой; ответственные за метаболизм жирных кислот; а также процессы сигнальной трансдукции, влияющие на функционирование нервной системы, сердечно-сосудистой системы, эндокринной системы. Полученные результаты позволяют предположить наличие ряда механизмов влияния генетических факторов болезни Альцгеймера и ишемической болезни сердца на процессы развития данных заболеваний.

Исходя из участия сигнальных путей в процессах, описанных выше, можно предположить, что гены предрасположенности, вовлеченные в реализацию данных путей, регулируют процессы:

- апоптоза, как нейронов, так и кардиомиоцитов;
- наработки воспалительных цитокинов и хемокинов и, как следствие, поддержание воспалительного процесса;
- метаболизма липидов, при изменении которого могут образовываться склеротические бляшки на стенках сосудов и приводить к развитию ИБС, а

также при определенных условиях может возникать нейровоспаление в головном мозге;

– формирования β -амилоида, как в головном мозге, так и в миокарде;

– ангиогенеза, в частности при БА повышается уровень VEGF в стенках сосудов.

Результаты данного исследования обеспечивают более глубокое понимание молекулярно-генетических механизмов сочетанного развития исследуемых заболеваний и их корректного лечения, а также являются предпосылками к дальнейшему изучению данных патологий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Alzheimer's Disease International. The costs of dementia: advocacy, media and stigma. *World Alzheimer Rep. 2019 Attitudes to Dement.* 2019;100–101.
2. Naj A.C., Schellenberg G.D. (ADGC) for the ADGC. Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 2017;174(1):5–26. DOI: 10.1002/ajmg.b.32499.
3. Barber R.C. The genetics of Alzheimer's disease. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:246210. DOI: 10.6064/2012/246210.
4. Tini G., Scagliola R., Monacelli F., La Malfa G., Porto I., Brunelli C., Rosa G.M. Alzheimer's Disease and Cardiovascular Disease: A Particular Association. *Cardiol. Res. Pract.* 2020;2020:2617970. DOI: 10.1155/2020/2617970.
5. De Bruijn R.F., Ikram M.A. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC Med.* 2014;12:130. DOI: 10.1186/s12916-014-0130-5.
6. Aronson M.K., Ooi W.L., Morgenstern H., Hafner A., Masur D., Crystal H. et al. Women, myocardial infarction, and dementia in the very old. *Neurology*. 1990;40(7):1102 LP–1102. DOI: 10.1212/wnl.40.7.1102.
7. Левин О.С., Трусова Н.А. Сосудистые факторы риска болезни Альцгеймера. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2013;113(7–2):3–12.
8. Wolf P.A. Contributions of the Framingham Heart Study to Stroke and Dementia Epidemiologic Research at 60 Years. *Arch. Neurol.* 2012;69(5):567–571. DOI: 10.1001/archneurol.2011.977.
9. Newman A.B., Fitzpatrick A.L., Lopez O., Jackson S., Lyketsos C., Jagust W. et al. Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study Cohort. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2005;53(7):1101–1107. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2005.53360.x.
10. Knopman D.S., Petersen R.C., Cha R.H., Edland S.D., Rocca W.A. Coronary artery bypass grafting is not a risk factor for dementia or Alzheimer disease. *Neurology*. 2005;65(7):986LP–990. DOI: 10.1212/01.wnl.0000171954.92119.c7.
11. Ikram M.A., Brusselle G., Ghanbari M., Goedegebure A., Ikram M.K., Kavousi M. et al. Objectives, design and main findings until 2020 from the Rotterdam Study. *Eur. J. Epidemiol.* 2020;35(5):483–517. DOI: 10.1007/s10654-020-00640-5.
12. Liu G., Yao L., Liu J., Jiang Y., Ma G.; Genetic and Environmental Risk for Alzheimer's disease (GERAD1) Consortium et al. Cardiovascular disease contributes to Alzheimer's disease: evidence from large-scale genome-wide association studies. *Neurobiol. Aging*. 2014;35(4):786–792. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.084.
13. Piñero J., Bravo À., Queralt-Rosinach N., Gutiérrez-Sacristán A., Deu-Pons J., Centeno E. et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D833–839. DOI: 10.1093/nar/gkw943.
14. Bindea G., Mlecnik B., Hackl H., Charoentong P., Tosolini M., Kirilovsky A. et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25(8):1091–1093. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp101.
15. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
16. Fabregat A., Jupe S., Matthews L., Sidiropoulos K., Gillespie M., Garapati P. et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D649–655. DOI: 10.1093/nar/gkx1132.
17. Chu W.-M. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013;328(2):222–225. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.014.
18. Jacobs S.B.R., Basak S., Murray J. I., Pathak N., Attardi L.D. Siva is an apoptosis-selective p53 target gene important for neuronal cell death. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1374–1385. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402128.
19. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(10):700–714. DOI: 10.1038/nrm2970.
20. Guo H., Albrecht S., Bourdeau M., Petzke T., Bergeron C., LeBlanc A.C. Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 2004;165(2):523–531. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63317-2.
21. Zhu X., Raina A.K., Perry G., Smith M.A. Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Curr. Alzheimer Res.* 2006;3(4):393–396. DOI: 10.2174/156720506778249470.
22. Dong Y., Chen H., Gao J., Liu Y., Li J., Wang J. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2019;136:27–41. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.09.001.
23. Madjid M., Awan I., Willerson J.T., Casscells S.W. Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;44(10):1945–1956. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.07.056.
24. Духинова М.С., Пономарёв Е.Д. Роль тромбоцитов в нейровоспалительных заболеваниях. Обзор. *Вестник Московского университета Серия 16 Биология*. 2018;73(3):125–131.
25. Vossenhric C.A.J., Di Santo J.P. Interleukin signaling. *Curr. Biol.* 2002;12(22):R760–763. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)01286-1.
26. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику. *Медицинская иммунология*. 2001;3(3):431–438.
27. Ребров А.П., Воскобой И.В. Роль воспалительных и инфекционных факторов в развитии атеросклероза. *Терапевтический архив*. 2004;79(1):78–82.

28. Ng A., Tam W.W., Zhang M.W., Ho C.S., Husain S.F., McIntyre R S. et al. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):12050. DOI: 10.1038/s41598-018-30487-6.
29. Kawahara K., Suenobu M., Yoshida A., Koga K., Hyodo A., Ohtsuka H. et al. Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience.* 2012;207:243–260. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.049.
30. Song X., Qian Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cell Signal.* 2013;25(12):2335–2347. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.07.021
31. Gaffen S.L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9(8):556–567. DOI: 10.1038/nri2586.
32. Joshi T., Butchar J.P., Tridandapani S. Fc γ receptor signaling in phagocytes. *Int. J. Hematol.* 2006;84(3):210–216. DOI: 10.1532/IJH97.06140.
33. Stuart L.M., Ezekowitz R.A.B. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 2005;22(5):539–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.05.002.
34. Nadler M.J., Matthews S.A., Turner H., Kinet J.P. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv. Immunol.* 2000;76:325–355. DOI: 10.1016/s0065-2776(01)76022-1.
35. Siraganian R.P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 2003;15(6):639–646. DOI: 10.1016/j.coi.2003.09.010.
36. Geijtenbeek T.B.H., Gringhuis S.I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16(7):433–448. DOI: 10.1038/nri.2016.55.
37. Combs C.K. Inflammation and microglia actions in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4(4):380–388. DOI: 10.1007/s11481-009-9165-3.
38. Becher B., Spath S., Gorman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;17(1):49–59. DOI: 10.1038/nri.2016.123.
39. Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation.* 2011;8:26. DOI: 10.1186/1742-2094-8-26.
40. Fioranelli M., Bottacchioli A.G., Bottacchioli F., Bianchi M., Rovesti M., Rocca M.G. Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrinology-Based. *Front. Immunol.* 2018;9:2031. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02031.
41. Field R., Champion S., Warren C., Murray C., Cunningham C.. Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFN α /beta and IL-1beta responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration. *Brain Behav. Immun.* 2010;24(6):996–1007. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.04.004.
42. Pothineni N.V.K., Subramany S., Kuriakose K., Shirazi L.F., Romeo F., Shah P.K. et al. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Eur. Heart J.* 2017;38(43):3195–3201. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx362.
43. Vance J.E., Vance D.E. The assembly of lipids into lipoproteins during secretion. *Experientia.* 1990;46(6):560–569. DOI: 10.1007/BF01939694.
44. Gibbons G.F., Wiggins D., Brown A.-M., Hebbachi A.-M. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* 2004;32(1):59–64. DOI: 10.1042/bst0320059.
45. Rye K.A., Clay M.A., Barter P.J. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999;145(2):227–238. DOI: 10.1016/s0021-9150(99)00150-1.
46. Cortes V.A., Busso D., Maiz A., Arteaga A., Nervi F., Rigotti A. Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front Biosci.* 2014;19(3):416–428. DOI: 10.2741/4216.
47. Дидигова Р.Т., Инарокова А.М., Имагожева М.Я., Мамедов М.Н. Современные взгляды на этиологию и диагностику ишемической болезни сердца. *Лечебное дело.* 2011;4:11–17.
48. Abramov A.Y., Ionov M., Pavlov E., Duchon M.R. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2011;10(4):595–603. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00685.x.
49. Chen X., Hui L., Geiger J.D. Role of LDL cholesterol and endolysosomes in amyloidogenesis and Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurophysiol.* 2014;5(5):236. DOI: 10.4172/2155-9562.1000236.
50. Liu C.C., Kanekiyo T., Xu H., Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews. Neurology.* 2013;9(2):106–118. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.263.
51. Mullen T.D., Obeid L.M. Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012;12(4):340–363. DOI: 10.2174/187152012800228661.
52. Skaper S.D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol. Biol.* 2012;846:1–12. DOI: 10.1007/978-1-61779-536-7_1.
53. Teplow D.B. Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Amyloid.* 1998;5(2):121–142. DOI: 10.3109/13506129808995290.
54. Roychaudhuri R., Yang M., Hoshi M.M., Teplow D.B. Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 2009;284(8):4749–4753. DOI: 10.1074/jbc.R800036200.
55. Ricciarelli R., Fedele E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind. *Curr. Neuropharmacol.* 2017;15(6):926–935. DOI: 10.2174/1570159X15666170116143743.
56. Amidfar M., de Oliveira J., Kucharska E., Budni J., Kim Y.K. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2020;257:118020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118020.
57. Troncone L., Luciani M., Coggins M., Wilker E.H., Ho C.Y., Codispoti K.E. et al. A β amyloid pathology affects the hearts of patients with Alzheimer's disease: mind the heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016;68(22):2395–2407. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.08.073.
58. Janelidze S., Stomrud E., Palmqvist S., Zetterberg H., van Westen D., Jeromin A. et al. Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci. Rep.* 2016;6:26801. DOI: 10.1038/srep26801.

59. Lohela M., Bry M., Tammela T., Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009;21(2):154–165. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.12.012.
60. Shibuya M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 2006;312(5):549–560. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012.
61. Matsumoto T., Mugishima H. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J. Atheroscler. Thromb.* 2006;13(3):130–5. DOI: 10.5551/jat.13.130.
62. Mathern D.R., Heeger P.S. Molecules great and small: The complement system. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015;10(9):1636–1650. DOI: 10.2215/CJN.06230614.
63. Phillips D.R., Charo I.F., Scarborough R.M. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell.* 1991;65(3):359–362. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90451-4.
64. Tallquist M., Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):205–213. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.003.
65. Kunapuli S.P., Dorsam R.T., Kim S., Quinton T.M. Platelet purinergic receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003;3(2):175–180. DOI: 10.1016/s1471-4892(03)00007-9.
66. Steiner D.F. On the discovery of precursor processing. *Methods Mol. Biol.* 2011;768:3–11. DOI: 10.1007/978-1-61779-204-5_1.
67. Rozansky D.J. The role of Aldosterone in Renal Sodium Transport. *Semin. Nephrol.* 2006;26(2):173–181. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2005.09.008.
68. Beerli M.S., Rapp M., Silverman J.M., Schmeidler J., Grossman H.T., Fallon J.T. et al. Coronary artery disease is associated with Alzheimer disease neuropathology in APOE4 carriers. *Neurology.* 2006;66(9):1399 LP–1404. DOI: 10.1212/01.wnl.0000210447.19748.0b.
69. Martins I.J., Hone E., Foster J.K., Sünram-Lea S.I., Gnjec A., Fuller S.J. et al. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol. Psychiatry.* 2006;11(8):721–736. DOI: 10.1038/sj.mp.4001854.
70. Licastro F., Chiappelli M., Caldarera C.M., Porcellini E., Carbone I., Caruso C. et al. Sharing pathogenetic mechanisms between acute myocardial infarction and Alzheimer's disease as shown by partially overlapping of gene variant profiles. *J. Alzheimers Dis.* 2011;23(3):421–431. DOI: 10.3233/JAD-2010-090871.

Информация об авторах

Часовских Наталия Юрьевна – д-р мед. наук, профессор, и. о. зав. кафедрой медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск, nch03@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6077-0347>

Чижик Евгения Евгеньевна – ассистент, кафедра медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск, evgenika06@gmail.com

(✉) **Чижик Евгения Евгеньевна**, evgenika06@gmail.com

Поступила в редакцию 25.01.2022;
одобрена после рецензирования 04.05.2022;
принята к публикации 09.06.2022



УДК 616.24/.56-003.2-008.6/.8-056.7:575.224]-07: 618.2:618.4
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-205-211>

Клинические особенности течения муковисцидоза на фоне беременности и родов

Тетенева А.В.^{1,3}, Чернявская Г.М.¹, Беспалова И.Д.¹, Скороходова Т.В.^{1,4},
 Кошавцева Ю.И.¹, Радионов Д.И.¹, Калюжина Е.В.¹, Романов Д.С.¹, Радионова Е.В.¹,
 Устюжанина Е.А.², Степанов И.А.⁴, Карманова А.В.⁴, Голубятникова Е.В.⁴

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

² Томская областная клиническая больница (ТОКБ)
 Россия, 634063, г. Томск, ул. Ивана Черных, 96

³ Медико-санитарная часть (МСЧ) № 2
 Россия, 634040, г. Томск, ул. Бела Куна, 3

⁴ Областной перинатальный центр (ОПЦ) им. И.Д. Евтушенко
 Россия, 634063, г. Томск, ул. Ивана Черных, 96/1

РЕЗЮМЕ

Муковисцидоз (МВ) представляет собой одну из актуальных медико-социальных проблем систем здравоохранения большинства стран в связи с достаточно высоким уровнем распространенности, развитием полиорганных поражений и неблагоприятными исходами.

Благодаря современным достижениям диагностики и лечения муковисцидоза в настоящее время не только увеличилась средняя продолжительность жизни пациентов, но и улучшилось её качество, появилась возможность сохранения беременности и деторождения. В связи с тем, что МВ может неблагоприятно влиять на течение беременности, родов, состояние здоровья как матери, так и ребенка, вопросы правильного ведения больных во время беременности и родов у женщин, страдающих МВ, приобретают особую актуальность. Примером грамотной курации на всех этапах наблюдения за пациенткой в период беременности и родов на фоне МВ является представленный клинический случай.

Ключевые слова: муковисцидоз, сохранение беременности, деторождение, МВ.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Тетенева А.В., Чернявская Г.М., Беспалова И.Д., Скороходова Т.В., Кошавцева Ю.И., Радионов Д.И., Калюжина Е.В., Романов Д.С., Радионова Е.В., Устюжанина Е.А., Степанов И.А., Карманова А.В., Голубятникова Е.В. Клинические особенности течения муковисцидоза на фоне беременности и родов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):205–211. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-205-211>.

✉ Беспалова Инна Давидовна, innadave@mail2000.ru

Clinical features of the course of cystic fibrosis during pregnancy and childbirth

Teteneva A.V.^{1,3}, Chernyavskaya G.M.¹, Bepalova I.D.¹, Skorokhodova T.V.^{1,4}, Koshchavtseva Yu.I.¹, Radionov D.I.¹, Kalyuzhina E.V.¹, Romanov D.S.¹, Radionova E.V.¹, Ustyuzhanina E.A.², Varfolomeeva I.A.², Stepanov I.A.⁴, Karmanova A.V.⁴, Golubyatnikova E.V.⁴

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Tomsk Regional Clinical Hospital

96, I. Chernykh Str., Tomsk, 634063, Russian Federation

³ Medical and Sanitary Hospital No. 2

3, Bela Kuna Str., Tomsk, 634040, Russian Federation

⁴ Regional Perinatal Center

96/1, I. Chernykh Str., Tomsk, 634063, Russian Federation

ABSTRACT

Cystic fibrosis is one of the urgent medical and social problems of health care systems in most countries due to fairly high prevalence, development of multi-organ lesions, and poor outcomes.

Due to modern advances in the diagnosis and treatment of cystic fibrosis, not only has the average life expectancy of patients increased, but their quality of life has also improved, and it has become possible to maintain pregnancy and childbearing. Since cystic fibrosis can adversely affect the course of pregnancy, childbirth, and health of both mother and child, proper management of women with cystic fibrosis during pregnancy and childbirth is of particular relevance. The presented clinical case is an example of competent supervision at all stages of monitoring of a patient with cystic fibrosis during pregnancy and childbirth.

Keywords: cystic fibrosis, maintenance of pregnancy, childbearing, CF

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

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Teteneva A.V., Chernyavskaya G.M., Bepalova I.D., Skorokhodova T.V., Koshchavtseva Yu.I., Radionov D.I., Kalyuzhina E.V., Romanov D.S., Radionova E.V., Ustyuzhanina E.A., Varfolomeeva I.A., Stepanov I.A., Karmanova A.V., Golubyatnikova E.V. Clinical features of the course of cystic fibrosis during pregnancy and childbirth. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):205–211. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-205-211>.

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз (МВ) представляет собой одну из актуальных медико-социальных проблем систем здравоохранения большинства стран в связи с достаточно высоким уровнем распространенности, развитием полиорганных поражений и неблагоприятными исходами [1–3]. Муковисцидоз является наследственным заболеванием, обусловленным мутацией гена муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости и характеризуется поражением экзокринных желез целого ряда жизненно важных органов: дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, печени, поджелудочной железы,

слюнных и потовых желез, органов репродуктивной системы [2–6]. При этом патология дыхательных путей является наиболее частой причиной осложнений и летальности, сопровождается персистирующим инфекционным воспалительным процессом в дыхательных путях с формированием вязкого бронхального секрета [2, 5, 6–8]. Первые клинические симптомы обычно появляются в раннем детстве [2, 9]. Хронический, выраженный патологический процесс способствует формированию бронхоэктазов, развитию легочной гипертензии и легочного сердца. Однако ведущим фактором, определяющим степень тяжести и прогноз при муковисцидозе, считается инфекция нижних дыхательных путей [2, 10].

Благодаря современным достижениям диагностики и лечения муковисцидоза в настоящее время не только увеличилась продолжительность жизни пациентов в среднем до 36,8 лет, но и улучшилось качество жизни, появилась возможность сохранения беременности и деторождения [9, 11]. Однако необходимо понимать, что у женщин с этим заболеванием беременность остается фактором высокого риска развития декомпенсации заболевания вплоть до летального исхода, а декомпенсированный патологический процесс может определять неблагоприятное течение беременности и родов [4, 12, 13].

Исследования последних лет подтверждают факт, что фертильная функция при МВ у женщин не нарушена, за исключением случаев, когда в цервикальном канале скапливается более вязкий секрет [12, 14]. Нередко у пациенток с МВ возникают многоплодная беременность, гестационный сахарный диабет, преждевременные роды и показания к оперативному родоразрешению [13, 15]. Выраженные респираторные нарушения лежат в основе пневмоний, с развитием острой дыхательной недостаточности и необходимостью применения методов инвазивной вентиляции легких [13]. Тем не менее достаточное число наблюдений показали, что большинство беременностей у женщин с МВ заканчивается спонтанными родами через естественные родовые пути, к кесареву сечению прибегают в случаях осложнений у матери или ребенка [15, 16].

Таким образом, учитывая, что МВ может неблагоприятно влиять на течение беременности, родов, состояние здоровья как матери, так и ребенка, вопросы правильного ведения больных во время беременности и родов у женщин, страдающих МВ, приобретают особую актуальность. Примером грамотной курации на всех этапах наблюдения за пациенткой в период беременности и родов на фоне МВ является представленный клинический случай.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациентка П. 22 лет, госпитализирована в пульмонологическое отделение ОКБ 10.10.2019 в плановом порядке для проведения контрольного обследования, стационарного лечения и решения вопроса о сохранении беременности. Беременность первая, желанная.

Из анамнеза заболевания: в возрасте 1,5 мес перенесла правостороннюю нижнедолевую пневмонию, с детства беспокоил редкий сухой кашель, иногда с трудноотделяемой вязкой мокротой, который усиливался после переохлаждения, наблюдалась у педиатра с диагнозом «хронический бронхит». Впервые диагноз «муковисцидоз» выставлен в 4 года 10 мес, при обследовании выявлено повышение хлоридов

пота до 119 мэкв/л. Наблюдается в НИИ медицинской генетики с диагнозом: «муковисцидоз, смешанная форма (легочно-кишечная), средне-тяжелое, непрерывно-рецидивирующее течение. Компауд-гетерозигота по *Dele 2,3/E92,K*. Хроническая панкреатическая недостаточность».

В 2011 г. была проведена торакоскопическая нижнедолевая лобэктомия по поводу бронхоэктазов в S8–10 справа. Постоянно получает базовую терапию: пульмозим (дорназа-альфа) по 1 ампуле/сут через небулайзер, брамитоб 300 мг 2 раза/сут через небулайзер курсами 28 сут/28 сут перерыв (очередной курс закончила 9 октября), креон 25 тыс. ед (из расчета 6 тыс. ед/кг массы тела) по 10 капсул/сут в день во время еды, урсофальк 250 мг по 5 капсул/сут. Проходит плановое стационарное лечение 1–2 раза в год с антибактериальной терапией (АБТ). Последняя госпитализация в пульмонологическое отделение была в декабре 2018 г., во время которой пациентка получила очередной курс АБТ согласно микробиологическому исследованию мокроты (*St. aureus* 10⁵, *Stenotrophomonas maltophilia* 10⁵), ко-тримоксазол, пиперацillin/тазобактам.

За 2 нед до настоящей госпитализации отмечала усиление кашля с мокротой светло-желтого цвета в объеме до 20 мл/сут (количество и цвет мокроты не изменился), снижение толерантности к физической нагрузке, появление субфебрильной температуры тела по вечерам, однократно до 38 °С (принимала парацетамол). Так, 9.10.2019 проведено ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза, диагностирована маточная беременность малого срока.

Анамнез жизни: в 2010 г. аппендэктомия, в 2011 г. – удаление нижней доли правого легкого по поводу бронхоэктазов, в 2014 г. – удаление полипов носоглотки. В детстве перенесла ветряную оспу. Менструации с 14 лет, регулярные, умеренные, безболезненные, по 5 дней, через 30 дней, нарушения менструального цикла отрицает.

Является инвалидом III группы.

Наследственность отягощена: у средней сестры (пациентка – старшая сестра) также выявлен МВ, наблюдается в НИИ медицинской генетики.

При поступлении: состояние удовлетворительное. Кожные покровы бледные, чистые, влажные, цианоза губ нет. Рост 165 см, вес 51 кг, индекс массы тела – 18,7, артериальное давление – 100/60 мм рт. ст., пульс – 80 уд./мин, температура тела 37,1 °С, частота дыхания – 20 в минуту. Сатурация O₂ (SpO₂) на атмосферном воздухе составила 98%, после теста шестиминутной ходьбы – 96%. Грудная клетка цилиндрической формы, эластичная. Перкуторный звук легочный, одинаковый над симметричными участками

ми. При аускультации легких: дыхание жесткое везикулярное, хрипов нет. Границы сердца не изменены. Тоны сердца громкие, ритмичные. Живот мягкий, при пальпации безболезненный во всех отделах. Печень и селезенка не увеличены. Дизурии нет. Симптом поколачивания по поясничной области отрицательный.

Анализ крови: гемоглобин – 122 г/л, лейкоциты – $17,8 \times 10^9/\text{л}$: палочкоядерные – 6%, сегментоядерные – 78%, эозинофилы – 1%, лимфоциты – 13%, моноциты – 2%, тромбоциты – $180 \times 10^9/\text{л}$, скорость оседания эритроцитов – 27 мм/ч. Биохимические показатели крови без существенных отклонений от нормы: глюкоза – 4,25 ммоль/л, общий белок – 68 г/л, альбумины – 33,9 г/л, билирубин – 13,3/3,5 мкмоль/л, аланинаминотрансфераза – 11,2 ед, аспартатаминотрансфераза – 7,1 ед, альфа-амилаза – 91,6 ед/л, креатинин – 66,3 мкмоль/л, С-реактивный белок – 57,8 мг/л, фибриноген – 7,4 г/л.

15.10.2019. Микробиологическое исследование крови на стерильность – роста бактериальной флоры не выявлено.

Микробиологическое исследование мокроты на микрофлору от 12.10.2019. Рост *Acinetobacter baumannii* 10^5 (панрезистентный штамм, нечувствительность к карбапенемам); от 15.07.2019 – рост *Stenotrophomonas maltophilia* 10^6 , *St. aureus* 10^5 , *Candida albicans* 10^6 (панрезистентные), от 24.10.2019: рост *Stenotrophomonas maltophilia* 10^2 , *Candida albicans* 10^3 (панрезистентные).

12.10.2019. Спирограмма. Объем форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ1) – 78%, форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) – 84%, ОФВ1/ФЖЕЛ – 82,8. Заключение: жизненная емкость легких в пределах условной нормы. Нарушение вентиляционной способности легких по обструктивному типу 0–I ст.

11.10.2019. Электрокардиография: синусовая тахикардия, частота сердечных сокращений – 92 уд./мин. Электрическая ось сердца отклонена вправо. Поворот вокруг продольной оси правым желудочком вперед.

11.10.2019. Эхокардиография: полости не увеличены, гипертрофии нет. Сократимость левого и правого желудочков в пределах нормы. Нарушений локальной сократимости не выявлено. Диастолическая дисфункция левого желудочка по псевдонормальному типу. Клапаны без изменений. Трехстворчатый клапан регургитации 1-й степени, систолическое давление в правом желудочке не повышено. Перикард не изменен, жидкости нет.

12.10.2019. УЗИ органов брюшной полости (комплексное): печень не увеличена, контур ровный, край острый, эхогенность обычная, структура однородная, желчные протоки не расширены, стенки плотные, сосудистый рисунок не деформирован, воротная вена –

8 мм. Желчный пузырь: размеры: 80×30 мм, стенки плотные 3 мм, в полости осадок. Поджелудочная железа не увеличена, контуры ровные, эхогенность обычная, структура однородная. Вирсунгов проток – 1 мм. Селезенка не увеличена, структура однородная. Почки не увеличены, толщина паренхимы в норме, контуры ровные, подвижность сохранена, положение обычное, структура паренхимы однородная, границы синусов нечеткие, признаков нарушения уродинамики нет. Заключение: признаки хронического холецистита. Умеренные диффузные изменения почек.

14.10.2019. УЗИ щитовидной железы и паращитовидных желез. Заключение: эхоскопически без патологии.

От рентгенографии органов грудной клетки пациентка категорически отказалась, несмотря на разъяснение о необходимости и безопасности его проведения.

Спиральная компьютерная томография грудной полости от 17.12.2018. Заключение: состояние после правосторонней нижнедолевой лобэктомии. Инфильтративные участки, смешанные инфильтративные очаговые изменения легких в сочетании с уплотнением интерстициальной стромы легких по контуру с двух сторон в долях легких. Утолщение стенок бронхов. Мелкие мешотчатые бронхоэктазы, немногочисленные кальцинаты легких с обеих сторон. Мелкие участки тяжистого фиброза с двух сторон.

С учетом хронического бактериовыделения синегнойной палочки из мокроты в анамнезе, а также наличия в бактериальных посевах других неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*), наличия клинко-лабораторных признаков обострения бронхолегочной инфекции и неблагоприятного прогноза при отсутствии антимикробной терапии по жизненным показаниям была назначена АМТ. Назначение АМТ и дальнейшая тактика ведения пациентки проводились с учетом беременности, с наличием информированного согласия. Назначенная стартовая терапия (меронем по 1,0 гр 3 р/сут внутривенно (в/в) капельно) не дала эффекта: сохранялась повышение температуры тела до субфебрильных цифр, лейкоцитоз до $21,3 \times 10^9/\text{л}$ со сдвигом формулы влево, что послужило основанием для смены АМТ, назначена комбинация цефоперазон/сульбактам 6 г/сут (цефоперазон 3 г + сульбактам 3 г) в/в капельно и фосфомицин 2,0 $\times$ 2 раза/сут в/в капельно. На фоне проводимой терапии состояние улучшилось: температура тела не превышала 37 °С, мокрота желтого цвета, объем ее за сутки около 15 мл. По результатам общего анализа крови отмечена положительная динамика: снижение лейкоцитоза (от 24.10.2019 лейкоци-

ты – $9,43 \times 10^9$ /л: палочкоядерные – 6%, сегментоядерные – 71%, эозинофилы – 0,5%, лимфоциты – 16,8%, моноциты – 5,7%); снизился уровень С-реактивного белка до 4,3 мг/л.

Проведен консилиум с участием пульмонологов, генетиков, акушеров-гинекологов с целью выбора дальнейшей тактики лечения и решения вопроса о возможности пролонгирования беременности. С учетом состояния больной, особенности клинической картины муковисцидоза следующие: среднетяжелое течение, отсутствие существенных изменений вентилиционной функции легких (показатели близки к нормальным значениям), отсутствие признаков дыхательной недостаточности (SpO_2 на атмосферном воздухе 98%), отсутствие легочной гипертензии и гипертрофии правого желудочка. Вынашивание беременности возможно. При этом наличие жизненных показаний к проведению массивной АМТ в настоящее время (первый триместр беременности) сопряжено с риском негативного влияния на плод. Пациентка и родственники проинформированы об этом для принятия решения. Кроме этого им объяснили, что после родов, учитывая состояние пациентки, может возникнуть необходимость госпитализации, ей потребуется помощь по уходу за ребенком. Пациентка приняла решение пролонгировать беременность.

Акушерско-гинекологический статус при поступлении. 12.10.2019. Осмотр гинеколога. Наружные половые органы развиты правильно, без патологических изменений. Слизистая влагалища, шейка матки визуально не изменены, шейка отклонена кзади от проводной оси таза, форма цилиндрическая, консистенция нормальная, не укорочена, наружный зев закрыт, матка увеличена до 5–6 нед беременности, в нормотонусе, подвижная, безболезненная. На момент осмотра данных за острую акушерскую патологию нет. Беременность 6–7 нед.

14.10.2019. УЗИ матки и придатков трансвагинальное. Положение матки в центре, в *retroversion-flexio*; контуры матки ровные, структура миометрия однородная, в полости матки: плодное яйцо диаметром 24 мм, беременность 6 нед и 3 дня; шейка матки: структура не изменена, объемных образований в проекции придатков матки не выявлено. Свободной жидкости в позадиматочном пространстве нет. Заключение: беременность 6 нед и 3 дня.

21.10.2019. Гинекологический статус: наружные половые органы развиты правильно. Рост волос по женскому типу. Влагалище узкое, складчатость сохранена. Шейка матки кзади, длиной до 3,0 см, плотная, наружный зев закрыт. Матка увеличена до 8 нед, шаровидная, мягковатая, безболезненная. Придатки с обеих сторон без особенностей.

УЗИ матки и придатков трансвагинальное в динамике от 21.10.2019: Беременность по фетометрии 7 нед и 3 дня.

По настоятельной просьбе выписана 31.10.2019. Диагноз при выписке: беременность 9 нед. Муковисцидоз, смешанная форма (легочно-кишечная), средне-тяжелое, непрерывно-рецидивирующее течение. Компауд-гетерозигота по *Dele 2,3/E92,K*. Хроническое инфицирование дыхательных путей *St. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*. Хронический бронхит. Бронхоэктазы обоих легких, состояние после торакоскопической нижнедолевой лобэктомии справа (04.03.2011). Фиброз верхней доли правого легкого. Хронический пансинусит. Внешнесекреторная панкреатическая недостаточность. Хронический эрозивный гастрит антрального отдела желудка, дуоденит НР(–), недостаточность кардии. Гастроэзофагиальная рефлюксная болезнь. Синдром избыточного бактериального роста. Вторичный дисбиоз кишечника. Астенический синдром.

Медицинское наблюдение пациентки по поводу беременности осуществлялось в Областном перинатальном центре с 13 нед. Наблюдение проводилось акушером-гинекологом совместно с пульмонологом-терапевтом. Отмечена высокая приверженность пациентки к наблюдению и лечению.

Обострений заболевания, потребовавших назначений АМТ, а также существенной отрицательной динамики спирографических показателей и значений сатурации крови не было. В течение беременности беспокоили одышка при физической нагрузке, наиболее выраженная в последнем триместре беременности, тошнота, периодическая рвота.

В течение беременности в соответствии с полученными рекомендациями получала: утрожестан 200 мг 1 раз/сут *per vaginam*, витамин D 2 тыс. МЕ, кальцеин-адванс 1 капсулу/сут (500 мг кальция), урсофальк 5 капсул/сут в два приема, креон 10 капсул/сут в три приема, ингаляции пульмозина 1 раз/сут, йодомарин 200 мкг/сут, тобрамицин ингаляции (терапия 28 сут, перерыв 28 сут), ингаляции сальбутамола «по требованию».

Прибавка массы тела за время беременности составила 9 кг.

Проводились УЗ-скрининги: 1) 12 нед (НИИ медицинской генетики) – патологии не выявлено; 2) 19,6 нед (НИИ медицинской генетики) – патологии не выявлено; 3) 30 нед (ОПЦ им. И.Д. Евтушенко) – патологии не выявлено.

В сроке 35,2 нед пациентка поступила на родовую госпитализацию для решения вопроса о родоразрешении. Составлен план на роды. Степень риска

высокая – 15 баллов, предполагаемая масса плода $2\,600\text{ г} \pm 26\text{ г}$.

В связи с появлением одышки при незначительной физической активности, срок беременности близкий к доношенному (35,2 нед), принято решение о плановом оперативном родоразрешении 30.04.2020. Пациентка с тактикой согласна. Была запланирована регионарная анестезия и проведение антибиотикопрофилактики: ампициллин + сульбактам 1,5 г парентерально, дальнейшее назначение антибактериальных препаратов по показаниям.

30.04.2020 в соответствии с планом проведено оперативное родоразрешение. Родился недоношенный мальчик, вес 2 620 г, рост 49 см, оценка по шкале Апгар 8/8 баллов. Во время операции проведено отсроченное пережатие пуповины. Околоплодные воды светлые – 400 мл. Кровопотеря – 600 мл.

Операция кесарева сечения прошла без технических сложностей. Послеоперационный период протекал без осложнений. Родильница выписана на 13-е сут (задержка выписки по состоянию ребенка). Новорожденный находился в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных 7 сут и в отделении патологии новорожденных и недоношенных детей 10 сут. Диагноз: основной: недоношенность 35,3 нед. Соответствие сроку гестации. Постконцептуальный возраст – 37,4 нед. Сопутствующий: респираторный дистресс-синдром новорожденных средней степени тяжести. Неполное удвоение левой почки. Желтуха недоношенных. Киста сосудистого сплетения справа.

Состояние при рождении тяжелое за счет дыхательных нарушений. По шкале Сильвермана 4–5 баллов. Проводилась инфузионная терапия, респираторная поддержка (6 сут): в родильном зале проводили НСРАР, в отделении реанимации и интенсивной терапии для новорожденных – респираторная поддержка СРАР с положительной динамикой, фототерапия (нарастание желтухи, гипербилирубинемия за счет непрямой фракции). Динамика положительная на фоне лечения. Состояние на момент выписки удовлетворительное. Неврологический статус соответствует гестационному возрасту. Вскармливание – сцеженное грудное молоко через рожок. Прикладывание к груди. Носовое дыхание свободное, зев спокоен. Кожные покровы субиктерично-розовые, чистые. Пупочная ранка эпителизирована. Дыхание проводится по всем полям, хрипов нет. Тоны сердца ясные, ритмичные. Живот мягкий, безболезненный. Печень, селезенка не увеличены. Мочится. Прививки не проводились.

В настоящее время ребенок наблюдается в детской поликлинике: развивается согласно возрасту, отклонений и отставания в развитии не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные достижения в области пульмонологии, акушерства, неонатальной и анестезиологической службы позволили женщинам с муковисцидозом иметь успешные беременности без видимых значительных нарушений функций их легких. При рассмотрении вопроса об использовании лекарственных средств во время беременности известные и неизвестные риски воздействия медикаментозного лечения на плод должны быть сопоставлены с риском для здоровья матери в результате прекращения терапии. Выбор способа разрешения беременности определяется состоянием здоровья матери, и при условии ухудшения функции внешнего дыхания может быть принято решение о проведении кесарева сечения.

В основе благополучной беременности и успешного родоразрешения в данном случае следует отметить ряд условий: во-первых, пациентке диагноз «муковисцидоз» был установлен еще в детском возрасте, она длительное время наблюдалась по поводу своего заболевания у пульмонологов и генетиков; во-вторых, отсутствие нарушений функции внешнего дыхания на ранних сроках беременности и отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза и, в-третьих, согласованная работа специалистов (пульмонологов, акушеров-гинекологов и неонатологов) на этапе курации беременности и сопровождения родов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bucher J., Oualha M., Dupic L., Lebourgeois M., Lesage F., Renolleau S. et al. 312 Outcomes and factors associated with poor outcome of children with cystic fibrosis admitted to the intensive care unit. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2015;14(1):138. DOI: 10.1016/S1569-1993(15)30486-0.
2. Chen Q., Shen Y., Zheng J. A review of cystic fibrosis: basic and clinical aspects. *Animal Model Exp. Med*. 2021;4(3):220–232. DOI: 10.1002/ame2.12180.
3. Shteinberg M., Haq I.J., Polineni D., Davies J.C. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021;397(10290):2195–2211. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32542-3.
4. Клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз)». Союз педиатров России, Ассоциация медицинских генетиков, Российское респираторное общество, Российское трансплантологическое общество, Ассоциация детских врачей Московской области. 2021.
5. Hao S., Roesch E.A., Perez A., Weiner R.L., Henderson L.C., Cummings L. et al. Inactivation of CFTR by CRISPR/Cas9 alters transcriptional regulation of inflammatory pathways and other networks. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2020;19(1):34–39. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.05.003.
6. Elborn J.S. Cystic Fibrosis. *Lancet*. 2016;388(10059):2519–2531. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6.
7. Deschamp A.R., Hatch J.E., Slaven J.E., Gebregziabher N., Storch G., Hall G.L. et al. Early respiratory viral infections in infants with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2019;18(6):844–850. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.02.004.

8. Красовский С.А., Черняк А.В., Амелина Е.Л., Никонова В.С., Воронкова А.Ю., Самойленко В.А. и др. Динамика выживаемости больных муковисцидозом в Москве и Московской области за периоды 1992–2001 и 2002–2011 гг. *Пульмонология*. 2012;(3) 79–86. DOI: 10.18093/0869-0189-2012-03-79-86.
9. Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Старинова М.А., Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л. и др. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2019 год. М.: Медпрактика-М, 2021:68.
10. Khan T.Z., Wagener J.S., Bost T., Martinez J., Accurso F.J., Riches D.W. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151(4):1075–1082. DOI: 10.1164/ajrcm/151.4.1075.
11. Каширская Н.Ю., Красовский С.А., Черняк А.В., Шерман В.Д., Воронкова А.Ю., Шабалова Л.А. и др. Динамика продолжительности жизни больных муковисцидозом, проживающих в Москве, и ее связь с получаемой терапией: ретроспективный анализ за 1993–2013 гг. *Вопросы современной педиатрии*. 2015;14(4):503–508. DOI: 10.15690/vsp.v14.i4.1390.
12. McArdle J.R. Pregnancy in cystic fibrosis. *Clin. Chest. Med.* 2011;32(1):111–120. DOI: 10.1016/j.ccm.2010.10.005.
13. Patel E.M., Swamy G.K., Heine R.P., Kuller J.A., James A.H., Grotegut C.A. Medical and obstetric complications among pregnant women with cystic fibrosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015;212(1):98.E1–E9. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.07.018.
14. Shteinberg M., Taylor-Cousar J.L., Durieu I., Cohen-Cymbarknoh M. Fertility and Pregnancy in Cystic Fibrosis. *Chest*. 2021;160(6):2051–2060. DOI: 10.1016/j.chest.2021.07.024.
15. Reynaud Q., Jablonski C.R., Poupon-Bourdy S., Denis A., Rabilloud M., Lemonnier L. et al. Pregnancy outcome in women with cystic fibrosis and poor pulmonary function. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2020;19(1):80–83. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.06.003.
16. Jaina R., Kazmerski T.M., Zuckerwieser L.C., West N.E., Montemayor K., Aitken M.L. et al. Pregnancy in cystic fibrosis: Review of the literature and expert recommendations. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2021;21(3):1569–1993. DOI: 10.1016/j.jcf.2021.07.019.

Вклад авторов

Тетенева А.В. – разработка концепции статьи, анализ нозологической проблемы. Чернявская Г.М., Скороходова Т.В., Степанов И.А., Карманова А.В., Голубятникова Е.В., Устюжанина Е.А., Варфоломеева И.А., Радионов Д.И., Калюжина Е.В., Романов Д.С., Радионова Е.В. – анализ клинического случая, подбор фактического материала. Беспалова И.Д. – редактирование статьи, взаимодействие с редакцией. Кошавцева Ю.И. – работа со списком литературы, перевод текста статьи.

Информация об авторах

Тетенева Анна Валентиновна – д-р мед. наук, зам. гл. врача по медицинской части, МСЧ № 2; профессор, кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии, СибГМУ, г. Томск, anna.dubodelova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4323-2798>

Чернявская Галина Михайловна – д-р мед. наук, профессор, кафедра госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, СибГМУ, г. Томск, chernyavskayag@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-0105-2307>

Беспалова Инна Давидовна – д-р мед. наук, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии, СибГМУ, г. Томск, innadave@mail2000.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4513-6329>

Скороходова Татьяна Васильевна – канд. мед. наук, зам. гл. врача по клинико-экспертной работе, ОПЦ им. И.Д. Евтушенко; доцент, кафедра акушерства и гинекологии, СибГМУ, г. Томск, itv7@yandex.ru

Устюжанина Елена Анатольевна – канд. мед. наук, зав. пульмонологическим отделением, ТОКБ, г. Томск, u_elan@mail.ru

Варфоломеева Ирина Александровна – врач-пульмонолог, пульмонологическое отделение, ТОКБ, г. Томск, varfolomeeva.irina@lust.ru

Кошавцева Юлия Игоревна – ассистент, кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии, СибГМУ, г. Томск, kossy09@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5260-4832>

Радионов Денис Игоревич – аспирант, кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета, СибГМУ, г. Томск, radionovdenisl2@gmail.com.

Калюжина Елена Викторовна – д-р мед. наук, профессор, кафедра госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, СибГМУ, г. Томск, kalyuzhina.e@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7978-5327>.

Романов Дмитрий Сергеевич – аспирант, кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии, СибГМУ, г. Томск, romanovds92@yandex.ru

Радионова Екатерина Викторовна – ординатор, кафедра общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, г. Томск, Opoldnik@yandex.ru

Степанов Игорь Ардалионович – канд. мед. наук, гл. врач, ОПЦ им. И.Д. Евтушенко, г. Томск, stepanovopc@mail.ru

Карманова Алла Владимировна – канд. мед. наук, зам. гл. врача по акушерско-гинекологической помощи, ОПЦ им. И.Д. Евтушенко, г. Томск, karmanovaav@opc.tomsk.ru

Голубятникова Екатерина Владимировна – врач акушер-гинеколог, ОПЦ им. И.Д. Евтушенко, г. Томск, ketrintomsk@mail.ru

(✉) **Беспалова Инна Давидовна**, innadave@mail2000.ru

Поступила в редакцию 17.05.2022;
одобрена после рецензирования 21.07.2022;
принята к публикации 08.09.2022

К 70-летию со дня рождения академика РАН Евгения Лхамацыреновича Чойнзонова



14 декабря 2022 г. исполнилось 70 лет доктору медицинских наук, профессору, академику РАН, заслуженному деятелю науки, директору НИИ онкологии Томского НИМЦ Евгению Лхамацыреновичу Чойнзонову.

Евгений Лхамацыренович Чойнзонов – выдающийся российский ученый, талантливый организатор, внесший весомый личный вклад в развитие медицинской науки.

Е.Л. Чойнзонов родился в с. Жаргалантуй Бурятской АССР. После окончания лечебного факультета Томского медицинского института в 1976 г. поступил в клиническую ординатуру на кафедру оториноларингологии этого же института.

При открытии Сибирского филиала Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР в г. Томске Е.Л. Чойнзонов был приглашен на должность младшего научного сотрудника отделения опухолей головы и шеи. В 1984 г. он успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Лечение больных раком полости рта и его влияние на показатели системы иммунитета» и был переведен на должность старшего научного сотрудника. После защиты в 1995 г. докторской диссертации на тему «Рак

верхних отделов дыхательного и пищеварительного тракта (эпидемиологические и иммуновирологические аспекты, оценка эффективности лечения)» становится ведущим научным сотрудником этого же отделения НИИ онкологии. В 2002 г. ему присвоено звание профессора по специальности «онкология». С 2002 г. Е.Л. Чойнзонов занимает должность директора НИИ онкологии СО РАМН.

Блестящие организаторские способности, умение определить перспективы развития современной медицинской науки, активная гражданская позиция позволили Е.Л. Чойнзонову консолидировать усилия академических институтов Томского научного центра по объединению в ныне действующий Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИМЦ) в целях достижения прорывных научных результатов, обеспечивающих конкурентные позиции Российской Федерации в биомедицине и их трансляции в здравоохранение. Томский НИМЦ, пост директора которого в 2016–2018 гг. занимал академик Е.Л. Чойнзонов, является одним из самых крупных и авторитетных научных учреждений медицинского профиля в России, интегрирован в мировое научное пространство в таких областях, как онкология, кардиология, детская кардиология, медицинская генетика, фармакология, психиатрия.

Академик Е.Л. Чойнзонов вносит огромный вклад в подготовку биомедицинских кадров высшего звена. В 2006 г. по его инициативе на базе института открыта кафедра онкологии Сибирского государственного медицинского университета, бессменным заведующим которой он является. Евгений Лхамацыренович является председателем диссертационного совета 24.1.215.02 по специальности «3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки)» при НИИ онкологии Томского НИМЦ, входит в состав диссертационного совета 24.1.215.03 по специальности «21.5.7. Генетика (медицинские науки)» при НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Академик Е.Л. Чойнзонов является основателем научной школы «Злокачественные опухоли головы и шеи. Разработка персонифицированных подходов к проведению современных методов лечения и реа-

билитации больных со злокачественными новообразованиями на основе изучения клинико-морфологических и молекулярно-генетических особенностей опухолевого процесса». Среди ее представителей – известные ученые, профессора, занимающие высокие позиции в научно-образовательных и лечебных учреждениях, и молодые специалисты, владеющие современными высокотехнологичными методами научных исследований и лечения пациентов. Под его научным руководством выполнены и защищены 16 докторских и 21 кандидатская диссертации.

Евгений Лхамацыренович является признанным в России лидером в области лечения и реабилитации больных со злокачественными новообразованиями челюстно-лицевой области, одной из самых сложных категорий онкобольных. Еще в 1980-х гг. он начал развивать новое для России направление по реабилитации пациентов с опухолями головы и шеи для сохранения их качества жизни и социально трудовой адаптации. Сейчас НИИ онкологии занимает лидирующие позиции по этому направлению в России, осуществляет помощь пациентам со всего региона Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера.

Совместно с учениками разработаны методики реконструктивных операций с использованием новейших достижений в сфере медицинского материаловедения и аддитивных технологий. Разработаны и внедрены в клиническую практику новые высокотехнологичные методы органосохраняющих и реконструктивно-пластических оперативных вмешательств с использованием микрохирургической техники и биосовместимых имплантатов, что позволяет обеспечить высокое качество жизни пациентов, их способность к трудовой деятельности и социальную адаптацию. Разработана уникальная технология создания искусственных индивидуальных имплантатов с функционализированной поверхностью, способных к высокой интеграции с костными и мягкими тканями организма.

Предложенные технологии обеспечивают снижение инвалидизации, повышение качества жизни пациентов, их социально-трудовую адаптацию, возвращая к полноценной жизни более 70% пациентов.

Е.Л. Чойнзонов внес огромный вклад в развитие практического здравоохранения, осуществляя научно-методическое руководство лечебно-профилактическими учреждениями Сибирского федерального округа по вопросам онкологии и активно внедряя передовые научные разработки в практику здравоохранения региона. Является высококлассным специалистом в онкохирургии и признанным лидером в России в области лечения опухолей сложных локализаций с высокой социальной значимостью, ак-

тивно оперирующим онкологом высшей категории. На его личном счету около 3 тыс. оперативных вмешательств. Наиболее сложные операции по профилю выполняются им лично, самые тяжелые больные проходят лечение под его личным контролем.

Им внедрены в клиническую практику уникальные хирургические вмешательства с использованием одномоментного замещения послеоперационных дефектов эндопротезами из пористого никелида титана и микрохирургической аутотрансплантацией тканей, что снимает необходимость повторной операции. Созданы и транслированы в клинику новые подходы к лечению рака щитовидной, околоушной желез, полости носа и околоносовых пазух на основе органосохраняющих операций в сочетании с интраоперационной электронной и дистанционной нейтронной терапией.

Огромный оригинальный фактический материал, накопленный за многие годы интенсивной научной работы, обобщен в 27 монографиях, 1 пособии для врачей, 1 методическом пособии, 7 клинических рекомендациях. Приоритетность исследований подтверждается 53 российскими патентами на изобретения, 25 свидетельствами о государственной регистрации программных продуктов, 5 лицензионными соглашениями о предоставлении права использования патентов. Он является автором более 1 000 печатных трудов, около 350 российских и зарубежных статей, индексируемых в российской и зарубежных базах цитирования РИНЦ, Scopus, Web of Science.

Будучи одним из ведущих онкологов России, Евгений Лхамацыренович активно участвует в издательской деятельности многих российских и зарубежных научных журналов. Он является главным редактором «Сибирского онкологического журнала», членом редколлегии журналов: «Онкология. Журнал имени П.А. Герцена», «Вопросы онкологии», «Онкохирургия», «Опухоли головы и шеи», «Сибирский научный медицинский журнал», «Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины»; членом редакционного совета журналов: «Annals of Oncology, Новые подходы в онкологии», «Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи», «Голова и шея», «Евразийский онкологический журнал», «Онкологический журнал», «Креативная хирургия и онкология», «Территория интеллекта», «CA: A Cancer Journal for Clinicians. Русское издание».

Академик Е.Л. Чойнзонов входит в состав Президиума РАН, является членом Совета РАН по эволюционной медицине и медицинскому наследию, экспертом РАН, членом Президиума Ассоциации онкологов России, Совета по приоритетному направлению научно-технологического развития Российской Федерации «Переход к персонализиро-

рованной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)», заместителем председателя проблемной комиссии «Опухоли головы и шеи» Научного совета по злокачественным новообразованиям РФ, председателем Проблемной комиссии «Онкология» Научного совета по медицинским проблемам Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера РФ, членом комиссии при губернаторе Томской области по мониторингу достижения Томской областью целевых значений показателей социально-экономического развития, определенных президентом Российской Федерации; главным внештатным специалистом онкологом Сибирского федерального округа, председателем Томского областного общества онкологов, представителем Российской Федерации в Международной федерации специалистов по опухолям головы и шеи (IFHNOS, USA) и Евразийского сообщества специалистов по опухолям головы и шеи, входит в состав Координационного Совета (Совета директоров) Томского НИМЦ, ученого совета Томского НИМЦ, является председателем ученого совета НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Под руководством академика Е.Л. Чойнзонава выполнено 10 проектов в рамках федеральных целевых программ (2006–2007, 2010–2012, 2016), 6 грантов РФФИ (2008–2015), интеграционного проекта СО РАМН (2006–2007), гранта Администрации Томской области (2008), 3 крупных гранта РНФ (2016–2018, 2019–2021, 2022–2024), проекта в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (2017–2019), 2 проектов ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (2017–2019, 2019–2020).

Многолетняя плодотворная научная, научно-организаторская и педагогическая деятельность Евгения Лхамациреновича получила высокую оценку и признание. Он удостоен звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации». В 2021 г. Евгений Лхамациренович с коллективом авторов стал лауреатом Государственной премии Российской Федерации в области науки и технологий 2020 г. за создание фундаментального междисциплинарного биомедицинского подхода к лечению, реконструкции и реабилитации при опухолях органов головы и шеи. Он является лауреатом премии Томской обла-

сти в сфере образования, науки, здравоохранения и культуры (2012). Награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (2015), нагрудным знаком «Отличник здравоохранения» (2004), юбилейной медалью «400 лет городу Томску» (2004), Почетной грамотой Государственной думы Томской области (2004), Почетной медалью Р. Вирхова (2005), Почетной грамотой профсоюза работников здравоохранения Российской Федерации (2009), медалью «За заслуги перед Сибирским медицинским университетом» (2011), благодарностью Департамента здравоохранения Томской области (2011), Почетной грамотой Томской области (2012), Почетной грамотой Российской академии медицинских наук (2012), серебряным знаком «Герб Томской области» (2012), почетным серебряным орденом «Общественное признание» (2012), нагрудным знаком Федерации независимых профсоюзов России «За содружество» (2012), медалью «За достижения» (2014), Почетной грамотой администрации города Томска (2014), юбилейной медалью «120 лет ТПУ» (2016), почетным званием «Заслуженный ветеран Сибирского отделения РАН» (2017), знаком отличия ФАНО России «За заслуги в развитии науки» (2017), почетным знаком «Гордость Томска» (2017), знаком отличия «За заслуги перед Томской областью» (2017), Почетной грамотой Совета Федерации Федерального Собрания Российской Федерации (2017), грамотой Томской городской палаты общественности (2017), Почетной грамотой ФАНО России (2018), юбилейным памятным знаком «Законодательная дума Томской области. 25 лет» (2019), юбилейным знаком «75 лет Томской области» (2019); занесен в Книгу почета Федерации профсоюзных организаций Томской области (2013); удостоен звания кавалера золотого почетного знака «Достояние Сибири» (2016) и звания «Почетный профессор Сибирского государственного медицинского университета» (2017); поощрен благодарностью Президента Российской Федерации, благодарностями руководителя народного штаба общественной поддержки кандидата в президенты Российской Федерации и полномочного представителя президента Российской Федерации в Сибирском федеральном округе (2012), благодарностью Совета ректоров вузов Томской области (2019). Награжден медалью «За выдающиеся заслуги в онкологии» имени основателя отечественной онкологии профессора Н.Н. Петрова (2021), медалью имени П.А. Герцена за особо выдающиеся заслуги в развитии онкологии (2022). Удостоен звания «Почетный гражданин Томской области» (2022).

**А**

Абрамов Ю.И.	3
Агеев Ю.И.	1
Агеева А.А.	1
Агеева Т.С.	2
Айдагулова С.В.	1
Александров Г.О.	1
Алифорова В.М.	4
Анашбаев Ж.Ж.	3
Андреев С.Л.	3
Андреевская И.А.	2
Ардаширов М.М.	2
Арчаков Е.А.	2
Афанасьев С.А.	2
Афанасьева О.Г.	1

Б

Бабушкина Н.П.	4
Балабанова А.А.	1, 4
Бандовкина В.А.	2, 3
Барденштейн Л.М.	2
Барило А.А.	2
Баталов Р.Е.	2
Баторов Е.В.	3
Бахарева Ю.С.	1
Бахтин В.М.	3
Белоконова Н.А.	3
Белоусов М.В.	4
Березикова Е.Н.	4
Беспалова И.Д.	1, 2, 3, 4
Бикбавова Г.Р.	1
Бирулина Ю.Г.	3, 4
Благосклонов Н.А.	2
Блинова Е.А.	1
Бодня В.Н.	1
Борзых О.Б.	3
Брагина Е.Ю.	4
Брагина О.Д.	3, 4
Братишко К.А.	4
Буйко Е.Е.	3, 4
Букреева Е.Б.	2
Булычев П.В.	2
Бурда С.Ю.	1
Бурда Ю.Е.	1
Бутолин Е.Г.	1
Быков А.С.	2
Быков В.В.	1, 3
Быкова А.В.	1

В

Вавилова Т.В.	3
Валиахметов Н.Р.	3
Варакута Е.Ю.	4
Васильева И.С.	4
Васильева С.Н.	1, 3
Вазик-Городецкая М.В.	4
Вдовин В.М.	4
Венгеровский А.И.	1
Веревкин Е.Г.	2
Веснина Ж.В.	3
Воевода М.И.	1
Волкова А.В.	2, 3
Волкодав О.В.	1
Воронкова О.В.	4

Г

Гайковая Л.Б.	2
Галкин С.А.	3
Гальченко А.С.	2
Гарбузенко Д.В.	3
Гарганеева А.А.	2
Гарганеева Н.П.	2, 3
Гвалдин Д.Ю.	4
Гельцер Б.И.	1
Герасимова В.И.	3
Гилева О.Г.	1
Гирш Я.В.	1
Гладкова Е.В.	2
Гойко В.Л.	3
Голубенко М.В.	3
Голубинская П.А.	1
Голубятникова Е.В.	4
Гомбоева Д.Е.	4
Гончарова А.С.	3, 4
Горелова Ю.В.	2, 3
Горяинова А.Ю.	1
Гракова Е.В.	1, 2, 3, 4
Грачев А.Н.	3
Гребенкина Л.А.	2
Григорьев П.Е.	2
Григорьева А.В.	3, 4
Гудкова Е.С.	4
Гусаков Е.А.	2
Гусакова А.М.	4
Гусакова С.В.	3

Д

Давыдова Е.В.	1
Дадали В.А.	2
Даренская М.А.	2
Дворниченко М.В.	4
Деев И.А.	1
Деев С.М.	3, 4
Демикова Н.С.	2
Демина Д.В.	1
Демко И.В.	3
Демура А.Ю.	2
Денисенко О.А.	3
Дзюман А.Н.	3, 4
Диш А.Ю.	1
Дмитриева Е.В.	2
Добнер С.Ю.	3
Довжикова И.В.	2
Долгушин И.И.	1
Дьякова М.Е.	4

Е

Егоров Г.Ю.	3, 4
Енгибарян М.А.	2
Ермаков А.И.	2
Есимова И.Е.	4

Ж

Жданов В.В.	1
Жиркова А.М.	4

З

Завадовская В.Д.	3, 4
Завадовский К.В.	4
Заикина Е.В.	3
Зайцева А.А.	2
Замышевская М.А.	3
Захватов А.Н.	1, 4
Зиганшин О.Р.	1
Зима А.П.	4
Зиновьева Ю.М.	2
Зинченко С.А.	1
Златник Е.Ю.	3
Зоркальцев М.А.	2, 3
Зуева Е.П.	1
Зыкова М.В.	4

И

Иванов В.В.	3, 4
Иванова А.А.	1
Иванова В.В.	4
Иванова Е.А.	4
Иванова С.А.	3
Изможерова Н.В.	3
Инёшина А.Д.	2
Исубакова Д.С.	4
Ишутина Н.Н.	2

К

Кабельо М.Ф.Э.	4
Казимирский А.Н.	2
Казмерчук О.В.	3
Кайгородцева Н.В.	1
Каймакчи О.Ю.	4
Калюжин В.В.	1, 2, 3, 4
Калюжин О.В.	2
Калюжина Е.В.	2, 3, 4
Канев А.Ф.	1
Каплиева И.В.	2, 3
Караулов А.В.	2
Карманова А.В.	4
Карнаушкина М.А.	4
Карпов Р.С.	1
Карпова Е.И.	3
Кацер А.Б.	3
Каштанова Е.В.	2, 4
Киблицкая А.А.	3
Кирюхина Л.Д.	4
Киселева Е.А.	1
Кит О.И.	2
Кит С.О.	4
Климов А.В.	2
Климов В.В.	2
Кобалава Ж.Д.	4
Кобринский Б.А.	2
Кобякова О.С.	1
Ковалева О.В.	3
Козлов В.А.	1
Козлова Д.И.	3
Колесников В.Е.	2
Колесников Е.Н.	4
Колесников С.И.	2
Колесникова Л.И.	2
Колобовникова Ю.В.	4
Кологривова И.В.	2
Комарова Е.Ф.	2
Кондратьева Д.С.	2
Кононова Т.Е.	3

Копьева К.В.	1, 2, 3, 4
Корнетов А.Н.	2, 3
Корнетова Е.Г.	3
Корокин М.В.	1
Королькова А.А.	3
Корчагин В.И.	4
Коталевская Ю.Ю.	2
Котельников В.Н.	1
Котиева И.М.	2, 3
Кошкарова Н.С.	2
Кошавцева Ю.И.	1, 4
Крапошина А.Ю.	3
Кривоногов Н.Г.	3
Крылова С.Г.	1
Кудревич Ю.В.	1
Кузнецова Е.К.	1
Кузнецова М.В.	4
Кузьмина О.Ю.	2
Кулагина Д.А.	1
Куликов Е.С.	1
Кульпин П.В.	1
Кунцевич А.К.	2
Куражов А.П.	4
Курбанова Л.З.	4
Курбатов Б.К.	3, 4
Кургузов А.В.	4
Кутепова О.Л.	2
Кутяков В.А.	4
Кухарчик Г.А.	2
Кучер А.Н.	3
Кушлинский Н.Е.	3

Л

Лазутин Ю.Н.	2
Ларина В.Н.	2
Лебедева Е.В.	1, 3
Лебедева Н.Б.	1
Лебеденко А.А.	3
Леонова М.И.	1
Леплина О.Ю.	3
Ливзан М.А.	1
Лившиц И.К.	2
Литвинова М.М.	4
Литвяков Н.В.	4
Лобанова О.А.	2
Логвинов С.В.	3, 4
Логвинова Л.А.	4
Лойко Ю.Н.	3
Лопатина К.А.	1
Лукбанова Е.А.	2, 3
Лычковская Е.В.	4
Лямец Л.Л.	2

М

Макаренко Т.А.	4
Макарова А.Е.	1
Максимов А.Ю.	3, 4
Максимов В.Н.	1
Малиновская Н.А.	4
Мальцев С.В.	3
Мальцева А.Н.	4
Маслов Л.Н.	3
Маслянский А.Л.	3
Медведева Н.Н.	4
Меликян Л.П.	2
Мещеряков А.А.	1
Мильто И.В.	4
Миндарь М.В.	2
Минкин В.И.	2
Миронов К.О.	4
Михайлова А.А.	3
Момот А.П.	4
Морозов К.Р.	4
Морозова М.И.	2, 3
Мотлохова Е.А.	4
Мотов В.С.	1
Мочула А.В.	4
Мурадян Г.А.	4
Мурашко Р.А.	1
Мурашов И.С.	4
Мусина Н.Н.	3
Муслимова Э.Ф.	2
Мустафина Л.Р.	3, 4
Мустафина С.В.	2
Мягков М.Г.	3

Н

Надеждин С.В.	1
Назаренко М.С.	3, 4
Найденко Д.Г.	3
Налесник Е.О.	1
Нарыжная Н.В.	3, 4
Насырова Р.Ф.	3
Невская К.В.	3, 4
Немашкалова Л.А.	2
Непомнящая Е.М.	3, 4
Непомнящих В.М.	1
Нескубина И.В.	2, 3
Нестерец А.М.	1
Нестерова Ю.В.	1
Неупокоева М.Н.	4
Никитина М.А.	4
Никитина О.А.	2
Николаев К.Ю.	2
Николаев Ю.А.	1

Николаева Е.А.2
 Нонка Т.Г.1, 3
 Носарев А.В.3
 Нуртазина А.Ю.2

О

Осиков М.В.1
 Осипова Н.Н.2
 Осихов И.А.4
 Останко В.Л.2

П

Павленко О.А.3
 Павлюкова Е.Н.3
 Панина М.И.2
 Паршина А.Ю.4
 Пасман Н.М.3
 Патышева М.Р.4
 Пашкина Е.А.1
 Перевертов Т.А.4
 Перминова И.В.4
 Першина А.Г.4
 Петров В.А.3
 Петрова М.М.3
 Поветьева Т.Н.1
 Погорелова Ю.А.2, 3
 Подлесная П.А.3
 Полонская Я.В.2, 4
 Поляков В.Я.1
 Понежева Л.О.2
 Попова А.А.4
 Попова А.В.4
 Поровский Я.В.1
 Порханов В.А.1
 Порядин Г.В.1, 2, 4
 Поскотинова Л.В.2
 Потапов А.В.4
 Потапов К.В.3
 Потеев Н.Н.3
 Приходько Н.Г.2
 Пузанов М.В.1

Р

Рабцевич Е.С.4
 Рагино Ю.И.2, 4
 Радионов Д.И.4
 Радионова Е.В.4
 Ратушняк Е.Т.4
 Ребров А.П.2
 Репин А.Н.1, 3
 Родионов Е.О.3

Романов Д.С.4
 Романюк А.Е.1
 Рублев В.Ю.1
 Рыжих А.А.2
 Рымар О.Д.2

С

Садовский Е.В.4
 Сазонова С.И.3
 Салахов Р.Р.3
 Салмаси Ж.М.2
 Салмин В.В.4
 Салмина А.Б.4
 Самарина Д.В.1
 Самыкина И.А.3
 Саприна Т.В.2, 3
 Сарычева М.В.1
 Сафарова А.Ф.4
 Сафарова К.Н.2
 Саяпин Ю.А.2
 Сваровская А.В.2
 Свиридов Ф.С.4
 Свиридова В.С.2
 Севостьянова Е.В.1
 Селиванова И.А.1
 Семенова Н.В.2
 Семичев Е.В.4
 Семке А.В.3
 Сергеев Е.А.1
 Сердюков Н.А.3
 Серебрякова О.Н.4
 Серебряная Н.Б.4
 Сизякина Л.П.3
 Симонова Г.И.2
 Симуткин Г.Г.3
 Синицкий А.И.1
 Ситковская А.О.2
 Скороходова Т.В.4
 Сметаненко Е.А.3
 Смирнова С.В.2
 Снежко А.В.4
 Собко Е.А.3
 Солдатенко М.В.1
 Сорокина Т.В.1
 Старовойтова Е.А.3
 Стахнёва Е.М.2, 4
 Степанов И.А.4
 Стилиди И.С.3
 Стрюкова Е.В.4
 Стукань А.И.1
 Сулейманов Э.А.3
 Сурикова Е.И.2, 3

Суровцева А.К.1
 Суслов Н.И.1
 Суслора Т.Е.1, 2
 Суходоло И.В.4
 Счастный Е.Д.1
 Сысолятин С.В.1
 Сюткина И.П.2

Т

Талибуллин И.В.1
 Тальдаев А.Х.1
 Тахауов Р.М.4
 Таширева Л.А.4
 Тепляков А.Т.1, 2, 3
 Терентьева Н.Н.2, 3
 Терехов Р.П.1
 Терещенко М.В.1
 Тетенева А.В.3, 4
 Тигай Ж.Г.4
 Тигунцев В.В.3
 Тимофеева Т.М.4
 Тихонова М.А.3
 Толмачев В.М.3, 4
 Трепитаки Л.К.2, 3
 Трубачева О.А.2
 Тузиков С.А.3
 Турапова А.Н.2
 Тьюфилин Д.С.1

У

Удодов В.Д.2, 3
 Уразова О.И.3, 4
 Усов В.Ю.2, 3
 Усова Т.В.4
 Устюжанина Е.А.4
 Уфандеев А.А.4

Ф

Федоренко О.Ю.3
 Федосенко С.В.3
 Федотов Э.А.2
 Филиппова С.Ю.2
 Франциянц Е.М.2, 3

Х

Хабаров Д.В.2
 Харламова О.С.2
 Хачатрян В.А.1
 Хижа В.В.3
 Ходакова Д.В.2, 4
 Хонина Н.А.3

Ц

Царапаев П.В.	3
Цымбал О.С.	4
Цыпленкова М.Ю.	4

Ч

Чапаева Н.Н.	1
Часовских Н.Ю.	4
Чевкина Е.М.	3
Чекишева Т.Н.	4
Чернов В.И.	3, 4
Черных Е.Р.	3
Чернышов Н.А.	4
Чернявская Г.М.	4
Чернявский А.М.	4
Черярина Н.Д.	2, 3
Чижик Е.Е.	4
Чугунова Е.В.	2

Чумакова С.П.	3, 4
Чурина Е.Г.	4
Чуяшенко Е.В.	1

Ш

Шапошников А.В.	2
Шаров С.В.	1
Шатрова Ю.М.	1
Шахматов И.И.	4
Шевченко А.Н.	4
Шейко Е.А.	2
Шестаков А.В.	3
Шилов С.Н.	4
Шипулин В.В.	4
Шипулин В.М.	3
Шнайдер Н.А.	3
Шперлинг И.А.	2

Шперлинг Н.В.	2
Шрамко В.С.	2, 4
Шулепов А.В.	2
Шульга О.С.	1

Щ

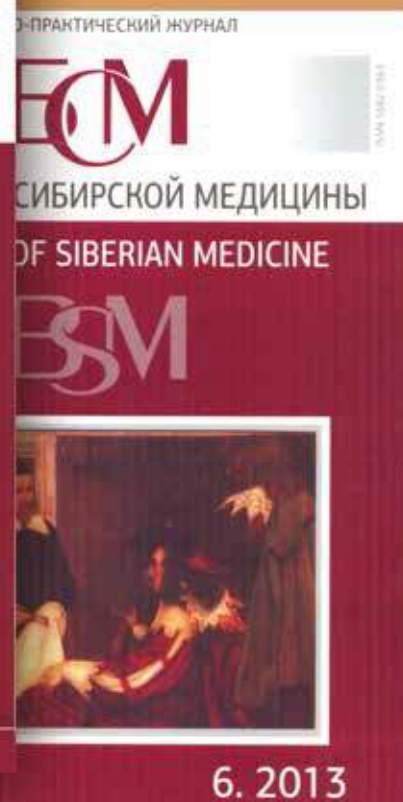
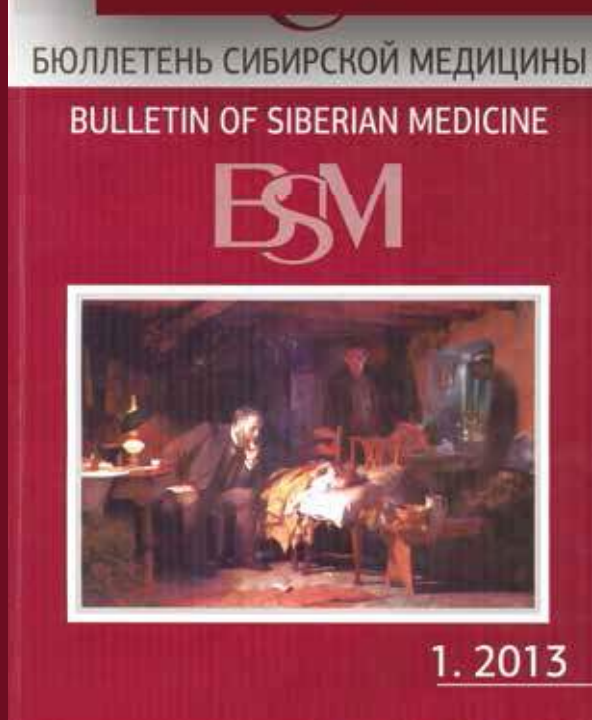
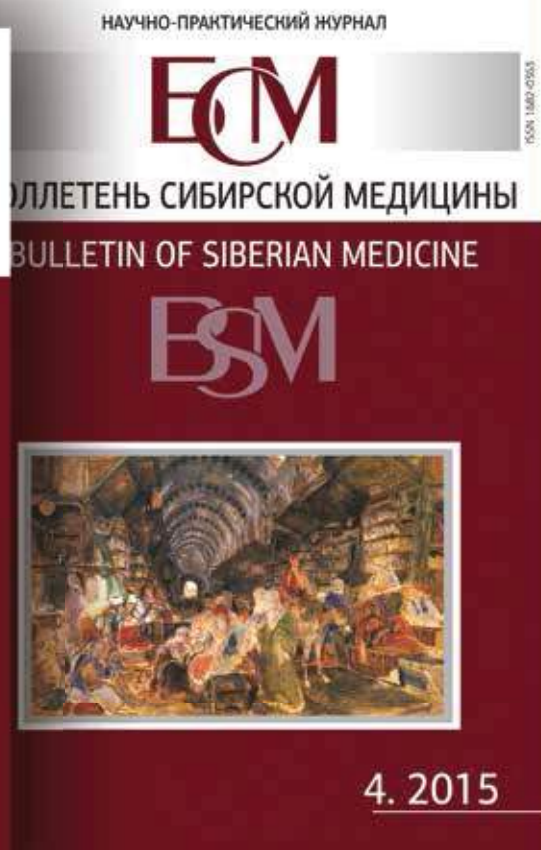
Щербакова Л.В.	2
Щетинина А.О.	2

Э

Эпова А.С.	4
Эсмедляева Д.С.	4

Я

Яблонский П.К.	4
Якимова К.А.	1
Яровой Н.Д.	3

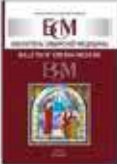


20 ЛЕТ ЖУРНАЛУ «БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ»

ISSN PRINT: 1682-0363 ISSN ONLINE: 1819-3684
Бюллетень сибирской медицины
Bulletin of Siberian Medicine
bulletin ENG / РУС

БМ
Бюллетень сибирской медицины
Расширенный поиск

ГЛАВНАЯ О ЖУРНАЛЕ МОЙ КАБИНЕТ ПОИСК СВЕЖИЙ НОМЕР АРХИВ НОВОСТИ АРХИВ 2007-2011



Научно-практический рецензируемый журнал
Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Бюллетень сибирской»

«Бюллетень сибирской медицины» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты научных исследований, ориентированных на разработку передовых медицинских технологий. С целью объединения научной медицинской общности, 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 бионженерия,
- 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 — член корреспондент РАН О.И. Уразова.

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 традиции первых медицинских журналов, на

Отправить статью
Правила для авторов
Редакционная коллегия
Рецензирование
Этика публикаций

ПОПУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ
Свержение интратанальной камеры глаза и
вскрытие после физической нагрузки различного
характера
Том 16, № 2 (2017)



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР
Уразова О.И.

ОБЛАКО ТЕГОВ
адаптация артериальной гипертензии
бронхиальная астма воспаление дету

