

# БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал  
Выходит 5 раз в год

**Том 15, № 5, 2016**

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

## 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 издается при поддержке  
ТРОО «Академия доказательной медицины»

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

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

Оригинал-макет:  
Издательство СибГМУ.  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.  
Редактор Е.Е. Степанова  
Электронная верстка, дизайн обложки  
А.Д. Кривцова

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

Подписано в печать 21.12.2016 г.  
Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.  
Бумага мелованная. Гарнитура «Мысль».  
Печ. л. 24,75. Усл. печ. л. 23,0.  
Тираж 500 экз. Заказ 609.

Цена — свободная.  
Дата выхода в свет 26.12.2016.

Подписка по каталогу «Роспечать» в любом  
отделении почты России, подписной индекс 46319

При перепечатке ссылка на  
«Бюллетень сибирской медицины» обязательна

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

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Новицкий, *академик РАН* (Томск)

## ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

## НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

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

## РЕДКОЛЛЕГИЯ:

В.М. Алифирова, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)  
А.И. Афтанас, *академик РАН* (Новосибирск)  
А.Н. Байков, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)  
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)  
А.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. Киселёв, *член-корреспондент РАН* (Барнаул)  
Н.А. Корнетов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)  
С.В. Логвинов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)  
А.Д. Макацария, *член-корреспондент РАН* (Москва)  
А.С. Намазова-Баранова, *академик РАН* (Москва)  
С.А. Некрылов, *профессор, д-р ист. наук* (Томск)  
В.П. Пузырёв, *академик РАН* (Томск)  
В.Ю. Серебров, *профессор, д-р мед. наук* (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.И. Уразова, *член-корреспондент РАН* (Томск)  
О.С. Фёдорова, *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)  
Г.С. Якобсон, *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)  
S. Orlov, *профессор* (Канада)  
M. Poyurovsky, *профессор* (Израиль)  
V. Zhdankin, *профессор* (США)

# BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

Peer-reviewed scientific-practical journal  
Issued five times yearly

**Volume 15, No. 5, 2016**

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

## FOUNDER AND PUBLISHER:

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

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

The journal is published supported  
by Tomsk Regional Organization «Academy  
of Evidence-based Medicine»

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

Bulletin of Siberian Medicine is indexed:  
Web of Science (WoS (ESCI))  
Sciens 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@bulletin.tomsk.ru](mailto:bulletin@bulletin.tomsk.ru)

Publisher by the Siberian State Medical  
University.  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050,  
Russian Federation.  
Editor E.E. Stepanova  
Electronic makeup, covering design  
L.D. Krivtsova

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

Signed to print 21.12.2016  
Format 60 X 84/8. Offset print.  
Coated paper. Mysl' font.  
P.l. 24,75. C.p.l. 23,0.  
500 copies. Odder no. 609.

The price – free.  
Data of publication 26.12.2016.

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

## EDITOR-IN-CHIEF

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

## DEPUTY-EDITOR-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.N. Baikov, *Professor (Tomsk)*  
A.A. Baranov, *Academician of RAS (Moscow)*  
A.I. Vengerovsky, *Professor (Tomsk)*  
Ye.G. Grigoriyev, *Associate Member of RAS (Irkutsk)*  
A.M. Dygai, *Academician of RAS (Tomsk)*  
M.V. Zav'yalova, *Professor (Tomsk)*  
L.V. Kapilevich, *Professor (Tomsk)*  
S.I. Karas, *Professor (Tomsk)*  
R.S. Karpov, *Academician of RAS (Tomsk)*  
V.I. Kiselyov, *Corresponding Member of RAS (Barnaul)*  
A.N. Kornetov, *Professor (Tomsk)*  
S.V. Logvinov, *Professor (Tomsk)*  
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.Yu. Serebrov, *Professor (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.I. Urazova, *Associate Member of RAS (Tomsk)*  
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)*  
G.S. Yakobson, *Academician of RAS (Novosibirsk)*  
M.S. Yusebov, *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)*  
S. Orlov, *Professor (Canada)*  
M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*  
V. Zhdankin, *Professor (USA)*

| ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | ORIGINAL ARTICLES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Белоусова Т.В., Маринкин И.О.,<br>Плюшкин В.А., Леонова А.А.<br>Взаимосвязи в системе мать – плацента – ребенок при<br>состоянии тромбофилитической готовности и гематогенных<br>тромбофилиях                                                                                                                               | Belousova T.V., Marinkin I.O.,<br>Plyushkin V.A., Leonova A.A.<br>The relationship in the mother-placenta-child with hema-<br>togenous thrombophilia and thrombotic state of readiness                                                                                                                                                        |
| Дружинина Т.В., Талалаев С.Я., Закиров Н.П., Щаденко С.В.,<br>Хабибуллин Ш.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.<br>Клеточные реакции на трехмерные матрицы<br>из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, получен-<br>ные методом 3D-печати                                                                                       | Druzhinina T.V., Talalaev S.Ya., Zakirov N.P., Shchadenko S.V.,<br>Khabibulin Sh.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S.<br>Cellular reactions on three-dimensional matrices of poly-<br>lactide acid and hydroxyapatite prepared by 3D-printing                                                                                                     |
| Кабанец Н.Н., Филинчук О.В., Уразова О.И.,<br>Морозова К.С., Колоколова О.В.<br>Сравнительная оценка эффективности иммунологиче-<br>ских тестов у детей из групп риска в Томской области                                                                                                                                    | Kabanets N.N., Filinyuk O.V., Urazova O.I.,<br>Morozova K.S., Kolokolova O.V.<br>Comparative evaluation of immunological tests for at-risk<br>children in Tomsk Region                                                                                                                                                                        |
| Колмогоров В.Г., Коновалов В.К.,<br>Леонов С.А., Лобанов М.Н.<br>Роль прицельных 3D-реконструкций при анализе качест-<br>венных характеристик поверхности шаровидных обра-<br>зований легких                                                                                                                                | Kolmogorov V.G., Konovalov V.K.,<br>Leonov S.A., Lobanov M.N.<br>Role sighting 3D-reconstructions analysis of qualitative<br>characteristics of the surface nodular form lungs                                                                                                                                                                |
| Комлева Ю.К., Горина Я.В., Черных А.И., Лопатина О.Л.,<br>Шабалова А.А., Труфанова Л.В., Оловьянникова Р.Я.,<br>Ендржевская-Шурыгина В.Ю., Салмина А.Б.<br>Особенности пролиферации и миграции клеток<br>головного мозга при когнитивном тренинге животных<br>с экспериментальной болезнью Альцгеймера                      | Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Chernykh A.I., Lopatina O.L.,<br>Shabalova A.A., Trufanova L.V., Olovyannikova R.Ya.,<br>Endrzhhevskaya-Shurygina V.Yu., Salmina A.B.<br>Characteristics of brain cell proliferation and migration in<br>animals with experimental Alzheimer's disease undergoing<br>cognitive training                          |
| Кострюкова Е.С., Алифорова В.М., Жукова Н.Г.,<br>Жукова И.А., Ижболдина О.П., Петров В.А., Миронова Ю.С.,<br>Латыпова А.В., Никитина М.А., Титова М.А., Тяхт А.В.,<br>Дорофеева Ю.Б., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э.<br>Обонятельная дисфункция и изменение микробиоты<br>как ранние немоторные проявления болезни Паркинсона | Kostryukova E.S., Alifirova V.M., Zhukova N.G.,<br>Zhukova I.A., Izboldina O.P., Petrov V.A., Mironova Yu.S.,<br>Latypova A.V., Nikitina M.A., Titova M.A., Tyakht A.V.,<br>Dorofeeva Yu.B., Saltykova I.V., Sazonov A.E.<br>Olfaction dysfunction and modification of microbiota<br>as early non-motor manifestations of Parkinson's disease |
| Кулакова К.В., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н.<br>Совместное использование разработанных коллаген-<br>содержащих комплексов и культуры клеток<br>для создания новых тканевых эквивалентов                                                                                                                                       | Kulakova K.V., Aleynik D.Ya., Charykova I.N.<br>Joint use of developed collagen-containing complexes and<br>cell cultures in creating new tissue equivalents                                                                                                                                                                                  |
| Марусин А.В., Корнетов А.Н., Сваровская М.Г.,<br>Вагайцева К.В., Павленчук Е.С., Степанов В.А.<br>Ассоциация генов подверженности к алкоголизму,<br>шизофрении и болезни Альцгеймера с психодиагности-<br>ческими признаками в популяции русских                                                                            | Marusin A.V., Kornetov A.N., Swarovskaya M.G.,<br>Vagaitseva K.V., Pavlenyuk E.S., Stepanov V.A.<br>Genetic predisposition to alcoholism, schizophrenia<br>and Alzheimer's disease with psychodiagnostic<br>characteristics in russian population                                                                                             |
| Мустафина Л.Р., Журавлева А.Д., Логвинов С.В., Карпова М.Р.,<br>Ласукова Т.В., Суханова Г.А., Ильинских Н.Н.<br>Морфология экзоорбитальных слезных желез беспо-<br>родных белых крыс при высокоинтенсивном световом<br>воздействии                                                                                          | Mustafina L.R., Zburavleva A.D., Logvinov S.V., Karpova M.R.,<br>Lasukova T.V., Sukhanova G.A., Ilinskich N.N.<br>Morphology of exorbital lacrimal glands of not purebred<br>white rats at high-intensity light influence                                                                                                                     |
| Орлов С.Н., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Рыдченко В.С.,<br>Бирулина Ю.Г., Байков А.Н., Васильев В.Н.,<br>Суханова Г.А., Федорова Т.С., Ласукова Т.В.<br>Роль калиевой проводимости мембраны в механизмах<br>действия внеклеточного АТФ на сократительную ак-<br>тивность сосудистых гладкомышечных клеток                   | Orlov S.N., Gusakova S.V., Smaglyi L.V., Rydchenko V.S.,<br>Birulina Yu.G., Baikov A.N., Vasiliyev V.N.,<br>Sukhanova G.A., Fedorova T.S., Lasukova T.V.<br>Role of potassium conductance in mechanisms of extra-<br>cellular ATP action on smooth muscle cells contractile<br>activity                                                       |

Петров В.А., Алифиров В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Алтухов И.А., Кострюкова Е.С., Титова М.А., Миронова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Перевозчикова Т.В., Файт Е.А., Сазонов А.Э.

Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях

Титова О.Н., Кузубова Н.А., Волчков В.А., Козырев А.Г., Гичкин А.Ю., Скляр Д.Б.

Функциональное состояние диафрагмы у больных хронической обструктивной болезнью легких на фоне проведения длительной кислородотерапии

Тяхт А.В., Алифиров В.М., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Латыпова А.В., Миронова Ю.С., Петров В.А., Ижболдина О.П., Титова М.А., Никитина М.А., Кострюкова Е.С., Дорофеева Ю.Б., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э.

Связана ли микрофлора кишечника с болезнью Паркинсона?

Федорова О.С., Ковширина Ю.В., Ковширина А.Е., Федотова М.М., Деев И.А., Петровский Ф.И., Филимонов А.В., Дмитриева А.И., Кудяков Л.А., Салтыкова И.В., Михалев Е.В., Одерматт П., Огородова Л.М.

Анализ заболеваемости инвазией *Opisthorchis felinus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы в Российской Федерации

Федосенко С.В., Карнаушкина М.А., Огородова Л.М., Петров В.А., Деев И.А., Куликов Е.С., Сазонов А.Э.

Влияние курсового назначения системных глюкокортикостероидов при обострении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких на состав респираторной микробиоты в стабильный период

## ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Филинчук О.В., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И.

Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких

## СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Валикова Т.А., Алифиров В.М., Королева Е.С., Филимонова М.Н., Пугаченко Н.В.

Синдром Коуден – фактор риска развития ишемического инсульта

Слизовский Г.В., Кужеливский И.И., Ситко Л.А., Аникина Е.Ю.

Туннелизация шейки бедренной кости с регенеративным криовоздействием на очаг некроза при болезни Легга – Кальве – Пертеса у детей

## ЗНАЧИМЫЕ СОБЫТИЯ И РОЛЬ ЛИЧНОСТИ В ИСТОРИИ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ

Карпов Р.С.

Воспоминания об учителе (к 120-летию со дня рождения академика АМН СССР Д.Д. Яблокова)

Указатель статей и кратких сообщений, опубликованных в журнале «Бюллетень сибирской медицины» за 2016 г.

Именной указатель 15-го тома

Petrov V.A., Alifirova V.M., Saltykova I.V., Zbukova I.A., Zbukova N.G., Dorofeeva Yu.B., Tyakht A.V., Altukhov I.A., Kostryukova E.S., Titova M.A., Mironova Yu.S., Izboldina O.P., Nikitina M.A., Perevozchikova T.V., Fait E.A., Sazonov A.E.

Comparison study of gut microbiota in case of Parkinson's disease and other neurological disorders

Titova O.N., Kuzubova N.A., Volchikov V.A., Kozirev A.G., Gichkin A.Yu., Skljarov D.B.

Functional state of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease on long-term oxygen therapy

Tyakht A.V., Alifirova V.M., Zbukova N.G., Zbukova I.A., Latypova A.V., Izboldina O.P., Petrov V.A., Mironova Yu.S., Titova M.A., Nikitina M.A., Kostryukova E.S., Dorofeeva Yu.B., Saltykova I.V., Sazonov A.E.

Is gut microbiota associated with Parkinson's disease?

Fedorova O.S., Kovshirina Y.V., Kovshirina A.E., Fedotova M.M., Deev I.A., Petrovskiy F.I., Filimonov A.V., Dmitrieva A.I., Kudjakov L.A., Saltykova I.V., Odermatt P., Ogorodova L.M.

Analysis of *Opisthorchis felinus* infection and liver and intrahepatic bile ducts cancer incidence rate in Russian Federation

Fedosenko S.V., Karanashkina M.A., Ogorodova L.M., Petrov V.A., Deev I.A., Kulikov E.S., Sazonov A.E.

Effect of systemic glucocorticosteroids in the management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease exacerbation on respiratory microbiota composition in the period of stability

## REVIEW AND LECTURES

Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Yesimova I.Ye., Kononova T.Ye., Filinyuk O.V., Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I.

The factors of imbalance of the immune response (on the different stage it realization) at pulmonary tuberculosis

## CASE OF CLINICAL PRACTICE

Valikova T.A., Alifirova V.M., Koroleva E.S., Filimonova M.N., Pugachenko N.V.

Cowden syndrome is a risk factor for ischemic stroke

Kuzbelivskiy I.I., Slizovskiy G.V., Sitko L.A., Anikina E.J.

Tunneling of the femoral head with regenerative cryotherapy in children with Legg – Calve – Perthes disease

## SIGNIFICANT EVENTS AND THE ROLE OF PERSONALITY IN THE HISTORY OF MEDICAL SCIENCE

Karpov R.S.

Memories of the teacher (on the 120th anniversary of the birth of Academician of the USSR Academy of medical sciences D.D. Yablokov)

Subject Index

Authors Index of the 15<sup>th</sup> Volume

УДК 618.3-06:616.151.5

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-5-15

Для цитирования: Белоусова Т.В., Маринкин И.О., Плюшкин В.А., Леонова А.А. Взаимосвязи в системе мать – плацента – ребенок при состоянии тромботической готовности и гематогенных тромбофилиях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 5–15

## Взаимосвязи в системе мать – плацента – ребенок при состоянии тромботической готовности и гематогенных тромбофилиях

Белоусова Т.В., Маринкин И.О., Плюшкин В.А., Леонова А.А.

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** – выявление взаимосвязей в системе мать – плацента – ребенок при наличии гематогенной тромбофилии и (или) состоянии тромботической готовности у женщин во время беременности.

**Материал и методы.** В группу исследования были включены 454 пациента, распределенных на две подгруппы: 1-я – 225 женщин (беременных и в последующем рожениц) и 2-я – 229 их новорожденных, находившихся в отделениях перинатального центра ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница». На 3–5-е сут жизни 75 новорожденным из 2-й подгруппы проведено исследование показателей системы гемостаза. В группу контроля входили 42 здоровых новорожденных от соматически здоровых матерей (без тромбофилии). Им проведено исследование системы гемостаза для определения показателей референсных значений.

**Результаты.** Изучены взаимосвязи между нарушениями системы гемостаза у матерей с состоянием тромботической готовности, гематогенной тромбофилией, морфогистологическими изменениями в последе и состоянием здоровья новорожденных. Проведены анализ историй родов, патоморфологического исследования последа и историй развития новорожденных, оценка системы гемостаза. Выявлен ряд осложнений в течении гестационного процесса и раннего неонатального периода. Корреляционный анализ установил наличие взаимосвязей в системе мать – плацента – ребенок по ряду факторов, влияющих на показатели состояния здоровья детей. Для коррекции указанных нарушений могут быть применены на практике профилактические мероприятия, позволяющие предупреждать развитие перинатальных осложнений при гематогенной тромбофилии и (или) тромботической готовности.

**Ключевые слова:** гематогенная тромбофилия, состояние тромботической готовности, перинатальный период, система мать – плацента – ребенок.

### ВВЕДЕНИЕ

Вопросы гематогенной тромбофилии и состояния тромботической готовности у женщин приобретают особую актуальность во время беременности [1]. Исследованием данной проблемы занимаются многие отечественные и зарубежные авторы [2–6].

По данным литературы, тромбофилия представляет собой патологическое состояние, обу-

словленное комбинацией факторов риска, реализованных развитием тромбоза. В свою очередь состояние тромботической готовности характеризуется совокупностью нескольких параметров, таких как лабораторно выявляемая гиперкоагуляция, высокий уровень маркеров внутрисосудистого свертывания крови, а также клиническими признаками предтромбоза. К последним относятся увеличение вязкости крови, замедление кровотока по данным дуплексного ангиосканирования, перманентные признаки органной

✉ Белоусова Тамара Владимировна, e-mail: belousovatv@ngs.ru

дисфункции, тромбирование иглы при венопункции, нарушение фетоплацентарного кровотока, синдром задержки внутриутробного развития (ЗВУР) плода, частичная отслойка плаценты и другие состояния. Современные представления о тромбофилии позволяют утверждать, что лишь при условии реализации тромботической готовности, то есть при сохраняющихся факторах риска и их нарастании, именно возникшее тромботическое событие (сосудистая катастрофа) может быть обозначено как тромбофилия [1].

Помимо увеличения риска тромботических осложнений у самой женщины в любом периоде ее жизни данная патология несет в себе ряд акушерских осложнений в случае наступления беременности [7]. Доказана связь гематогенной тромбофилии с синдромом потери плода, задержкой его внутриутробного развития, преэклампсией, фетоплацентарной недостаточностью (ФПН) [8–11].

В настоящее время особое внимание уделяется изучению проблемы влияния тромбофилии и состояния тромботической готовности у беременных на вероятность развития аналогичных состояний у их новорожденных. По мнению ряда авторов, требуется дальнейшее изучение вопроса о влиянии гиперкоагуляционного статуса беременных на развитие тромботической васкулопатии фетоплацентарного комплекса (ФПК) и тромбоемболических осложнений у новорожденных [12]. Встречаются единичные научные исследования, в которых прослеживается связь тромбофилии, в частности наличия антифосфолипидных антител и эндотоксинемии у женщин с кардиоваскулярной патологией и ее влияния на здоровье новорожденных [13]. Подобные результаты можно найти и в отдельных работах зарубежных авторов. Так, по мнению некоторых исследователей, тромботические осложнения у новорожденных от матерей с антифосфолипидным синдромом (АФС) обусловлены наличием у этих детей собственных антифосфолипидных антител (АФА), что зависит от их трансплацентарного переноса. При этом титр антител у матери коррелирует с таковым в крови новорожденного, в связи с этим всем новорожденным с тромбозами рекомендуется помимо стандартных методов исследования системы свертывания крови дополнительное проведение скрининга на наличие АФА [14].

В связи с вышеизложенным, актуальным объектом для изучения остаются вопросы, касающиеся выявления предикторов негативного влияния гематогенной тромбофилии беременных на состояние фетоплацентарного комплекса, внутриутробного плода и в последующем на состо-

яние здоровья детей [15–18]. Разработка этих аспектов позволит решить проблему профилактики возникновения вероятных перинатальных осложнений на ранних этапах, то есть на этапе выявления у женщин гематогенной тромбофилии и (или) состояния тромботической готовности и планирования беременности.

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении взаимосвязей в системе мать – плацента – ребенок при наличии гематогенной тромбофилии и (или) состоянии тромботической готовности у женщин во время беременности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн настоящего исследования представлен следующим образом. Были сформированы две группы: группа исследования и группа контроля. В группу исследования включены 454 пациента, распределенных на две подгруппы: 1-я – 225 женщин (беременных и в последующем рожениц) и 2-я – 229 их новорожденных, находившихся в отделениях перинатального центра ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» («ГНОКБ»). На 3–5-е сут жизни 75 новорожденным из 2-й подгруппы проведено исследование показателей системы гемостаза (активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), фибриноген, аденозиндифосфат (АДФ), количество тромбоцитов). В группу контроля входили 42 здоровых новорожденных от соматически здоровых матерей (без тромбофилии). Это категория детей была обследована ранее, им было проведено исследование системы гемостаза для определения показателей референсных значений. Полученные данные представлены в научных публикациях, а исследования выполнены на базе указанного выше медицинского учреждения, в условиях одной и той же лаборатории гемостаза [19]. Эти данные по группе контроля были включены в работу еще и ввиду наличия ряда этических и правовых аспектов проведения инвазивных вмешательств у здоровых новорожденных. Оценка состояния коагуляционного звена системы гемостаза в группе исследования и группе контроля проводилось на автоматическом коагулометре ACL-200 Instrumentation Laboratory – IL (США) с использованием стандартизированных методик и наборов реактивов. Гарантия качества анализов клинических лабораторий ГБУЗ «ГНОКБ» обеспечивалась участием лабораторий в Федеральной системе внешней оценки качества (ФСВОК,

г. Москва, Россия), международной системе оценки качества (EQAS-США) и автоматизированным внутрिलाбораторным контролем.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ BIOSTAT (версия 4.03) и электронных таблиц Microsoft Excel. Статистическая обработка вариационных рядов включала определение объема анализируемой группы  $n$ , средней  $M$  и стандартной ошибки  $m$ . Данные приведены в виде  $M \pm m$ , %. Анализ результатов проведен с помощью сравнения вариационных рядов, параметрического критерия Стьюдента. В то же время, принимая во внимание то обстоятельство, что численность анализируемой выборки в группе исследования и группе контроля составила 75 и 42 соответственно, было принято решение применить данный критерий как инструмент обработки информации, поскольку выборка достоверно прошла оценку на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Применялись непараметрический критерий (критерий соответствия  $\chi^2$ ), а также точный критерий Фишера (для групп с общим числом наблюдений менее 100) и критерий Манна – Уитни. Проведен корреляционный анализ полученных результатов с вычислением линейной корреляции, называемый коэффициентом Спирмена ( $r$ ). Данный метод был избран вследствие того, что он может быть использован не только для количественно выраженных данных, но также и в случаях, когда регистрируемые значения определяются описательными признаками различной интенсивности [20].

Для определения вклада тромбофилии и тромботического состояния матерей в изменения системы гемостаза и риск развития осложнений у новорожденных проводили логистический регрессионный анализ – рассчитывали отношение шансов (OR) и его доверительный интервал (CI 95%). Расчеты выполняли с помощью статистического пакета genetics R-project (version 2.11.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании проведенного исследования получены следующие результаты. В частности, структура нарушений в системе гемостаза при тромбофилии и (или) состоянии тромботической готовности у беременных гетерогенна и представлена АФС у 37 (17,3%), гиперагрегационным синдромом (ГАС) у 57 (25,3%), гиперфибриногенемией у 134 (60%), тромбинемией у 180 (80%). У 18 (8%) – гиперкоагуляционным синдромом, нарушениями в системе протеина С у 33 (14,7%) беременных. Сочетанные нарушения в системе

гемостаза установлены у 149 (66,2%) беременных. Гиперпродукция VIII и IX факторов свертывания и тромбофилия метаболического генеза относятся к категории редко встречающихся и выявлены лишь у 7 (3,1%). Беременность у женщин с тромбофилией и (или) тромботическим состоянием в большинстве случаев сопровождалась развитием преэклампсии, которая имела место у 150 (66,7%), угрозы прерывания – в 130 (57,8%) случаях, фетоплацентарной недостаточности (ФПН) – 157 (69,8%). В 35 (15,6%) случаях течение беременности осложнилось формированием и прогрессированием внутриутробной гипоксии плода. Показания к родоразрешению путем операции кесарева сечения были выставлены в 50% случаях наблюдения.

При патоморфологическом исследовании последа выявлено наличие признаков нарушения созревания плаценты в 110 (48,8%) случаях, а также воспалительных изменений неинфекционного генеза – в 115 (51,1%).

В раннем неонатальном периоде у детей, родившихся от матерей с тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности, зарегистрированы осложнения в виде полиорганных дисфункций ишемического характера. Церебральная ишемия разной степени тяжести диагностирована у 75 (32,8%) детей, гипоксическая кардиопатия (ишемии миокарда) – 63 (27,5%), синдром дыхательных нарушений – у 21 (9,2%) новорожденных. Кроме того, у 63 (27,5%) детей развился тромбогеморрагический синдром, в структуре которого кожный геморрагический синдром диагностирован у 45 (71,4%), кефалогематомы – 10 (15,9%), гематемезис – 8 (12,7%), внутрижелудочковые кровоизлияния – 4 (6,3%), тромбозы сосудов – у 4 (6,3%). Отмечены также единичные случаи синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) крови, а у 11 (19,5%) новорожденных установлено сочетание различных клинических проявлений тромбогеморрагического синдрома. Таким образом, тромбофилии и (или) состояния тромботической готовности беременных сопровождаются развитием нарушений в функционировании различных систем организма у новорожденных, характеризующихся как изменения ишемически-геморрагического характера.

Проведена оценка состояния системы гемостаза у новорожденных от матерей с тромбофилией и (или) тромботическим состоянием. Полученные результаты в целом сравнивались с аналогичными показателями контрольной группы. Выявленные изменения в системе гемостаза у новорожденных, родившихся от матерей с тромбофилией

и (или) тромботическим состоянием, характеризуются тенденцией к гиперкоагуляции по внешнему и внутреннему механизмам свертывания крови: (АПТВ ( $32,2 \pm 0,5$ ) с, в группе контроля – ( $57,2 \pm 2,5$ ) с,  $p < 0,001$ ; ПВ ( $12,9 \pm 0,2$ ) с, в группе контроля – ( $33,0 \pm 1,1$ ) с;  $p < 0,001$ ), гиперагрегацией тромбоцитов, а также высоким уровнем тромбинемии (средние значения по показателю РФМК составили ( $22,3 \pm 0,7$ )  $\times 10^{-2}$  г/л, в группе контроля – ( $12,8 \pm 0,04$ )  $\times 10^{-2}$  г/л;  $p < 0,001$ ). Уровень фибриногена по средним значениям в группе исследования составил ( $4,0 \pm 0,1$ ) г/л, что превысило значения данного показателя у новорожденных контрольной группы – ( $2,8 \pm 0,2$ ) г/л;  $p < 0,001$ . Полученные данные свидетельствуют о высоком риске развития тромботических осложнений у детей данной группы, находя подтверждение в структуре вышеуказанных патологических состояний и заболеваемости в раннем неонатальном периоде. Вместе с тем наряду с установленными изменениями у большинства новорожденных зарегистрирована тенденция к гипокоагуляции на конечном этапе свертывания (ТВ составил ( $16,2 \pm 0,4$ ) с, в группе контроля – ( $12,2 \pm 0,1$ ) с;  $p < 0,001$ ). Указанные изменения, вероятно, являются фактором, частично компенсирующим гиперкоагуляционные сдвиги в системе гемостаза, и определяют склонность, наряду с тромботическими, к геморрагическим проявлениям.

На основании проведенного корреляционного анализа были также выявлены определенные взаимосвязи в системе мать – плацента – ребенок между нарушениями в системе гемостаза у беременных с тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности, состоянием фетоплацентарного комплекса, а также состоянием здоровья и системой гемостаза новорожденных. В частности установлено, что чем выше уровень тромбинемии у женщин в III триместре беременности, тем больше риск развития у новорожденных гипоксической кардиопатии (ишемии миокарда) ( $r = 0,27$ ;  $p < 0,05$ ). При этом у этих женщин дети рождаются с высоким уровнем фибриногена в крови. У беременных с гиперкоагуляционным синдромом (укорочение ПВ) чаще, чем при других формах состояния тромботической готовности, выявляются признаки хронической ФПН ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ), что, в свою очередь, обуславливает ЗВУР плода ( $r = 0,29$ ;  $p < 0,05$ ) и рождение маловесных, с меньшей длиной тела детей ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ). Актуальным также представляется установленная закономерность в виде более высокого уровня фибриногена у беременных с тромбофилией и (или) состоянием

тромботической готовности и массой плаценты ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ). При этом у новорожденных детей отмечается более высокий риск развития гипоксической кардиопатии (ишемии миокарда) ( $r = 0,25$ ;  $p < 0,05$ ). Установлено, что у женщин с ГАС дети рождаются менее зрелыми ( $r = 0,26$ ;  $p < 0,05$ ). Кроме того, чем выраженнее гиперагрегация тромбоцитов (АДФ) в III триместре беременности, тем больше признаков незрелости выявлялось у родившихся детей ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ) и выше риск развития гипоксической кардиопатии ( $r = 0,27$ ;  $p < 0,05$ ). При условии более высоких показателей агрегации тромбоцитов на ристомидин во время беременности у новорожденных наблюдается более высокий уровень тромбинемии ( $r = 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Наличие тромбофилии метаболического генеза у женщин обуславливает высокий риск церебральной ишемии у их новорожденных ( $r = 0,24$ ;  $p < 0,05$ ). При наличии преэклампсии у женщин с тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности у их детей в показателях системы гемостаза выявляется гиперкоагуляция на конечном этапе свертывания ( $r = 0,24$ ;  $p < 0,05$ ). При наличии же такой сопутствующей патологии, как ожирение, отмечается высокий риск развития синдрома дыхательных расстройств у детей ( $r = 0,29$ ;  $p < 0,05$ ), которые чаще рождаются с признаками ЗВУР ( $r = 0,26$ ;  $p < 0,05$ ) и с более низкой массой тела ( $r = 0,2$ ;  $p < 0,05$ ). Кроме того, чем больше масса тела у матерей, тем дети рождаются менее зрелыми ( $r = 0,21$ ;  $p < 0,05$ ).

В результате проведенного логистического регрессионного анализа получена статистически значимая ассоциация сочетанных нарушений в системе гемостаза у женщин с наличием тромбогеморрагического синдрома у их детей (OR [CI 95%] = 1,08 [1,02–1,14];  $p = 0,01$ ). Статистически значимая ассоциация с повышенным риском развития тромбогеморрагического синдрома у детей в целом и тромбозов в частности также получена для тромбофилии метаболического генеза у матерей (OR [CI 95%] = 1,44 [1,05–1,96];  $p = 0,02$  и OR [CI 95%] = 1,27 [1,17–1,39];  $p = 1,63 \times 10^{-7}$  соответственно). Вместе с тем установлена статистически значимая взаимосвязь осложненного течения периода новорожденности (сочетанные осложнения) с преждевременными родами (OR [CI 95%] = 1,95 [1,43–2,66];  $p = 4,45 \times 10^{-5}$ ). В свою очередь, для данной категории пар выявлена статистически значимая ассоциация ГАС у женщин (OR [CI 95%] = 1,08 [1,01–1,15];  $p = 0,0223$ ) и внутриутробной гипоксией плода (OR [CI 95%] = 1,08 [1,002–1,17];  $p = 0,0467$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлена структура и гетерогенность тромбофилий и (или) состояния тромбоотической готовности у беременных. Полученные данные сопоставимы с результатами исследования других авторов, которые, в частности, указывают на высокую частоту АФС среди пациенток данной категории (до 25%), а также нарушений в системе протеина С (20%) и синдрома липких тромбоцитов (14%) [21].

В то же время у большинства беременных (66,2%), включенных в исследование, диагностированы сочетанные нарушения в системе гемостаза, что свидетельствует о более высоком риске развития у них тромбогенных осложнений и необходимости проведения дифференцированной комплексной терапии с целью профилактики развития неблагоприятных тромбгеморрагических состояний. Важно то, что средний возраст беременных, у которых выявлена тромбофилия и (или) состояние тромбоотической готовности, составил ( $28,7 \pm 5,4$ ) лет, женщин старше 35 лет – 16,4%, что демонстрирует предрасположенность к указанной патологии с увеличением возраста. Аналогичные данные подтверждены публикациями других исследователей. Так, по мнению М.Я. Идрисовой возраст старше 35 лет является фактором риска развития осложнений беременности и вследствие этого неблагоприятных перинатальных исходов, а также фактором, способствующим проявлению «скрытой» тромбофилии, занимающей важное место в патогенезе акушерской патологии [22]. В работах А.Д. Макацария и соавт. также акцентируется внимание на том, что возраст женщины старше 35 лет является одним из факторов риска развития тромбоотических осложнений во время беременности и в послеродовом периоде [3].

В данном исследовании осуществлена оценка течения гестационного процесса у женщин с тромбофилией и (или) тромбоотическим состоянием. У большинства женщин (96%) беременность протекала с осложнениями, у многих из них (76,4%) – с сочетанием нескольких видов осложнений, лишь у 4% женщин осложнений не установлено. Полученные данные вполне корректно согласуются с результатами, ранее представленными в публикациях отечественных авторов. В частности отмечено, что тромбофилия встречается у 80% беременных с эклампсией и преэклампсией [23]. Это подтверждают и зарубежные исследователи,

которые показали, что у беременных с эклампсией тромбофилии выявляются в пять раз чаще, чем в общей популяции [24].

Таким образом, в генезе развития ряда серьезных осложнений беременности лежат различные виды нарушений в системе гемостаза при тромбофилии и (или) тромбоотическом состоянии. При этом значительно чаще возникают акушерские ситуации с наличием показаний к оперативному родоразрешению путем операции кесарева сечения (по результатам проведенного исследования). Таким образом, наличие данной патологии системы гемостаза у беременных как непосредственно, так и опосредованно за счет развития осложнений гестационного процесса влияет на выбор пути родоразрешения. Указанное обстоятельство также нашло свое подтверждение в анализируемой литературе [25, 26].

В ходе исследования установлена структура изменений в плаценте и плодных оболочках при наличии тромбофилии и (или) тромбоотического процесса во время беременности. Данные, полученные в работе, согласуются с представленными в литературе и свидетельствуют о наличии неблагоприятного влияния тромбофилии беременных на состояние фетоплацентарного комплекса [3, 12, 27, 28]. Вместе с тем в 19,6% случаев патологических изменений в последе не установлено, что, вероятно, может быть обусловлено ранней (своевременной) диагностикой этой патологии, позволившей своевременно начать терапию, которая «нивелировала» негативное влияние данных нарушений на систему мать – плацента – плод и положительно повлияла на исход беременности.

При проведении оценки состояния здоровья детей в раннем неонатальном периоде, родившихся от матерей с тромбофилией и (или) тромбоотическим состоянием, установлено, что доношенными из них родились 218 (95,2%), недоношенными – 11 (4,8%). При этом крайне тяжелое, тяжелое и средней степени тяжести состояние при рождении имели 31 (13,5%) ребенок. Тяжесть состояния обусловлена патологической неврологической симптоматикой, состояниями, связанными с морфофункциональной незрелостью, расстройствами функции внешнего дыхания. Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии тромбофилий у матерей на состояние здоровья их детей при рождении и позволяют выделить наличие тромбофилии и (или) тромбоотического состояния во время беременности в качестве фактора, значимо влияющего на состояние детей. Это подтверждают

и результаты трудов отечественных авторов, в которых прослеживается отрицательное влияние наличия тромбофилии у матерей на здоровье их новорожденных, в частности при АФС [13, 14]. В результате настоящего исследования показано, что у новорожденных отмечались различные осложнения в течение раннего неонатального периода – у 60,1% новорожденных отмечено развитие различной патологии. У 32,8% детей имела место церебральная ишемия разной степени тяжести, 9,2% – синдром дыхательных расстройств, 27,5% новорожденных – гипоксическая кардиопатия (ишемия миокарда), у 27,5% – тромбогеморрагический синдром. Особый интерес представляло изучение структуры тромбогеморрагических проявлений. Установлено, что наиболее часто отмечался кожный геморрагический синдром, реже выявлялись кефалогематомы средних размеров, гематемезис, выявлены также единичные случаи внутричерепных кровоизлияний, тромбозов сосудов головного мозга и бедренной артерии. В единичных случаях (три случая) отмечалось развитие синдрома ДВС крови. У 27,5% имело место сочетание разных форм клинических проявлений нарушений в системе гемостаза.

Таким образом, полученные данные отражают полисистемный характер влияния тромбофилии и (или) тромботической готовности матери на функциональное, морфофункциональное состояние органов и систем плода и определяет не только степень влияния, но характер и структуру изменений.

Согласно полученным результатам исследования системы гемостаза у новорожденных по сравнению с группой контроля, отмечается статистически значимая гиперкоагуляция как по внешнему, так и по внутреннему пути свертывания. Уровень тромбинемии у этих детей на 3–5-е сут жизни превышал соответствующие значения у новорожденных группы контроля, что является свидетельством наличия у данной категории детей гиперкоагуляционного статуса с повышенным тромбогенным потенциалом и соответственно риском возникновения и развития тромботических осложнений [13, 29]. В то же время выявленные изменения в системе гемостаза новорожденных, родившихся от матерей с тромбофилией и (или) тромботическим состоянием, могут уравниваться за счет удлиненного тромбинового времени, то есть наличия гипокоагуляции на конечном этапе свертывания крови, которая, вероятно, обусловлена (транзиторной) дисфибриногенемией. Данное предположение подтверждается другими авторами,

которые представили информацию об аналогичных изменениях в коагуляционном статусе у детей [30–32].

Полученные данные также свидетельствуют о том, что при тромбофилии и (или) тромботическом состоянии во время беременности существует взаимосвязь между клиническими проявлениями, лабораторными изменениями в коагулограмме, отражающими влияние патологических процессов в системе мать – плацента – ребенок. Подобного рода тенденции отмечены также в раритетных публикациях, имеющих в отечественной и в зарубежной литературе. В частности, доказан факт связи патологических изменений в последе (тромбоз спиральных артерий и инфаркты) с наличием тромбофилии у беременных, а также тромбоэмболических осложнений у детей. Данная связь описана, в частности, для приобретенных тромбофилий – АФС [12, 14]. Вместе с тем в проведенном исследовании установлены взаимосвязи в системе мать – плацента – ребенок, сведения о которых в литературе встретить не удалось. В частности показано, что высокий уровень тромбинемии, фибриногена, а также ГАС у женщин обуславливает высокий риск развития у их новорожденных гипоксической кардиопатии (ишемии миокарда), при этом наличие тромбинемии у женщин связано с гиперфибриногенемией у детей. При гиперкоагуляционном синдроме у женщин чаще, чем при других формах выявляются признаки хронической фетоплацентарной недостаточности, обусловленные гемореологическими нарушениями, что, в свою очередь, сопровождается развитием синдрома задержки роста плода и рождения детей с признаками ЗВУР. У женщин с ГАС дети также рождаются менее зрелыми, что, вероятно, связано с имеющимися нарушениями в ФПК, обусловленными гемостазиологическими изменениями. При наличии у матерей тромбофилии метаболического генеза высок риск развития церебральной ишемии у детей, а преэклампсия в сочетании тромбофилией определяет формирование гиперкоагуляционного статуса у детей.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о негативном влиянии нарушений системы гемостаза у женщин с тромбофилией и (или) тромботическим состоянием на функционирование фетоплацентарного комплекса, состояние здоровья и системы гемостаза у новорожденных. Указанное обстоятельство дает основание рекомендовать выделение группы высокого перинатального риска по возникновению осложнений ишемического и тромбогеморрагического

характера среди детей, родившихся от матерей с тромбофилией и (или) тромботическим состоянием.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предикторами развития осложнений как в течении гестационного процесса, так и у новорожденных, в том числе и в структуре нарушений показателей системы гемостаза, являются гематогенная тромбофилия и (или) состояние тромботической готовности, преэклампсия, ФПН, ожирение.

С целью коррекции влияния вышеуказанных негативных факторов на практике можно предложить применение следующих профилактических мероприятий, позволяющих предупредить развитие перинатальных осложнений при наличии гематогенной тромбофилии и (или) тромботической готовности у беременных. Всем женщинам фертильного возраста в период предгравидарной подготовки следует рекомендовать медицинское обследование на выявление наличия тромбофилии и (или) состояния тромботической готовности как фактора риска развития осложнений не только гестационного процесса, но и периода новорожденности. На этапе планирования беременности также необходимо провести коррекцию массы тела (при необходимости). Всем женщинам с подтвержденной тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности рекомендуется сделать необходимые диагностические исследования показателей системы гемостаза для уточнения формы гематогенной тромбофилии и подбора терапии, обеспечивающей профилактику тромботических осложнений, развития и прогрессирования ФПН при наступлении беременности. Необходим постоянный мониторинг коагуляционного статуса в течение гестационного процесса для терапевтической коррекции в соответствии с существующими подходами к ведению беременных с тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности.

Кроме того, особенно важным аспектом представляется разработка и внедрение в практику математических моделей прогнозирования исходов беременности на фоне гематогенной тромбофилии и (или) состояния тромботической готовности, позволяющих сформировать среди женщин фертильного возраста группы высокого риска развития перинатальных осложнений, связанных с тромбофилией, разработать ряд профилактических мероприятий, имеющих значение на различных этапах ведения таких пациенток. Крайне важным обстоятельством для данной ка-

тегории женщин является своевременная медикаментозная, диетотерапия и другая коррекция факторов, воздействующих на течение беременности, родоразрешение и последующее состояние здоровья новорожденных.

У новорожденных от матерей с тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности необходимо осуществлять скрининговый контроль показателей системы гемостаза (АПТВ, ПВ, ТВ, РФМК, Д-димеры, АДФ, фибриноген) в раннем неонатальном периоде (3–5-е сут жизни), поскольку риск развития тромбгеморрагических нарушений у этих детей значительно превышает среднепопуляционный.

Дети, рожденные от матерей с тромбофилией и (или) состоянием тромботической готовности нуждаются в тщательном диспансерном наблюдении в группах риска по возникновению (прогрессированию) сердечно-сосудистой патологии, патологии центральной нервной системы и нарушений системы гемостаза в аспекте развития тромботических событий.

## 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

Настоящее исследование соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Работа получила одобрение локального этического комитета Государственной Новосибирской областной клинической больницы (г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130, протокол заседания № 27 от 07.05.2008 г.). Все лица, участвующие в исследовании, дали информированное согласие на участие в исследовании. Также имеется информированное добровольное согласие родителей на проведение медицинских вмешательств (вышеперечисленных исследований) у новорожденных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Момот А.П., Тараненко И.А., Цывкина Л.П. Состояние тромбоцитической готовности – возможности современной диагностики и перспективы // *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2013; 1: 24–27.
2. Айламазян Э.К., Зайнулина М.С. Наследственная тромбофилия: дифференцированный подход к оценке риска акушерских осложнений // *Акушерство и гинекология*. 2010; 3: 3–9.
3. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Акиншина С.В. Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике: молекулярно-генетические механизмы и стратегия профилактики тромбоэмболических осложнений: рук. для врачей. М.: Мед. информ. агентство, 2007: 1064.
4. Айламазян Э.К., М.С. Зайнулина, Н. Н. Петрищев. Роль тромбофилии в развитии акушерской патологии // *Акушерство и гинекология*. 2007; 5: 38–42.
5. Gray G., Nelson-Piercy C. Thromboembolic disorders in obstetrics // *Best Practice a. Research: Clinic. Obstetrics a. Gynaecology*. 2012; 26 (1): 53–64.
6. Момот А.П. [и др.]. Эволюция учения З.С. Баркагана о гематогенных тромбофилиях // Баркагановские чтения. Тр. III сиб. науч.-практ. конф. гематологов. Барнаул, 2010: 16–40.
7. Николаева М.Г. [и др.]. Роль генетических детерминант тромбофилий в развитии акушерских осложнений // Баркагановские чтения. Тр. III сиб. науч.-практ. конф. гематологов. Барнаул, 2010: 83–87.
8. Игнатъева Н.С. [и др.]. Ранняя диагностика тромбозов у новорожденных // *Педиатрия*. 2010; 1: 41–43.
9. Пюрбеева Е.Н., Зайнулина М.С. Некоторые вопросы тромбофилии при плацентарной недостаточности в практике семейного врача // *Новые Санкт-Петербург. учеб. ведомости*. 2007; 1: 51–53.
10. Gruel Y. Specificities of neonatal hemostasis and implications in pathologic situations // *Arch. of Pediatrics*. 2010; 17 (3): 93–100.
11. Серов В.Н. [и др.]. Наследственные и приобретенные тромбофилические состояния в акушерско-гинекологической практике: (клинические аспекты, диагностика, тактика ведения, подходы к терапии): рук. для врачей. Новосибирск, 2011: 180.
12. Leistra-Leistra M.J. [et al.] Fetal thrombotic vasculopathy in the placenta: a thrombophilic connection between pregnancy complications and neonatal thrombosis? // *Placenta*. 2004; 25 (A): S102–S105.
13. Ильина А.Я. Антифосфолипидные антитела и эндотоксинемия у женщин с кардиоваскулярной патологией и их новорожденных // *Педиатрия*. 2004; 1: 28–33.
14. Tuhy J., Harrison A. Prenatal transfer of anticardiolipin antibodies associated with fatal neonatal aortic thrombosis // *Austral. a. New Zealand J. of Obstetrics a. Gynaecology*. 2005; 45 (2): 175–176.
15. Корнюшина Е.А., Зайнулина М.С. Нарушения системы гемостаза, методы их коррекции и исходы беременности у больных с тромбофилией и невынашиванием // *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2009; 4: 71–78.
16. Кох Н.В., Воронина Е.Н., Филиппенко М.Л. Исследование влияния полиморфизма генов, ассоциированных с тромбофилией, на формирование акушерской патологии (гестоз, привычное невынашивание беременности) // Баркагановские чтения. Тр. III сиб. науч.-практ. конф. гематологов. Барнаул, 2010: 121.
17. Helgadottir L.B. [et al.]. The association of inherited thrombophilia and intrauterine fetal death: a case-control study // *Blood Coagulation a. Fibrinolysis*. 2011; 22 (8): 651–656.
18. Pogliani L. [et al.]. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) homozygosity and neonatal outcome: follow-up of 42 pregnancies at risk // *J. of Child Neurology*. 2010; 25 (6): 701–704.
19. Пикалов И. В. Механизмы, диагностика и пути коррекции важнейших нарушений гемостаза у недоношенных новорожденных: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Барнаул, 1998: 34 с.
20. Электронный ресурс. Путь доступа: <http://www.infamed.com/stat/s05.html>
21. Kitchens K.S., Alving B.M., Kessler C.M. Consultative hemostasis and thrombosis [S. l.]: Elsevier, 2002: 672 p.
22. Идрисова М. Клиническое значение диагностики и коррекции нарушений в системе гемостаза у беременных старше 35 лет // *Врач*. 2007; 4: 69–70.
23. Бицадзе В.О. Принципы диагностики и патогенетической профилактики основных осложнений беременности, обусловленных тромбофилией: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2003: 52 с.
24. Mello G. [et al.] Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study // *Hypertension*. 2005; 46 (6): 1270–1274.
25. Шарыгин С.А. [и др.] Дополнительные маркеры плацентарной недостаточности при гестозе, сопровождающемся нарушениями родовой деятельности // *Арх. патологии*. 2008; 2: 12–14.
26. Юдаева Л.С., Макацария А.Д. Профилактика и коррекция тромбгеморрагических осложнений во время беременности и при кесаревом сечении у больных с врожденными заболеваниями соединительной ткани // *Акушерство и гинекология*. 2006; 6: 20–23.
27. Arias F. [et al.] Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta // *J. of Matern.-Fetal Medicine*. 1998; 7 (6): 277–286.
28. Levy R.A. [et al.] Placental pathology in antiphospholipid syndrome // *Lupus*. 1998; 7 (20): 81–85.
29. Таболин В.А. [и др.] Клиническое значение показателей гемостаза в генезе заболеваний новорожденных раннего неонатального периода, родившихся у женщин с кардиоваскулярной патологией // *Педиатрия*. 2006; 1: 22–26.
30. Чупрова А.В. Система свертывания крови и ее нарушения у новорожденных (функционально-структур-

- ные особенности, методы диагностики и контролируемой терапии): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1994: 35.
31. Стуров В.Г. Наследственные структурные аномалии фибриногена (дисфибриногенемии): подходы к диагностике и направленной терапии у детей // *Бюл. сиб. медицины*. 2008; 2: 173–174.
32. Franchini M. [et al.] Neonatal dysfibrinogenemias and thromboembolic emergencies // *Annals of Hematology*. 2006; 85 (8): 552–554.

Поступила в редакцию 20.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Белоусова Тамара Владимировна**, д-р мед. наук, профессор, заслуженный врач РФ, зав. кафедрой педиатрии и неонатологии, НГМУ, г. Новосибирск.

**Маринкин Игорь Олегович**, д-р мед. наук, профессор, ректор НГМУ, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, педиатрический факультет, НГМУ, г. Новосибирск.

**Плюшкин Валерий Александрович**, канд. мед. наук, ассистент кафедры педиатрии и неонатологии, НГМУ, г. Новосибирск.

**Леонова Алена Александровна**, ассистент кафедры педиатрии и неонатологии, НГМУ, г. Новосибирск.

(✉) Белоусова Тамара Владимировна, e-mail: belousovatv@ngs.ru

УДК 618.3-06:616.151.5

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-5-15

For citation: Belousova T.V., Marinkin I.O., Plyushkin V.A., Leonova A.A. The relationship in the mother – placenta – child with hemogenous thrombophilia and thrombotic state of readiness. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 5–15

## The relationships in the mother – placenta – child system in case of hemogenous thrombophilia and thrombotic state of readiness

**Belousova T.V., Marinkin I.O., Plyushkin V.A., Leonova A.A.**

*Novosibirsk State Medical University (NSMU)*

52, Krasnyi Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

### ABSTRACT

**The purpose of this study** is to understand the relationships in the mother-placenta-child system in case of hemogenous thrombophilia and thrombotic state of readiness in pregnant women.

**Materials and methods.** The research group consisted of 454 patients, was divided into two subgroups: the 1st subgroup included 225 women (pregnant and, subsequently, obstetric patients) and the 2nd subgroup included their 229 infants who were in the perinatal center of State Novosibirsk Regional Clinical Hospital. At 3–5 days of life 75 newborns from the 2nd sub-group underwent hemostatic system assessment. 42 healthy newborns from somatically healthy mothers (without thrombophilia) were included in the control group. The assessment of their hemostatic system was carried out to determine the performance of reference values.

**Results.** The relationships between the health condition of newborns and hemostatic system disorders in mothers with thrombotic state of readiness, hemogenous thrombophilia, and morphohistological changes in the placenta were studied. The researchers analyzed labour and delivery records, pathomorphological examination of a placenta, neonatal records, and assessed the hemostatic system. A number of complications were detected during a gestational process and an early neonatal period. The correlation analysis has established a relationship in the mother – placenta – child system in a number of factors affecting children's health outcomes. To correct above mentioned abnormalities preventive measures can be taken. They allow to avert the development of perinatal complications in case of hemogenous thrombophilia and (or) thrombotic readiness.

**Key words:** hemogenous thrombophilia, thrombotic state of readiness, perinatal period, system mother-placenta – child.

## REFERENCES

1. Momot A.P., Taranenko I. A., Tsyvkina L.P. Sostoyanie tromboticheskoy gotovnosti – vozmozhnosti sovremennoy diagnostiki i perspektivy [Thrombotic state of readiness the possibilities of modern diagnosis and prospects] // *Meditinskiy alfabit. Sovremennaya laboratoriya – Medical alphabet. Motion lab.* 2013; 1: 24–27 (in Russian).
2. Aylamazyan E.K., Zaynulina M.S. Nasledstvennaya trombofiliya: differentsirovannyiy podhod k otsenke riska akusherskikh oslozhneniy. [Hereditary thrombophilia: a differentiated approach to assessment of risk of obstetric complications] // *Akusherstvo i ginekologiya – OBGYN-obstetrics-wise.* 2010; 3: 3–9 (in Russian).
3. Makatsariya A.D., Bitsadze V. O., Akinshina S. V. Trombozy i tromboembolii v akushersko-ginekologicheskoy klinike: molekulyarno-geneticheskie mekhanizmy i strategiya profilaktiki tromboembolicheskikh oslozhneniy [Thrombosis and thromboembolism in the obstetric clinic: molecular genetic mechanisms and strategy for prevention of thromboembolic complications] *Rukovodstvo dlya vrachey [A guide for physicians]* M: Med. inform. agency, 2007: 1064 (in Russian).
4. Aylamazyan E. K., Zaynulina M. S., N. N. Petrishchev. Rol trombofilii v razviti akusherskoy patologii [The role of thrombophilia in the development of pathology in obstetrics] // *Akusherstvo i ginekologiya – Obstetrics and gynecology.* 2007; 5: 38–42 (in Russian).
5. Gray G., Nelson-Piercy C. Thromboembolic disorders in obstetrics // *Best Practice a. Research: Clinic. Obstetrics a. Gynaecology.* 2012; 26 (1): 53–64.
6. Momot A. P. [et al.] Evolyutsiya ucheniya Z.S. Barkagana o gematogennykh trombofiliiakh [The evolution of teaching Barkagan ZS of hematogenic thrombophilia]. Barkaganovskie chteniya. Tr. III sib. nauch.-prakt. konf. gematologov [Barkagan's read: Tr. III Sib. scientific.-pract. Conf. hematologists]. Barnaul Publ., 2010: 16–40 (in Russian).
7. Nikolaeva M. G. [et al.] Rol' geneticheskikh determinant trombofilii v razviti akusherskikh oslozhneniy [The role of genetic determinants of thrombophilia in the development of aku-Chersky complications]. Barkaganovskie chteniya. Tr. III sib. nauch.-prakt. konf. gematologov [Barkagan's read: Tr. III Sib. scientific.-pract. Conf. hematologists]. Barnaul Publ., 2010: 83–87 (in Russian).
8. Ignatiev N.S. [et al.] Rannaya diagnostika trombozov u novorozhdennykh. [Early diagnosis of thrombosis in the newborn] // *Pediatrics – Pediatrics.* 2010; 1: 41–43 (in Russian).
9. Purbaeva E.N., Zaynulina M.S. Nekotoryye voprosy trombofilii pri platsentarnoy nedostatochnosti v praktike semeynogo vracha [Some issues of thrombophilia in placental insufficiency in the practice of the family doctor] // *Novyie Sankt-Peterburg. vracheb. vedomosti – New St.-Petersburg. medical. statements.* 2007; 1: 51–53 (in Russian).
10. Gruel Y. Specificities of neonatal hemostasis and implications in pathologic situations // *Arch. of Pediatrics.* 2010; 17 (3): 93–100.
11. Serov V. N. [et al.]. Hereditary and acquired thrombophilic States in obstetric practice: (clinical aspects, diagnosis, tactics of the Veda-niya, approaches to therapy) hands. for the doctors. Novosibirsk, 2011: 180 (in Russian).
12. Leistra-Leistra M.J. [et al.] Fetal thrombotic vasculopathy in the placenta: a thrombophilic connection between pregnancy complications and neonatal thrombosis? // *Placenta.* 2004; 25 (A): S102–S105.
13. Ilyina A. Y. Antifosfolipidnye antitela i endotoksinemiya u zhenshin s kardiovaskulyarnoy patologiyey i ih novorozhdennykh [Antiphospholipid antibodies and endotoxemia in women with cardiovascular popular pathology and their newborn infants] // *Pediatrics – Pediatrics.* 2004; 1: 28–33 (in Russian).
14. Tuyhy J., Harrison A. Prenatal transfer of anticardiolipin antibodies associated with fatal neonatal aortic thrombosis // *Austral. a. New Zealand J. of Obstetrics a. Gynaecology.* 2005; 45(2): 175–176.
15. Karnyushina E. A., Zaynulina M. S. Disorders of hemostasis, methods of their correction and the outcomes of pregnancy in patients with thrombophilia and recurrent pregnancy loss // *Thrombosis, hemostasis and rheology.* 2009; 4: 71–78 (in Russian).
16. Koch N. In. Voronina E. N., Filippenko M. L. study of the influence of polymorphism of genes associated with thrombophilia, the formation of obstetric pathology (preeclampsia, vechnoe miscarriage) // *Burkhanova read: Tr. III Sib. scientific.-pract. Conf. hematologists.* Barnaul, 2010: 121 (in Russian).
15. Karnyushina E. A., Zaynulina M. S. Narusheniya sistemy gemostaza, metody ih korrektsii i ishody beremennosti u bolnykh s trombofiliey i nevinashivaniem [Disorders of hemostasis, methods of their correction and the outcomes of pregnancy in patients with thrombophilia and recurrent pregnancy loss] // *Tromboz, gemostaz i reologiya – Thrombosis, hemostasis and rheology.* 2009; 4: 71–78 (in Russian).
16. Koch N. In. Voronina E. N., Filippenko M. L. Issledovanie vliyaniya polimorfizma genov, assotsirovannykh s trombofiliey, na formirovaniye akusherskoy patologii (gestoz, privyichnoe nevinashivaniye beremennosti) [A study of the influence of polymorphism of genes associated with thrombophilia, the formation of obstetric pathology (preeclampsia, habitual miscarriage)] Barkaganovskie chteniya. Tr. III sib. nauch.-prakt. konf. gematologov – Barkagan's read: Tr. III Sib. scientific.-pract. Conf. hematologists. Barnaul Publ., 2010: 121 (in Russian).
17. Helgadottir L. B. [et al.]. The association of inherited thrombophilia and intrauterine fetal death: a case-control study // *Blood Coagulation a. Fibrinolysis.* 2011; 22(8): 651–656.
18. Pogliani L. [et al.]. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) homozygosity and neonatal out-

- come: follow-up of 42 pregnancies at risk // *J. of Child Neurology*. 2010; 25 (6): 701–704.
19. Pikalov I. V. Mehanizmyi, diagnostika i puti korrektsii vazhneyshih narusheniy gemostaza u nedonoshennyih novorozhdennyih [Mechanisms, diagnosis and ways of correction of critical violations hemostasis in preterm infants: author. dis. ... d-ra med. sciences]. Barnaul, 1998: 34 (in Russian).
  20. Elektronnyy resurs [Electronic resource] URL: <http://www.infamed.com/stat/s05.html> (in Russian).
  21. Kitchens K.S., Alving B.M., Kessler C.M. Consultative hemostasis and thrombosis [S. l.]: El-sivier, 2002: 672.
  22. Idrisova M. Klinicheskoe znachenie diagnostiki i korrektsii narusheniy v sisteme gemostaza u beremennyih starshe 35 let [The clinical value of diagnostics and correction of violations in the hemostatic system in pregnant women older than 35 years] // *Vrach – Doctor*. 2007; 4: 69–70 (in Russian).
  23. Bitsadze V. O. Printsipy diagnostiki i patogeneticheskoy profilaktiki osnovnyih oslozhneniy beremennosti, obuslovlennyih trombofiliey [Principles of diagnostics and pathogenetic prophylaxis of the basic complications of pregnancy caused by thrombophilia]: author. dis. ... d-ra med. sciences]. M., 2003: 52 (in Russian).
  24. Mello G. [et al.] Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study // *Hypertension*. 2005; 46 (6): 1270–1274.
  25. Sharygin S.A. [et al.] Dopolnitelnyie markery platsentarnoy nedostatochnosti pri gestoze, soprovozhdayushchaya narusheniyami rodovoy deyatel'nosti [Additional markers of placental insufficiency in preeclampsia, accompanied by impaired labor activity] // *Arh. patologii – Arch. pathology*. 2008; 2: 12–14 (in Russian).
  26. Yudaeva L.S., Makatsariya A.D. Profilaktika i korrektsiya trombogemorragicheskikh oslozhneniy vo vremya beremennosti i pri kesarevom sechenii u bolnykh s vrozhdennymi zabolevaniyami soedinitel'noy tkani [Prevention and correction of thrombohemorrhagic complications during pregnancy and cesarean section in patients with congenital over-diseases of connective tissue] // *Akusherstvo i ginekologiya – Obstetrics and gynecology*. 2006; 6: 20–23 (in Russian).
  27. Arias F. [et al.] Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta // *J. of Matern.-Fetal Medicine*. 1998; 7 (6): 277–286.
  28. Levy R.A. [et al.] Placental pathology in antiphospholipid syndrome // *Lupus*. 1998; 7 (20): 81–85.
  29. Tabolin V.A. [et al.] Klinicheskoe znachenie pokazateley gemostaza v geneze zabolevaniy novorozhdennyih ranne-go neonatal'nogo perioda, rodivshihsya u zhenshin s kardiovaskulyarnoy patologiyey [Clinical value of indicators of hemostasis in the Genesis of diseases of newborns of the early neonatal period born to women with cardiovascular pathology] // *Pediatrics – Pediatrics*. 2006; 1: 22–26 (in Russian).
  30. Chuprova A.V. Sistema svertyvaniya krovi i ee narusheniya u novorozhdennyih (funktsionalno-strukturnyye osobennosti, metody diagnostiki i kontroliruemoy terapii) [The system of blood coagulation and its disorders in the newborn (functional and structural features, methods of diagnostics and controlled therapy): autoref. dis. ... d-ra med. sciences]. M., 1994: 35 (in Russian).
  31. Sturov V.G. Nasledstvennyie strukturnyye anomalii fibrinogena (disfibrinogenemii): podhodyi k diagnostike i napravlennoy terapii u detey [Hereditary structural abnormalities of fibrinogen (dysfibrinogenemia-MIA): approaches to diagnosis and targeted therapy in children] // *Byul. sib. meditsiny – Bull. sib. medicine*. 2008; 2: 173–174 (in Russian).
  32. Franchini M. [et al.] Neonatal dysfibrinogenemias and thromboembolic emergencies // *Annals of Hematology*. 2006; 85 (8): 552–554.

Received September 20.2016

Accepted December 01.2016

**Belousova Tamara V.**, MD, Professor, Head of Department of Pediatrics and Neonatology, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

**Marinkin Igor' O.**, MD, Professor, Head of Department of Obstetrics and Gynecology, Pediatric Faculty, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

**Plyushkin Valeriy A.**, PhD, Assistant of Department of Pediatrics and Neonatology, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

**Leonova Alena A.**, Assistant of Department of Pediatrics and Neonatology, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Belousova Tamara V.**, e-mail: belousovatv@ngs.ru.

УДК 576.3.08

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-16–29

Для цитирования: Дружинина Т.В., Талалаев С.Я., Закиров Н.П., Щаденко С.В., Хабибуллин Ш.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Клеточные реакции на трехмерные матриксы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 16–29

## Клеточные реакции на трехмерные матриксы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати

Дружинина Т.В.<sup>1</sup>, Талалаев С.Я.<sup>1</sup>, Закиров Н.П.<sup>1</sup>, Щаденко С.В.<sup>2,3</sup>,  
Хабибуллин Ш.А.<sup>3</sup>, Хлусов И.А.<sup>2,4</sup>, Литвинова Л.С.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России  
Россия, 123182, г. Москва, Щукинская ул., 5/2

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

<sup>4</sup> ООО «Биоконструктор-С»  
Россия, 634061, г. Томск, ул. Сибирская, 31

<sup>5</sup> Балтийский федеральный университет имени И. Канта  
Россия, 236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

### РЕЗЮМЕ

**Цель** исследования — оценить *ex vivo* физико-химические и биологические свойства трехмерных (3D) биodeградируемых матриксов «полимолочная кислота — фосфаты кальция», полученных с помощью аддитивных технологий (3D-печати), как потенциальных материалов для восстановления костной ткани.

**Материал и методы.** Экспериментальные образцы (диски толщиной 1,2–1,6 мм и диаметром 8 или 11 мм) композитных биodeградируемых 3D-матриксов (далее — 3D-композиты) получены из исходной смеси 95 мас% полимолочной кислоты (PLA) и 5 мас% гидроксиапатита (НАР) методом компьютерного проектирования в программной среде Blender и последующего послойного наплавления нитей (диаметр 1,75 мм) при помощи 3D-принтера. В качестве контроля служили матриксы из 100 мас% PLA. Одна из поверхностей образцов была текстурирована бороздками шириной 0,3–0,5 мм. Изучали физико-химические свойства образцов диаметром 11 мм: геометрию, массу, морфологию, шероховатость, электростатический потенциал и смачиваемость поверхности, элементный состав. Биологические испытания включали изучение 24-часовой цитотоксичности образцов диаметром 8 мм на культуре мононуклеарных лейкоцитов здорового добровольца или лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека линии Jurkat 5332 (далее Jurkat Т-клетки). В 21-суточной культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани человека определяли остеогенный потенциал образцов диаметром 11 мм по секреции остеокальцина, минерализации межклеточного матрикса, визуализированной окраской ализарином.

**Основные результаты.** Характеристики трехмерных биodeградируемых матриксов PLA-НАР, полученных методом 3D-печати, во многом соответствуют физико-химическим параметрам, критичным для восстановления костной ткани. При небольшом содержании кальция и фосфора (1–2 мас.%) они способствовали *ex vivo* минерализации межклеточного вещества, сформированного в культуре ММСК жировой

✉ Хлусов Игорь Альбертович, e-mail: khlusov63@mail.ru

ткани человека. При 24-часовом контакте *in vitro* с 3D-композитами PLA-HAP в отличие от PLA-образцов на 9–10% возросло число погибших (преимущественно путем некроза) лейкозных Jurkat T-клеток, но не моноклеарных лейкоцитов здорового добровольца.

**Заключение.** Полярная реакция здоровых и опухолевых клеток на образцы PLA-HAP в случае увеличения содержания фосфатов кальция в составе 3D-композита может иметь значение при разработке новых материалов для эндопротезирования и остеосинтеза переломов у больных, страдающих гемобластозами.

**Ключевые слова:** 3D-моделирование, прототипирование, биodeградируемые диски, *in vitro*, цитотоксичность, стромальные стволовые клетки, секреция остеокальцина, окраска ализарином красным.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в тканевой биоинженерии и регенеративной медицине растет применение биodeградируемых (со)полимеров. Среди часто изучаемых материалов – полимеры монокарбоновых кислот: молочной, гликолевой, масляной, валериановой [1]. Широкое использование в клинической практике нашли имплантаты, выполненные из полигликолевой и (или) полимолочной кислот (PLA), которые являются частично кристаллизованными полимерами с линейной структурой [2].

В клинической практике растет количество операций, сделанных с использованием имплантатов, выполненных из различных полимерных или биополимерных рассасывающихся материалов, которые должны в разные сроки в зависимости от их состава контролируемо замещаться костной тканью. Однако имплантаты из PLA расщепляются и замещаются костной тканью, по данным разных авторов, не ранее, чем через 7 лет после имплантации [3]. По другим данным, PLA-винты находятся в живой кости человека не менее 5 лет. Во всех динамических клинических наблюдениях не отмечено ни одного случая замещения рассасывающегося полимерного имплантата костью в указанные сроки [4]. При этом на российском рынке ортопедии и травматологии представлены исключительно изделия зарубежных фирм Smith&Nephew, Stryker, Depuy Mitek, Karl Storz, Inion. В связи с этим разработка импортозамещающих технологий изготовления и модификации имплантатов из биodeградируемых (со)полимеров и их композитов является весьма актуальной.

Обширные дефекты костей (например, при онкологии) требуют использования имплантатов со сложной геометрией, которую можно получить с помощью компьютерной томографии раневого дефекта, обработки первичных изображений для трехмерной (3D) реконструкции зоны интереса,

изготовления индивидуального изделия. В этом плане при создании 3D-конструкций (матриц, скеффолдов, каркасов и т.п.) перспективным подходом признаны различные способы послойного формирования 3D-объектов по их компьютерным образам (технологии прототипирования). Проблема заключается в хрупкости получаемых изделий (струйная печать, стереолитография), невысокой точности в микрометровом масштабе либо неприменимости для биополимеров (лазерное спекание, послойная полимеризация).

Кроме того, аддитивные технологии (3D-печать) не означают однозначную остеоинтеграцию имплантируемого материала. Соблюдаются только принципы точной подгонки материала к геометрии макроскопического дефекта, их биомеханической совместимости. Способность искусственного материала стимулировать рост здоровых костных клеток (регенеративная медицина) выходит за рамки данной технологии.

Для преодоления проблемы предлагаются различные технологические комбинации биodeградируемых полимеров, например с фосфатами кальция [5, 6], известными остеозамещающими материалами.

Цель исследования – оценить *ex vivo* физико-химические и биологические свойства 3D-биodeградируемых матриц «полимолочная кислота – фосфаты кальция», полученных с помощью 3D-печати, как потенциальных материалов для восстановления костной ткани.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах *in vitro* применяли 19 экспериментальных образцов композитных биodeградируемых 3D-матриц (далее – 3D-композиты). Образцы изготовлены в виде дисков толщиной 1,2–1,6 мм и диаметром 11 или 8 мм из исходной смеси 95 мас.% полимолочной кислоты (Natural Works Ingeo 40-43d, NatureWorks LLC, США) и 5 мас.% гидроксиапатита (HAP), введенного в форме частиц размером менее 75 мкм (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

| Сравнение смоделированных в компьютерной модели и реальных параметров экспериментальных образцов композитных биodeградируемых 3D-матриц из полимолочной кислоты и частиц гидроксиапатита, мм |                |                  |                |                  |                        |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| Маркировка                                                                                                                                                                                   | Диаметр модели | Диаметр образцов | Толщина модели | Толщина образцов | Ширина бороздок модели | Ширина бороздок образцов |
| M03                                                                                                                                                                                          | 11             | 11               | 1,5            | 1,4–1,6          | 0,3–0,5                | 0,4–0,5                  |
| M02                                                                                                                                                                                          | 8              | 8                | 1,3            | 1,2–1,3          | 0,3–0,5                | 0,4–0,5                  |

Порошок синтетического НАР получен механо-химическим способом [7]. В качестве контроля использовали 19 дисков из 100 мас.% полилактида (PLA). Нить диаметром 1,75 мм для изготовления образцов получали при 121 °С с помощью экструдера Wellzoom Type A (Shenzhen Mistar Technology Co., КНР).

Проектирование 3D-моделей образцов осуществлялось в программной среде с открытым исходным кодом Blender. 3D-модели различались диаметром изделия, толщиной и размерами бороздок на поверхности (см. табл. 1, рис. 1). Макрорельеф (бороздки) создавали для улучшения потенциальных остеогенных свойств экспериментальных образцов согласно алгоритму работ, ранее проведенных на кальцийфосфатных материалах [8].

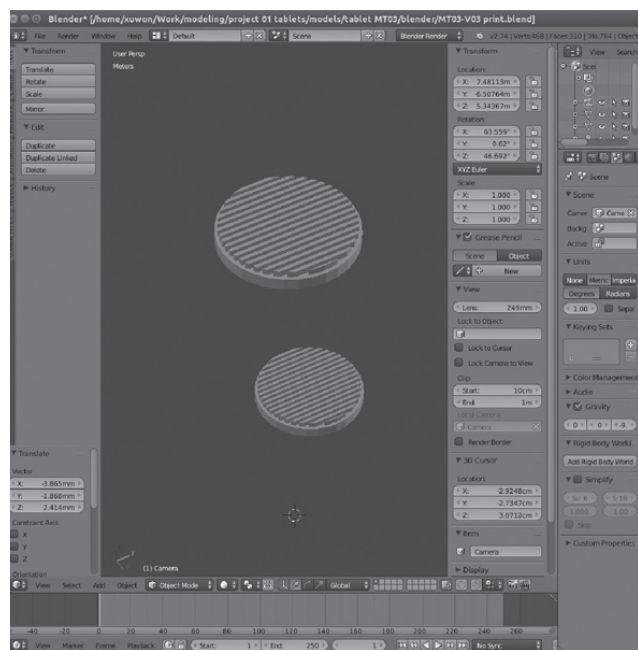


Рис. 1. Сравнение компьютерных моделей M03 (диаметр 11 мм) и M02 (диаметр 8 мм) экспериментального образца композитных биodeградируемых 3D-матриц: изометрическая проекция

Построенные 3D-модели экспериментальных образцов подвергали анализу методом конечных элементов. Для симуляционного анализа (верификации) сочетания морфологических и (или) меха-

нических свойств 3D-модели использовали FEM Workbench программного продукта FreeCAD. Подготовка верифицированных 3D-моделей к 3D-печати, заключающаяся в преобразовании модели из STL формата в G-code, осуществлялась с использованием программы Makerbot Desktop. Образцы получали методом послойного наплавления нитей (FFF) при помощи 3D-принтера CreatBot Duo (CreatBot 3D Printer, КНР). Массу напечатанных изделий определяли на аналитических электронных весах GR-202 (A&D, Япония) I класса точности по ГОСТ Р 53228-2008.

Исследование морфологии и элементного состава поверхности образцов осуществляли при помощи растрового электронного микроскопа (РЭМ) LEO EVO 50 – INCA Energy 350 (Carl Zeiss Jena, Германия) с приставкой для микроанализа EDAX, которая была использована для определения элементного состава покрытия. Оптическую отражающую микроскопию макрорельефа поверхности проводили с помощью инвертированного металлографического микроскопа Olympus GX-71 (Япония).

По шесть штук PLA-образцов и 3D-композитов использовали для тестирования их физико-химических свойств. Шероховатость поверхности 3D-образцов определяли с помощью профилометра-296 (Россия) согласно ГОСТ 2789-73 по индексу  $R_a$ , значение которого рассчитывалось как среднее арифметическое отклонение профиля поверхности в пределах базовой длины измерения 1,5 мм.

Электростатический потенциал поверхности определяли специализированным аппаратным комплексом для измерения поверхностной плотности заряда и потенциала поверхности, как описано нами ранее [9]. В основу методики измерения потенциала покрытий положен метод подъемного электрода (метод Егучи).

Измерения краевого угла смачивания деионизированной водой и глицерином проводили на воздухе методом лежащей капли (3 мкл) при комнатной температуре посредством Contact Angle Measuring Module DSA20 EasyDrop (KRÜSS, Германия) с помощью программного обеспечения DSA1, как описано ранее [10]. Поверхностную

энергию рассчитывали по уравнению Оуэнса – Вендта [11].

Перед биологическими испытаниями образцы автоклавируют в течение 30 мин при 121 °С и 1 атм. Для тестирования цитотоксичности *in vitro* использовали восемь экспериментальных образцов 3D-композитов и восемь PLA-дисков диаметром 8 мм (контроль). На трех тестируемых или контрольных образцах изучали их влияние на жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здорового добровольца. Еще по пять экспериментальных образцов из каждой исследуемой группы применяли для изучения их цитотоксичности в отношении линии Jurkat 5332 лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека (далее Jurkat Т-клетки).

В качестве здоровых клеток-мишеней использовали первичную культуру мононуклеарных лейкоцитов крови. Периферическую кровь здорового добровольца собирали в стерильных условиях в пробирки Vacuette (BD Diagnostics, США). Фракцию мононуклеарных лейкоцитов выделяли из крови методом центрифугирования в течение 10 мин при 500 g с использованием градиента плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ) и двукратным отмыванием взвеси клеток от реактива фосфатным буфером.

Взвесь мононуклеарных лейкоцитов (исходная жизнеспособность более 95% согласно тесту с 0,4%-м трипановым синим) культивировали в пяти конических пластиковых пробирках объемом 15 мл при температуре 37 °С в концентрации  $3 \times 10^6$  нуклеаров/мл культуральной среды следующего состава: 100% среды DMEM/F12 (1:1) (Gibco Life Technologies, США), 10 mM буфера HEPES (Sigma-Aldrich, США), 280 мг/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США).

Для изучения цитотоксичности в отношении опухолевых клеток применяли Jurkat Т-клетки (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) с исходной жизнеспособностью 98% согласно тесту с 0,4%-м трипановым синим. Jurkat Т-клетки культивировали в пяти лунках 24-луночного планшета (Orange Scientific, Бельгия) при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/мл полной питательной среды, состоящей из 90% RPMI-1640 (Sigma, США), 10% инактивированной (56 °С в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma-Aldrich, США) и 0,3 мг/мл L-глутамина (Sigma-Aldrich, США).

В культуральные сосуды помещали по одному тестируемому образцу и сокультивировали клеточную взвесь в течение 24 ч. Контролем служила клеточная взвесь без экспериментальных образцов.

После инкубации клеточную взвесь центрифугировали при 500 g в течение 15 мин, надосадок замещали 1 мл культуральной среды. Клеточный осадок ресуспендировали для оценки жизнеспособности клеток. Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов крови оценивали согласно рекомендациям ISO 10993-5 по их способности исключать окрашивание (не окрашиваться) 0,4%-м раствором трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Число окрашенных и (или) неокрашенных лейкоцитов определяли в камере Горяева с помощью микроскопа ZEISS Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Процентное соотношение живых и погибших (апоптоз, некроз) форм Jurkat Т-клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате Guava EasyCytePlus (Millipore, США) с использованием реагента и программы Guava Via Count (Millipore, США).

Для определения *in vitro* влияния образцов на остеогенный потенциал стромальных стволовых клеток использовали по пять штук 3D-композитов или PLA-образцов диаметром 11 мм. В качестве клеток-мишеней использовали культуру постнатальных стромальных стволовых клеток (далее – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК)), выделенных из жировой ткани человека методом липоаспирации (разрешение № 4 от 23.10.2013 локального этического комитета Инновационного парка Балтийского федерального университета имени И. Канта, г. Калининград). Подобные клетки *in vitro* способны дифференцироваться и давать начало трем типам клеток (остеобласты, хондробласты, фибробласты), что соответствует критериям стволовых клеток, установленным The International Society for Cellular Therapy (ISCT) [12].

ММСК в концентрации  $3 \times 10^4$  клеток/лунку помещали в 24-луночные планшеты (Orange Scientific, Бельгия) в 1 мл среды обычного состава (контроль роста 1): 90% среды DMEM/F12 (1 : 1) (Gibco Life Technologies, США), 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/л гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 280 мг/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США). В часть лунок перед добавлением культуральной среды помещали тестируемые образцы в количестве 1 штука/лунку.

Для выявления потенциальной способности коммитирования ММСК в остеобласты часть клеток культивировали в 1 мл бесывороточной остеогенной среды из набора StemPro® Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя (контроль роста 2).

Супернатанты (межклеточные жидкости) отделяли от клеточных культур на 14-, 17-, 21-е сут культивирования, собирали в пробирки, центрифугировали при 500 g в течение 10 мин. Количественное определение остеокальцина осуществляли с помощью тест-системы Osteometer BioTech A/S N-MID Osteocalcin One Step ELISA (Nordicbioscience diagnostics, Дания) для иммуноферментного анализа (ИФА). Исследование проводилось по стандартной схеме проведения ИФА.

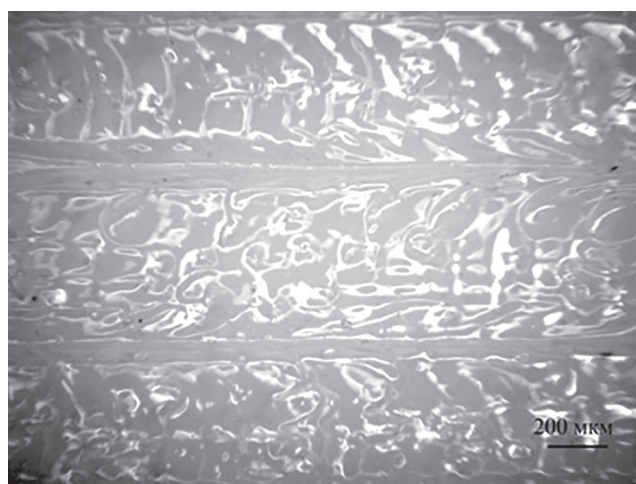
Через 21 сут культивирования тестируемые образцы удаляли, сушили на воздухе. Клетки, прилипшие к пластику в лунках, окрашивали 2%-м раствором красителя ализарин красный S. A5533 (Sigma-Aldrich, США). Участки розово-малинового окрашивания, свидетельствующие об осаждении кальция (процессе минерализации) на костных клетках, документировали с помощью программы ZEN 2012 (Carl Zeiss Microscopy, Германия) на микроскопе ZEISS Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Статистическая обработка данных осуществ-

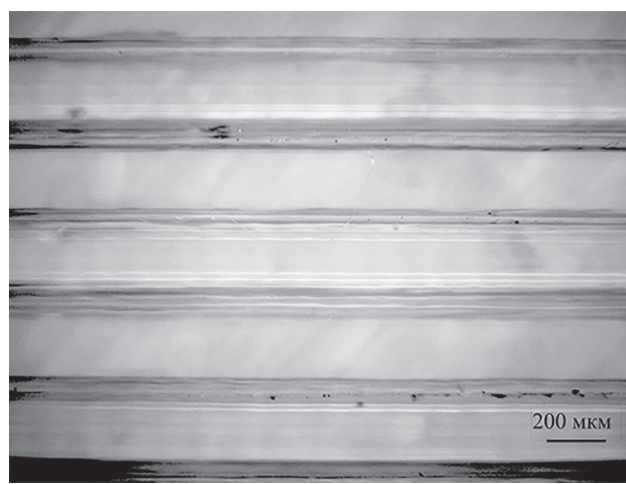
лялась с помощью программы STATISTICA for Windows 10.0. Рассчитывали параметры распределений: медиану ( $Me$ ), 25%-й квартиль ( $Q_1$ ) и 75%-й квартиль ( $Q_3$ ). Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ с помощью отражающей оптической микроскопии (рис. 2), модельных и реальных параметров изделий, полученных после 3D-печати (см. табл. 1), подтвердил возможность применения выбранного метода прототипирования для воспроизведения в реальном образце геометрических характеристик, смоделированных на компьютере. Расстояние между бороздками в 3D-композитах примерно в 1,5 раза превышало таковое в PLA-образцах, что может быть связано с большей вязкостью композитного материала, которая влияет на скорость выхода нити из сопла печатающего устройства.



а



б

Рис. 2. Отражающая оптическая микроскопия макрорельефа поверхности: а – композитных биодеградируемых 3D-матрикс; б – полилактидных дисков без добавления гидроксиапатита. Темное поле, ув. 10

Известно, что масса имплантатов является одним из критических параметров его использования в клинической практике. Взвешивание 3D-композитов показало, что их масса статистически значимо не отличалась от массы чистых PLA-образцов с сопоставимым диаметром и рельефом. При диаметре 11 мм средняя масса пяти PLA-дисков составила  $(165 \pm 1)$  мг, что соответствовало массе пяти экспериментальных образцов 3D-композитов  $(165 \pm 17)$  мг. Для сравнения: масса композитов «титан-кальцийфосфатное

микродуговое покрытие», широко применяемых в ортопедии и травматологии при аналогичных размерах варьирует в пределах 400–600 мг.

Таким образом, добавление частиц НАР в полимерный состав не вызывает значимых изменений в массе образцов и, с другой стороны, позволяет надеяться на улучшение биологических свойств 3D-композитов при испытаниях *in vitro* и *in vivo* в приложении к биоинженерии костной ткани.

Согласно выполненным физико-химическим тестам (табл. 2), 3D-печать не влияла на извест-

ные из литературных источников [2] гидрофобные свойства PLA-образцов (контактный угол смачивания водой 82°). Приблизительно равномерное распределение дисперсионной и по-

лярной составляющей поверхностной энергии обусловлено наличием в составе полимера неполярных (C—C, C—H) и полярных связей (C—O, C=O).

Т а б л и ц а 2

| Сравнительные физико-химические характеристики полилактидных образцов и композитных биodeградируемых 3D-матриц (диаметр 11 мм) полимолочной кислоты с частицами гидроксиапатита, изготовленных методом послойного наплавления нитей, Me (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>2</sub> ) |                                                                                  |            |                         |                            |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|----------------------------|---------|
| № п/п                                                                                                                                                                                                                                                                      | Параметр                                                                         | Ед. изм.   | 3D-композиты PLA-HAP    | PLA-диски                  | p       |
| 1                                                                                                                                                                                                                                                                          | Амплитуда электростатического потенциала поверхности (рельефная сторона), n = 25 | В          | –36,3 (–36,3; 13,4)     | –36,3                      | < 0,001 |
| 2                                                                                                                                                                                                                                                                          | Амплитуда электростатического потенциала поверхности (гладкая сторона), n = 25   | В          | –36,3 (–36,3; –13,2)    | –36,3                      | < 0,001 |
| 3                                                                                                                                                                                                                                                                          | Индекс Ra шероховатости поверхности (гладкая сторона), n = 50                    | мкм        | 0,70 (0,46; 0,94)       | 0,70 (0,54; 1,07)          | > 0,05  |
| 4                                                                                                                                                                                                                                                                          | Наличие кальция в составе образца, n = 20                                        | массовые % | 1,52 (1,20; 1,95)       | 0                          | < 0,001 |
| 5                                                                                                                                                                                                                                                                          | Наличие фосфора в составе образца, n = 20                                        | массовые % | 0,77 (0,65; 1,0)        | 0                          | < 0,001 |
| 6                                                                                                                                                                                                                                                                          | Соотношение кальция (атомные %) к фосфору (атомные %), n = 20                    | усл. ед.   | 1,45 (1,39; 1,52)       | 0                          | < 0,001 |
| 7                                                                                                                                                                                                                                                                          | <i>Концентрации токсичных элементов в образцах</i>                               |            |                         |                            |         |
| 7.1                                                                                                                                                                                                                                                                        | Al (n = 20)                                                                      | атомные %  | 0 (0; 0,01)             | 0                          | > 0,05  |
| 7.2                                                                                                                                                                                                                                                                        | Mn (n = 6–9)                                                                     | атомные %  | 0<br>n = 9              | 0,01<br>(0; 0,01)<br>n = 6 | > 0,05  |
| 7.3                                                                                                                                                                                                                                                                        | Fe (n = 6–9)                                                                     |            | 0<br>n = 9              | 0<br>n = 6                 | > 0,05  |
| 7.4                                                                                                                                                                                                                                                                        | Sn (n = 6–9)                                                                     |            | 0,01 (0; 0,01)<br>n = 9 | 0<br>n = 6                 | > 0,05  |
| 8                                                                                                                                                                                                                                                                          | Контактный угол смачивания водой (n = 9)                                         | градус     | 82 (73; 83)             | 82 (81; 85)                | > 0,05  |
| 9                                                                                                                                                                                                                                                                          | Величина поверхностной энергии (n = 9)                                           | мН/м       | 28 (25; 31)             | 26 (25; 27)                | > 0,05  |
| 9.1                                                                                                                                                                                                                                                                        | дисперсионная компонента                                                         | мН/м       | 7 (4; 15)               | 15 (13; 17)                | > 0,05  |
| 9.2                                                                                                                                                                                                                                                                        | полярная компонента                                                              | мН/м       | 21 (11; 25)             | 11 (8; 14)                 | > 0,05  |

Примечание. n – количество измерений.

Считается, что увеличение гидрофильности полимерной поверхности улучшает клеточную адгезию [13]. Введение HAP в полимерный материал существенно не меняло гидрофильность и (или) гидрофобность 3D-композитов. Вместе с тем тенденция к 3-кратному увеличению медианы распределения полярной компоненты поверхностной энергии предполагает наличие в составе композитов дополнительных заряженных частиц.

Микроанализ элементного состава в точечных областях 3D-композитов показал наличие фосфора и кальция в концентрации 1–2 мас.% соответственно. В свою очередь чистые PLA-образцы состояли на 65–70 мас.% из углерода и 30–35 мас.% кислорода.

Наличие кальция и фосфора в имплантатах является важнейшим условием их остеогенной активности [14]. При этом медленная динамика растворения полилактидных матриц [15] позволяет их рассматривать в качестве потенциальных

систем длительного высвобождения ионов кальция и фосфора. Примеси токсичных металлов, которые могли присутствовать в исходных ингредиентах и инкорпорироваться в процессе изготовления образцов, не определялись или были обнаружены в следовых количествах (см. табл. 2). Это позволило исключить их вклад в возможную цитотоксичность тестируемых образцов.

Другими характеристиками, способствующими росту костных клеток и биоинженерии костной ткани, являются микрорельеф (шероховатость) поверхности [14], отрицательный знак ее заряда и оптимальная величина электростатического потенциала [16]. Известно, что полимеры в сравнении с металлами и керамикой имеют низкие значения поверхностной энергии [17], что позволяет микротопографии поверхности играть ведущую роль в регуляции жизнедеятельности клеток [10].

В этом плане 3D-композиты PLA-HAP при одинаковой шероховатости поверхности с PLA-

образцами имеют биомедицинское преимущество в ограничении амплитуды поверхностного потенциала в сравнении с PLA-образцами (см. табл. 2). Амплитуда отрицательного электростатического потенциала на PLA-поверхности превышала предел измерительного прибора (36,3 В). На трех из пяти изученных 3D-композитов зафиксировано снижение амплитуды и (или) реверсия знака заряда (с отрицательного на положительный) на разных сторонах образцов. Можно предположить неравномерное распределение частиц НАР при изготовлении композитной нити для 3D-печати и (или) печати самих образцов как следствие изменения вязкости композитного материала.

При оценке перспектив новых материалов биомедицинского назначения международные и российские стандарты рекомендуют начинать изучение их биосовместимости с тестов *in vitro* [18]. Перед проведением исследований *in vivo* новых композитов уже известных материалов следует исключить их потенциальную токсичность в отношении морфологии и функциональной активности клеток млекопитающих.

Одним из основных методов, согласно рекомендациям ISO 10993-5, ГОСТ Р ИСО 10993-5, является определение способности клеток противостоять проницаемости мембран для витальных красителей (жизнеспособности) после прямого контакта с изделием и (или) воздействия его

вытяжек. Подходящим объектом для изучения цитотоксичности являются клетки крови и иммунной системы, реагирующие на любое экстремальное воздействие на организм [19].

Мононуклеарные лейкоциты крови принимают активное участие в реакциях приживления и (или) отторжения имплантатов [18]. Согласно полученным результатам, доля жизнеспособных лейкоцитов при добавлении к клеточной суспензии тестируемых образцов 3D-композитов PLA-НАР составила 100%, PLA-дисков – 80–100%, что статистически значимо не отличалось от показателя в контрольной культуре клеток (100%), не контактировавших с искусственными материалами.

На лейкозных Jurkat Т-клетках изучают иммунные и цитотоксические реакции на биоматериалы [20]. В представленных исследованиях не применялись митогены, цитокины и химические активаторы, увеличивающие концентрацию факторов роста в супернатантах клеточных культур в сотни раз [21], что способствует адаптации (выживанию) культуры Jurkat Т-клеток *in vitro*, трудно достижимой в естественных условиях.

В среде без митогенов 3D-композиты вызывали статистически значимое снижение на 9–10% жизнеспособности опухолевых клеток крови в сравнении как с контролем (культура клеток без образцов), так и с PLA-дисками (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

| Результаты <i>in vitro</i> цитотоксичности тестируемых образцов после 24 ч сокультивирования с опухолевыми Jurkat Т-клетками, $Me (Q_1; Q_3)$ |                                                     |                                                           |                                                    |                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| № п/п                                                                                                                                         | Группа наблюдений                                   | Jurkat Т-клетки, $n = 15$                                 |                                                    |                                                       |
|                                                                                                                                               |                                                     | Количество жизнеспособных клеток, %                       | Количество погибших клеток, %                      |                                                       |
|                                                                                                                                               |                                                     |                                                           | Апоптоз                                            | Некроз                                                |
| 1                                                                                                                                             | Культура клеток без образцов (контроль токсичности) | 81,5<br>(80,1; 83,6)                                      | 4,6<br>(4,2; 4,9)                                  | 14,8<br>(12; 15,6)                                    |
| 2                                                                                                                                             | Культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-НАР | 72,9<br>(69,4; 78,6)<br>$p_1 < 0,0004$<br>$p_3 < 0,00002$ | 5,6<br>(4,7; 6,3)<br>$p_1 < 0,02$<br>$p_3 < 0,009$ | 21,0<br>(17; 24)<br>$p_1 < 0,0007$<br>$p_3 < 0,00004$ |
| 3                                                                                                                                             | Культура клеток в присутствии PLA-дисков            | 82,6<br>(80,7; 87,1)                                      | 4,4<br>(3,9; 5,1)                                  | 12,4<br>(8; 13,5)<br>$p_1 < 0,04$                     |

П р и м е ч а н и е.  $n$  – количество исследованных проб;  $p_1, p_3$  – статистически значимые различия с группами 1 и 3 соответственно.

Гибель клеток была обусловлена усилением процессов апоптоза и в большей степени некроза. При этом PLA-изделия, напротив, уменьшали число некротических форм Jurkat Т-клеток по сравнению с контролем без образцов.

Изменение морфофункционального состояния Jurkat Т-клеток было установлено ранее при краткосрочном контакте с кальцийфосфатным (КФ) покрытием, сформированным методом вы-

сокочастотного магнетронного распыления на титане [22]. При этом микродуговые КФ-покрытия при 24-часовом контакте снижают выживаемость культуры Jurkat Т-клеток [23]. Возможно, существуют общие закономерности негативной реакции Jurkat Т-клеток на фосфаты кальция, которые способны выделяться в межклеточную жидкость при биодеградациии композитных материалов. В этом плане полученные результаты

согласуются с некоторыми литературными ссылками о цитотоксичности аморфных (растворимых) фосфатов кальция [24].

Существующие в настоящее время основные классы материалов для биологии и медицины (металлы и их сплавы, разновидности керамики, полимеры, углеродные волокна) при всех достоинствах не удовлетворяют полностью характеристикам живых тканей. В конечном итоге это приводит к клинической ситуации, которая называется «неуспех имплантата»: расшатывание, нарушение его целостности, присоединение инфекционных агентов, что заставляет удалять изделие раньше положенного срока службы. Возникают реальные социально-экономические потери для самого пациента и государства.

Поэтому разработка композитных матриц, которые способны воспроизводить клеточное и тканевое микроокружение, рассматривается как обещающее направление биоинженерии

биологических тканей. При этом считается, что особенности внеклеточного матрикса способны регулировать направление дифференцировки и созревания стромальных стволовых клеток [25].

Способность клетки к дифференцировке и созреванию возможно определить с помощью цито(гисто)химических и биохимических методик. В качестве молекулярного маркера остеогенной дифференцировки ММСК часто используется остеокальцин – межклеточный белок, являющийся растворимым компонентом костного матрикса и выделяемый секреторными (зрелыми) остеобластами [26].

Согласно данным табл. 4, длительное культивирование ММСК жировой ткани человека в стандартной культуральной среде (без остеогенных добавок; контроль роста 1) на пластике не сопровождалось значительной секрецией остеокальцина в изученные сроки эксперимента.

Таблица 4

| Концентрация остеокальцина (нг/мл) в межклеточной среде культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (контроль роста 1) в различные сроки контакта с тестируемыми образцами, $Me(Q_1; Q_2)$ |                                                                                     |                                          |                                          |                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|
| № п/п                                                                                                                                                                                                                            | Группа наблюдений                                                                   | Сроки контакта, сут                      |                                          |                      |
|                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                     | 14                                       | 17                                       | 21                   |
| 1                                                                                                                                                                                                                                | Контрольная культура клеток без образцов (контроль роста 1)                         | 0,82<br>(0,76; 0,88)                     | 0,88<br>(0,82; 0,94)                     | 0,94<br>(0,94; 1,0)  |
| 2                                                                                                                                                                                                                                | Культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-HAP                                 | 0,59<br>(0,53; 0,70)                     | 0,70<br>(0,59; 0,76)                     | 0,88<br>(0,88; 1,0)  |
| 3                                                                                                                                                                                                                                | Культура клеток в присутствии PLA-дисков                                            | 0,88<br>(0,88; 1,00)                     | 0,70<br>(0,70; 1,05)                     | 1,09<br>(0,41; 1,35) |
| 4                                                                                                                                                                                                                                | Культура клеток без образцов в бессывороточной остеогенной среде (контроль роста 2) | 1,29<br>(1,26; 1,50)<br>$p_{1,2} < 0,01$ | 1,70<br>(1,05; 1,87)<br>$p_{1,2} < 0,02$ | 0,88<br>(0,88; 1,17) |

Примечание.  $p_1, p_2$  – статистически значимые различия с группами 1, 2 соответственно; количество исследованных образцов (лунок в планшете) в каждой группе  $n = 5$ .

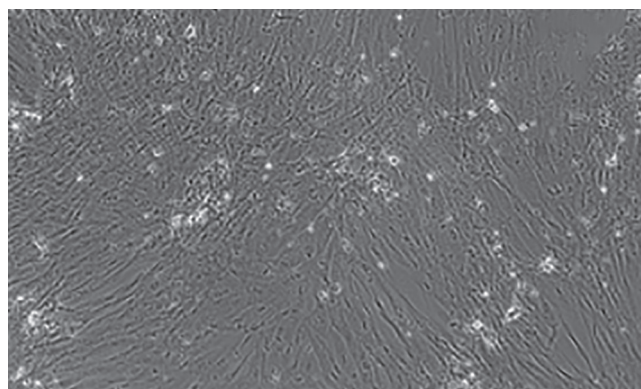
Соответственно ММСК жировой ткани, взаимодействующие с тестируемыми 3D-композитами и PLA-образцами, не получали преимуществ в секреции остеокальцина в сравнении с контролем роста 1 (см. табл. 4).

Остеогенная среда включает в свой состав гуморальные индукторы генов дифференцировки и созревания (как правило, дексаметазон, бета-глицерофосфат, аскорбиновую кислоту). Результаты показали, что специализированная остеогенная среда (контроль роста 2) только в 1,5–2 раза в сравнении с контролем роста 1 стимулировала секрецию остеокальцина на 14–17-е сут. К концу периода наблюдений (21-е сут) концентрация белка в контроле роста 2 значительно уменьшилась и не отличалась от таковой в других группах наблюдения (см. табл. 4).

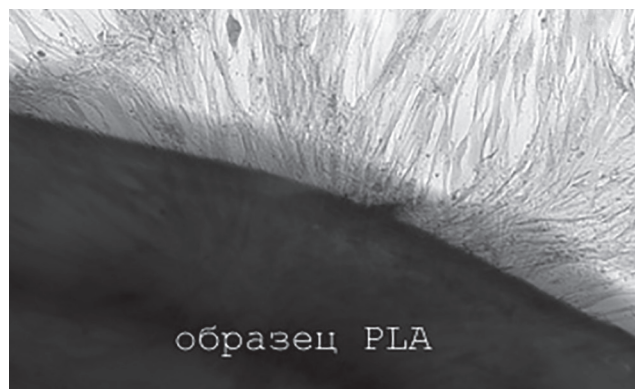
Другими словами, использованная культура ММСК обладала слабыми секреторными способностями, что не позволило в использованные сроки эксперимента установить влияние тестируемых матриц на выделение остеокальцина в межклеточную жидкость. Тем не менее тестируемые образцы, как минимум, не снижали способность ММСК секретировать остеокальцин в стандартной культуральной среде без остеогенных добавок.

Более наглядные результаты были получены при окраске клеточных культур ализарином красным на 21-е сут исследования (рис. 3). Ализарин красный имеет сродство к катионам, в том числе кальция, и дает прочное окрашивание в местах его отложения (участках минерализации – кальцификации).

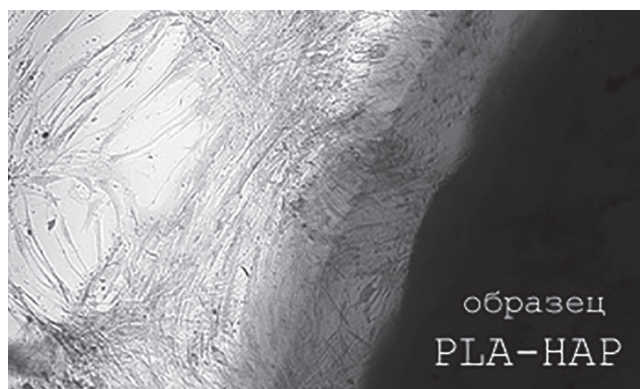
В специализированной остеогенной среде (контроль роста 2) к 21-м сут эксперимента отмечены множественные участки культуры клеток с интенсивным малиново-красным окрашиванием (рис. 3, з), свидетельствующие об отложении солей кальция на клетках. Согласно известному ионному составу культуральной среды, это, прежде всего, фосфаты кальция, являющиеся, как известно [26], основным компонентом минерального матрикса кости. Напротив, в контроле роста 1 (рис. 3, а) ММСК практически не воспринимали краситель.



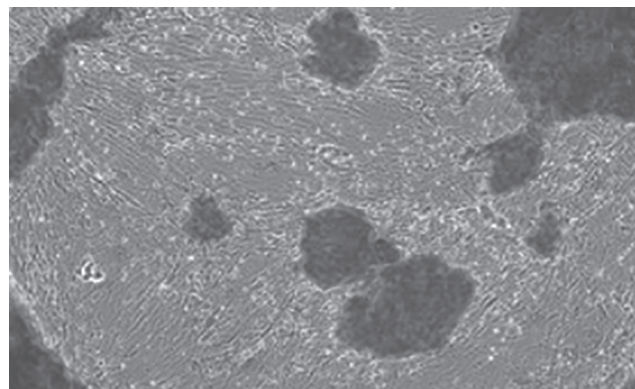
а



б



в



з

Рис. 3. 21-суточная культура ММСК жировой ткани человека с участками минерализации, окрашенными ализарином красным: а – контроль роста 1 (стандартная культуральная среда); б – культура клеток в присутствии PLA-образцов; в – культура клеток в присутствии 3D-композитов PLA-HAP; з – контроль роста 2 (бессывороточная остеогенная среда). Ув. 100

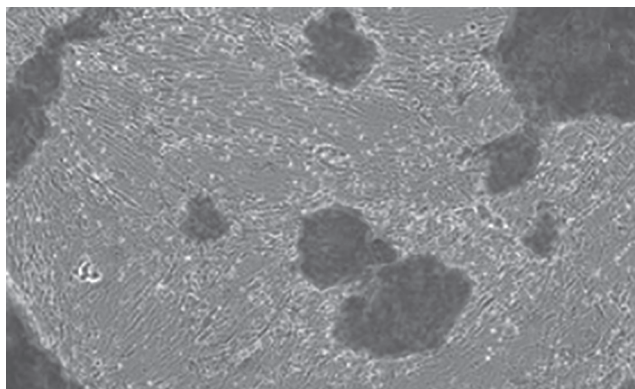
Таким образом, композитные биodeградируемые 3D-матриксы PLA-HAP способны усиливать *in vitro* минерализацию межклеточного матрикса. Это может быть проявлением их специфической остеогенной активности (механизма действия) в отношении стимулирования роста, дифференцировки и созревания ММСК в костные клетки. Известно, что минерализация межклеточного матрикса является одной из основных функций остеобластов [26].

По-видимому, наличие в составе 3D-композитов частиц HAP позволяет им при 21-суточном медленном растворении в клеточной культуре вы-

ступать для ММСК в качестве источника ионов кальция, фосфора, а также фосфатов кальция. Фосфаты кальция являются промоторами пролиферации остеобластов, вызывают их активацию [27], способствуют остеогенной дифференцировке ММСК [28]. При этом растворение фосфатов кальция является важным компонентом усиления их остеогенных свойств [29].



б



з

ступать для ММСК в качестве источника ионов кальция, фосфора, а также фосфатов кальция. Фосфаты кальция являются промоторами пролиферации остеобластов, вызывают их активацию [27], способствуют остеогенной дифференцировке ММСК [28]. При этом растворение фосфатов кальция является важным компонентом усиления их остеогенных свойств [29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что характеристики трехмерных биodeгра-

дируемых матриц PLA-НАР, полученных методом 3D-печати, во многом соответствуют физико-химическим параметрам, критичным для восстановления костной ткани. При небольшом содержании кальция и фосфора они способствуют *ex vivo* минерализации межклеточного вещества, формируемого в культуре ММСЖ жировой ткани человека. При 24-часовом контакте *in vitro* 3D-компози́ты PLA-НАР в отличие от PLA-образцов усиливают гибель лейкозных Т-лимфобластоподобных клеток человека линии Jurkat 5332, но не мононуклеарных лейкоцитов здорового добровольца.

Основная стратегия (иммуно)биотерапии лейкемии связана с индукцией апоптоза лейкозных клеток [30]. Полярная реакция здоровых и опухолевых клеток на образцы PLA-НАР в случае увеличения содержания фосфатов кальция и решения методических вопросов равномерности их распределения в композитном материале может иметь значение при разработке новых материалов для эндопротезирования и остеосинтеза переломов у больных, страдающих гемобласто́зами.

## 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

Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985). Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований (разрешение локального этического комитета № 1923 от 15.03.2011 Сибирского государственного медицинского университета).

## ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Авторы выражают признательность профессору Ю.П. Шаркееву и В.В. Чебодаевой (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск), а также канд. биол. наук В.В. Шуплецовой (Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград) за помощь в организации и проведении исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates – Plastic materials of the 21<sup>st</sup> century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub., 2004: 282.
2. Eling B., Gogolewski S., Pennings A.J. Biodegradable materials of poly(l-lactic acid): 1. Meltspun and solution spun fibers // *Polymer*. 1982; 23: 1587–1593.
3. Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws. An experimental long-term study in sheep // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2022; 122: 360–364.
4. Заргородный Н.В., Королев А.В., Ахпашев А.А., Гнелица Н.Н., Ильин Д.О., Хасаншин М.М., Лягин А.С. Поведение имплантатов в костной ткани в различные сроки согласно МРТ-исследованию // Режим доступа: <http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu/>
5. Shishatskaya E.I., Khlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, *in vitro* and *in vivo* investigation // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2006; 17 (5): 481–498.
6. Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V., Antonova L.V., Golovkin A.S., Matveeva V.G., Petlin D.G., Anissimov Y.G. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility // *Appl. Surf. Sci.* 2015; 329: 32–39.
7. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure // *Problems of Materials Science*. 2008; 54 (2): 219–232.
8. Хлусов И.А., Карлов А.В., Суходоло И.В. Генез костной ткани на поверхности имплантатов для остеосинтеза // *Гений ортопедии*. 2003; 3: 16–26.
9. Khlusov I.A., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Yu., Gutor S.S., Tolkacheva T.V. Influence of the Structure of the Titanium Oxide Coating Surface on Immunocompetent Tumor Cells // *Russian Physics Journal*. 2016; 58 (11): 1527–1533.
10. Bykova Iu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khlusov I. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2014; 25 (8): 1843–1852. doi: 10.1007/s10856-014-5222-4.
11. Owens D.K., Wendt R.C. Estimation of the surface free energy of polymers // *J. Appl. Polym. Sci.* 1969; 13: 1741–1747.
12. Kfoury Y., David T., Scadden D.T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche // *Cell Stem Cell*. 2015; 16: 239–253.

13. Steward A.J., Liu Y., Wagner D.R. Engineering cell attachments to scaffolds in cartilage tissue engineering // *Biomater. Regen. Med. Eng.* 2011; 63: 74–82.
14. Khlusov I.A., Karlov A.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Kolobov Yu.R., Shashkina G.A., Ivanov M.B., Legostaeva E.V., Sukhikh G.T. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 140 (1): 144–152.
15. 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.
16. Khlusov I.A., Khlusova M.Y., Pichugin V.F., Sharkeev Y.P., Legostaeva E.V. Artificial Niches for Stromal Stem Cells as a Potential Instrument for the Design of the Surface of Biomimetic Osteogenic Materials // *Russian Physics Journal*. 2014; 56 (10): 1206–1211.
17. Hallab N.J., Bundy K.J., O'Connor K., Moses R.L., Jacobs J.J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion // *Tissue Eng.* 2001; 7: 55–71.
18. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2<sup>nd</sup> edition / Eds. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, & J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004; 851 p.
19. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Хлусов И.А. Роль вегетативной нервной системы в регуляции гемопоэза. Томск, 1997; 218 с.
20. Stevens M.J., Donato L.J., Lower S.K., Sahai N. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes // *Langmuir*. 2009; 25 (11): 6270–6278. doi: 10.1021/la8040192.
21. Terui Y., Ikeda M., Tomizuka H., Kasahara T., Ohtsuki T., Uwai M., Mori M., Itoh T., Tanaka M., Yamada M., Shimamura S., Ishizaka Y., Ikeda K., Ozawa K., Miura Y., Hatake K. Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial interleukin-8 // *Blood*. 1998; 92 (8): 2672–2680.
22. Хлусов И.А., Сурменева М.А., Сурменев Р.А., Рязанцева Н.В., Савельева О.Е., Иванова А.А., Прохоренко Т.С., Таширева Л.А., Дворниченко М.В., Пичугин В.Ф. Клеточно-молекулярные аспекты иммунологической совместимости имплантатов с наноструктурным кальцийфосфатным покрытием // *Бюл. сиб. медицины*. 2012; 4: 78–85.
23. Хлусов И.А., Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Дунец Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П. Морфофункциональные изменения Т-лимфоцитов линии Jurkat при краткосрочной контакте с рельефной кальцийфосфатной поверхностью // *Цитология*. 2017; 11 (1) (в печати).
24. Oreffo R.O.C., Driessens F.C.M., Planell J.A., Triffitt J.T. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements // *Biomaterials*. 1998; 19: 1845–1854.
25. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation // *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9: 204–219.
26. Риггз Б.А., Мелтон Л.Дж. Остеопороз: пер. с англ. СПб.: БИНОМ, Невский диалект, 2000. 560 с.
27. Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 38: 121–127.
28. Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y. Detection *in vitro* and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells // *Methods Mol. Biol.* 2013; 1035: 103–119. doi: 10.1007/978-1-62703-508-8\_9.
29. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P., Alexander H., Patat J.L. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // *Calcif Tissue Int.* 1994; 55: 151–158.
30. Fisher D.E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold // *Cell*. 1994; 78: 539–542.

Поступила в редакцию 01.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Дружинина Татьяна Валентиновна**, канд. мед. наук, ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Москва.

**Талалаев Сергей Яковлевич**, зам. директора по науке, ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Москва.

**Закиров Назар Пулатович**, первый заместитель директора, ФГУП «Экспериментально-производственные мастерские» ФМБА России, г. Москва.

**Щаденко Сергей Владимирович**, ассистент кафедры промышленной и медицинской электроники НИ ТПУ; зав. лабораторией медицинской электроники СибГМУ, г. Томск.

**Хабибулин Шамиль Александрович**, канд. техн. наук, инженер центра управления научно-исследовательским оборудованием НИ ТПУ, г. Томск.

**Хлусов Игорь Альбертович**, д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии, СибГМУ; профессор кафедры экспериментальной физики, НИ ТПУ; директор ООО «Биоконструктор-С», г. Томск.

**Литвинова Лариса Сергеевна**, д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград.

(✉) Хлусов Игорь Альбертович, e-mail: khlusov63@mail.ru

YAK 591.477.35:612.014.44:599.323.4  
DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-16-29

For citation: Druzhinina T.V., Talalaev S.Ya., Zakirov N.P., Shchadenko S.V., Khabibulin Sh.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Cellular reactions on three-dimensional matrices of polylactide acid and hydroxyapatite prepared by 3D-printing. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 16–29

## Cellular reactions to three-dimensional matrices of polylactic acid and hydroxyapatite generated by 3D-printing

T.V. Druzhinina<sup>1</sup>, S.Ya. Talalaev<sup>1</sup>, N.P. Zakirov<sup>1</sup>, S.V. Shchadenko<sup>2,3</sup>, Sh.A. Khabibulin<sup>3</sup>, I.A. Khlusov<sup>2,4</sup>, L.S. Litvinova<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Federal State Unitary Enterprise “Experimental production workshops”, Federal Medical and Biological Agency 5/2, Schukinskaya Str., Moscow, 123182, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> National Research Tomsk Polytechnic University  
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>4</sup> Bioconstructor-S Ltd.  
31, Sibirskaya Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

<sup>5</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University  
14A, Nevskiy Str., Kaliningrad, 236041, Russian Federation

### ABSTRACT

**The purpose of this study** is to estimate Ex vivo physicochemical and biological features of three-dimensional (3D) biodegradable matrices “polylactic acid/calcium phosphates” (hereafter 3D composites) designed with the help of additive technologies (3D printing) as potential materials for bone tissue regeneration.

**Materials and methods.** Experimental samples (disks 1,2–1,6 mm thick, and 11 mm or 8 mm in diameter) of composite biodegradable 3D matrices (hereafter 3D composites) have been produced from initial mixture of 95 mas% polylactic acid (PLA) and 5 mas% hydroxyapatite (HAP). Computer-aided design method, Blender software and fused filament fabrication (FFF; fiber diameter 1,75 mm) with 3D printing were used in sample production. 100 mas% PLA disks served as control. One of the sample surfaces was textured with 0,3–0,5 mm wide grooves. Physicochemical properties of 11 mm disks (geometry, mass, morphology, roughness, electrostatic voltage, surface wettability, and element composition) were studied. Biological trials included the evaluation of 24-hour cytotoxicity of 8 mm samples in culture of mononuclear leukocytes of a healthy volunteer or human Jurkat T cell leukemia-derived cell line (hereafter Jurkat T cells). Moreover, osteogenic potential of 11 mm disks was determined in 21-day culture of human adipose-derived multipotent mesenchymal stem cells (AMMSCs) by means of osteocalcin secretion and intercellular matrix mineralization visualized by alizarin red S staining.

**Results.** The features of PLA-HAP 3D composites generated by 3D printing correspond to physicochemical parameters which are crucial for bone tissue recovery. In case of small amount of calcium and phosphorus they facilitated ex vivo mineralization of extracellular matrix formed in AMMSCs culture. The number of died (by necrosis, mainly) leukemic Jurkat T cells but not mononuclear leukocytes of a healthy volunteer increased to 9–10% in 24-hour in vitro contact with PLA-HAP 3D composites unlike PLA samples alone.

**Conclusion.** Polar reaction of tumor and normal cells to PLA-HAP samples in case of increasing amount of calcium phosphates in 3D-composite may be valuable for the development of new materials used for osteosynthesis of fractures and endoprosthesis in patients with hematological malignancies.

**Key words:** 3D-simulation, prototyping, biodegradable disks, *in vitro*, cytotoxicity, stromal stem cells, osteocalcin secretion, alizarin red staining.

# REFERENCES

1. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates – Plastic materials of the 21<sup>st</sup> century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub., 2004. 282 p.
2. Eling B., Gogolewski S., Pennings A.J. Biodegradable materials of poly(l-lactic acid): 1. Meltspun and solution spun fibers // *Polymer*. 1982; 23: 1587–1593.
3. Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws. An experimental long-term study in sheep // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2022; 122: 360–364.
4. Zagorodnii N.V., Korolev A.V., Ahpashev A.A., Gnelitsa N.N., Ilyin D.O., Khasanshin M.M., Liagin A.S. Povedenie implantatov v kostnoi tkani v hzlichnye sroki soglasno MRT-issledovaniyu [Implants behavior in bone tissue at different periods according to MRT investigation]. Available at: <http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu/> (in Russian).
5. Shishatskaya E.I., Khlusov I.A., Volova T.G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2006; 17 (5): 481–498.
6. Tverdokhlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V., Antonova L.V., Golovkin A.S., Matveeva V.G., Petlin D.G., Anissimov Y.G. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility // *Appl. Surf. Sci.* 2015; 329: 32–39.
7. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure // *Problems of Materials Science*. 2008; 54 (2): 219–232.
8. Khlusov I.A., Karlov A.V., Soukhodolo I.V. Genez kostnoi tkani na poverhnosti implantatov dlya osteosinteza [Bone tissue genesis on the surface of the implants for osteosynthesis] // *Genii ortopedii, Genius of Orthopedics*, 2003; 3: 16–26 (in Russian).
9. Khlusov I.A., Sharkeev Yu. P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Yu., Gutor S.S., Tolkacheva T.V. Influence of the Structure of the Titanium Oxide Coating Surface on Immunocompetent Tumor Cells // *Russian Physics Journal*. 2016; 58 (11): 1527–1533.
10. Bykova Iu., Weinhardt V., Kashkarova A., Lebedev S., Baumbach T., Pichugin V., Zaitsev K., Khlusov I. Physical properties and biocompatibility of UHMWPE-derived materials modified by synchrotron radiation // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2014; 25 (8): 1843–1852. doi: 10.1007/s10856-014-5222-4.
11. Owens D.K., Wendt R.C. Estimation of the surface free energy of polymers // *J. Appl. Polym. Sci.* 1969; 13: 1741–1747.
12. Kfoury Y., David T., Scadden D.T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche // *Cell Stem Cell*. 2015; 16: 239–253.
13. Steward A.J., Liu Y., Wagner D.R. Engineering cell attachments to scaffolds in cartilage tissue engineering // *Biomater. Regen. Med. Eng.* 2011; 63: 74–82.
14. Khlusov I.A., Karlov A.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Kolobov Yu.R., Shashkina G.A., Ivanov M.B., Legostaeva E.V., Sukhikh G.T. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow in situ: role of physicochemical properties of artificial surfaces // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 140 (1): 144–152.
15. 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.
16. Khlusov I.A., Khlusova M.Y., Pichugin V.F., Sharkeev Y.P., Legostaeva E.V. Artificial Niches for Stromal Stem Cells as a Potential Instrument for the Design of the Surface of Biomimetic Osteogenic Materials // *Russian Physics Journal*. 2014; 56 (10): 1206–1211.
17. Hallab N.J., Bundy K.J., O'Connor K., Moses R.L., Jacobs J.J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion // *Tissue Eng.* 2001; 7: 55–71.
18. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2<sup>nd</sup> edition / Eds. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, & J.E. Lemons. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004; 851 p.
19. Goldberg E.D., Digai A.M., Khlusov I.A. Rol vegetativnoi nervnoi sistemi v regulyatsii gemopoeza [The role of autonomous nervous system in hemopoiesis regulation]. Tomsk, 1997. 218 p. (in Russian).
20. Stevens M.J., Donato L.J., Lower S.K., Sahai N. Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes // *Langmuir*. 2009; 25 (11): 6270–6278. doi: 10.1021/la8040192.
21. Terui Y., Ikeda M., Tomizuka H., Kasahara T., Ohtsuki T., Uwai M., Mori M., Itoh T., Tanaka M., Yamada M., Shimamura S., Ishizaka Y., Ikeda K., Ozawa K., Miura Y., Hatake K. Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial interleukin-8 // *Blood*. 1998; 92 (8): 2672–2680.
22. Khlusov I.A., Surmeneva M.A., Surmenev R.A., Ryazantseva N.V., Savelieva O.E., Ivanova A.A., Prokhorenko T.S., Tashireva L.A., Dvornichenko M.V., Pichugin V.F. Kletочно-molekulyarnye aspekty immunologicheskoi sovmestimosti implantatov s nanostrukturnym kalcii-fosfatnym pokrytiem [Cellular and molecular aspects of immunologic compatibility of implants with nanostructured calcium phosphate coating] // *Biulleten sibirskoi meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*, 2012; 4: 78–85 (in Russian).
23. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Dunets N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Khlusov

- va M.Yu., Sharkeev Yu.P. Morphofunctional changes of Jurkat line lymphoblasts at short-term contact with relief calcium phosphate surface // *Cell and Tissue Biology*. 2017; 11 (1) (in press) (in Russian).
24. Oreffo R.O.C., Driessens F.C.M., Planell J.A., Triffitt J.T. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements // *Biomaterials*. 1998; 19: 1845–1854.
  25. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation // *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9: 204–219.
  26. Riggs B.L., Melton III L.J. Osteoporosis. Etiology, diagnosis, and management, second edn. Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, New York, 1996 (Russ. ed.: Riggs B.L., Melton L.D. Osteoporoz: per. s angl. SPb., ZAO Izdatelstvo BINOM Publ., Nevskii dialect Publ., 2000; 560 p.) (in Russian).
  27. Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 38: 121–127.
  28. Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y. Detection in vitro and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells // *Methods Mol. Biol.* 2013; 1035: 103–119. doi: 10.1007/978-1-62703-508-8\_9.
  29. Damien C.J., Ricci J.L., Christel P., Alexander H., Patat J.L. Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes // *Calcif Tissue Int.* 1994; 55: 151–158.
  30. Fisher D.E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold // *Cell*. 1994; 78: 539–542.

Received September 01.2016

Accepted December 01.2016

**Druzhinina Tatiana V.**, PhD, Researcher, Federal State Unitary Enterprise “Experimental production workshops” of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

**Talalaev Sergey Ya.**, Deputy Director for Science, Federal State Unitary Enterprise «Experimental production workshops» of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

**Zakirov Nazar P.**, First Deputy Director, Federal State Unitary Enterprise «Experimental production workshops» of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation.

**Shchadenko Sergey V.**, Assistant, Department of Industrial and Medical Electronics, Tomsk Polytechnic University; Head of Laboratory Medical Electronics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Khabibulin Shamil A.**, PhD, Engineer Control Center Research Equipment, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Khlusov Igor A.**, MD, Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Department of Experimental Physics, Tomsk Polytechnic University, Head of Bioconstructor-S Ltd., Tomsk, Russian Federation.

**Litvinova Larisa S.**, MD, Head of Laboratory Immunology and Cell Biotechnologie, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

(✉) **Khlusov Igor A.**, e-mail: khlusov63@mail.ru

УДК 616-053.2-092.19:57.083.3](571.16)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-30–38

Для цитирования: Кабанец Н.Н., Филинчук О.В., Уразова О.И., Морозова К.С., Колоколова О.В. Сравнительная оценка эффективности иммунологических тестов у детей из групп риска в Томской области. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 30–38.

## Сравнительная оценка эффективности иммунологических тестов у детей из групп риска в Томской области

Кабанец Н.Н., Филинчук О.В., Уразова О.И., Морозова К.С., Колоколова О.В.

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – сопоставление результатов иммунологических тестов (пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным в стандартном разведении (АТР) и реакции Манту) у детей из групп риска по туберкулезу на территории Томской области.

**Материал и методы.** Проведен ретроспективный анализ 1 204 амбулаторных карт детей и подростков в возрасте 1–16 лет, обследованных у фтизиатра.

**Результаты.** При одновременной постановке двух проб (кожная проба с АТР (диаскинтест) и реакция Манту) доля положительных реакций на туберкулин составила 92,4%, в числе которых 6,6% были гиперергическими, тогда как на АТР отмечалось 6,0% положительных реакций, в том числе 3,2% – гиперергических. Наибольшее количество положительных реакций на АТР регистрировалось среди детей с выраженной и гиперергической чувствительностью к туберкулину (28,7%) и детей из очагов туберкулезной инфекции (17,5%). Среди детей с выражением туберкулиновых проб и детей с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) регистрировалось наименьшее количество положительных реакций на АТР – 2,8% и 1,5% соответственно.

**Выводы.** Результаты кожных проб с АТР в сравнении с туберкулином различаются. При выражении туберкулиновых проб положительный диаскинтест регистрировался только в единичных случаях (2,8% случаев) по сравнению с преобладающей (96,4% случаев) положительной реакцией на туберкулин; в группе детей с выраженными и гиперергическими результатами на туберкулин реакции на АТР совпадали у каждого третьего (28,7%) обследуемого; у детей с усиливающейся чувствительностью к туберкулину иммунологический ответ при проведении диаскинтеста выявлялся в 4,7% случаев.

Чаще локальные формы туберкулеза в настоящем исследовании выявлялись среди детей с гиперергическими реакциями на кожную пробу с АТР (12 из 38 детей, 31,6%),  $\chi^2 = 306,3$ ;  $p < 0,001$  и при совпадении гиперергических результатов двух иммунологических тестов (6 из 15 детей, 40,0%)  $\chi^2 = 303,5$ ;  $p < 0,001$ .

**Ключевые слова:** проба Манту, диаскинтест, аллерген туберкулезный рекомбинантный, скрининг туберкулеза у детей.

### ВВЕДЕНИЕ

С 2009 г. в России во фтизиатрической практике для диагностики туберкулезной инфекции используется диаскинтест (ДСТ) – проба с ал-

лергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР) в стандартном разведении для внутрикожного введения. Данный аллерген характеризуется по сравнению с туберкулином более высокой чувствительностью и специфичностью в отношении вирулентных штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ). АТР не вызывает гиперчувствительно-

✉ Кабанец Надежда Николаевна, e-mail: nava-a4@mail2000.ru

сти замедленного типа у людей, вакцинированных БЦЖ и инфицированных нетуберкулезными микобактериями. Следовательно, с помощью данного антигена можно выявить сенсibilизацию именно к вирулентным штаммам МБТ и ограничить круг людей, которым необходимо назначение превентивной химиотерапии. Внутрикожную пробу с АТР проводят детям и подросткам, направленным в противотуберкулезные диспансеры для дообследования на наличие специфического процесса по результатам массовой туберкулинодиагностики и лицам, относящимся к группам высокого риска по заболеванию туберкулезом с учетом эпидемиологических, медицинских и социальных факторов риска. При этом иммунодиагностику с АТР осуществляют в комплексе с клиническими, лабораторными и рентгенологическими обследованиями. Помимо этого, тест с АТР проводится в условиях противотуберкулезных учреждений всем состоящим на учете у фтизиатра пациентам с различными проявлениями туберкулезной инфекции с интервалом 3–6 мес. В настоящее время, согласно приказу МЗ РФ № 951 от 29.12.2014 г., диаскинтест рекомендован к применению не только в специализированных противотуберкулезных учреждениях, но и в качестве скринингового метода выявления туберкулеза у детей старше 8 лет и подростков в учреждениях первичной медико-социальной помощи.

Хорошо известно, что заболеваемость туберкулезом детей из групп риска выше, чем в целом в популяции. Так, заболеваемость детей из контактов с бактериовыделителями превышает заболеваемость детей в тех же возрастных группах в среднем по России в 30 раз, а подростков – в 25 раз [1]. Следовательно, отбор детей в группы высокого риска развития туберкулеза имеет первостепенное значение [2]. Формирование таких групп ведется как в учреждениях первичной медико-санитарной помощи (медико-биологические факторы), так и в специализированных учреждениях (по результатам иммунологических проб и эпидемиологическому фактору). В условиях массовой вакцинации БЦЖ информативность туберкулинодиагностики как метода раннего выявления туберкулезной инфекции в детском возрасте снижается. Наряду с этим применение современных методов иммунодиагностики позволяет определить наиболее информативные критерии высокого риска развития туберкулеза у детей.

За годы использования в противотуберкулезной службе кожной пробы с АТР в различных регионах Российской Федерации проведены исследования по ее применению с целью диагно-

стики активности туберкулезной инфекции среди детей и подростков в различных возрастных группах [3], на территориях с различной эпидемиологической ситуацией [4], в сравнении с реакцией Манту [5], квантифероновым тестом [6, 7]. Практика показала, что использование данного метода в общей лечебной сети в целях диагностики активности туберкулезной инфекции у детей и подростков имеет высокую чувствительность и специфичность. Результаты научных работ убедительно доказали целесообразность перехода на кожную пробу с АТР при массовых профилактических осмотрах детского и подросткового населения с возможностью формирования групп высокого риска заболевания туберкулезом [5, 8–11]. Некоторые регионы в 2015 г. полностью внедрили проведение профилактических осмотров детей и подростков 8–17 лет с помощью пробы с АТР [12].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось сопоставление результатов кожной пробы с АТР и реакции Манту у детей из групп риска по туберкулезу на территории Томской области.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ амбулаторных карт 1 204 детей и подростков в возрасте 1–16 лет, обследованных в детском амбулаторном отделении ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр» в период 2011–2013 гг. В данную когорту вошли дети, направленные к фтизиатру после массовой туберкулинодиагностики, проведенной в детских учреждениях и поликлиниках, а также ранее состоящие на диспансерном учете. В исследование не включены ВИЧ-инфицированные дети.

Перед проведением иммунодиагностики для каждого ребенка в обязательном порядке было оформлено добровольное информированное согласие законных представителей ребенка на проведение данного медицинского вмешательства. Кожные пробы с туберкулином и АТР проводились одновременно на разных предплечьях. Иммунодиагностика осуществлялась в процедурном кабинете специально обученной медицинской сестрой, имеющей справку-допуск к проведению туберкулинодиагностики. Оценка проб проводилась через 72 ч в соответствии с нормативными документами [13].

Все дети и подростки, включенные в исследование, были разделены на пять групп:

1. Контакты – дети из эпидемиологической группы риска, находящиеся в контакте с больными

туберкулезом лицами независимо от наличия или отсутствия бактериовыделения.

2. Выражи – дети с впервые положительной реакцией Манту, не связанной с предыдущей вакцинацией БЦЖ, находящиеся в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции.

3. Выраженная и гиперергическая чувствительность – дети в состоянии латентной туберкулезной инфекции, имеющие выраженную чувствительность к туберкулину с наличием социальных факторов риска и имеющие гиперергическую чувствительность к туберкулину. Выраженной чувствительностью считали инфильтрат 15–16 мм в диаметре, гиперергической – 17 мм и более, а также везикуло-некротические пробы и пробы, сопровождающиеся развитием лимфаденита и лимфангоита независимо от размера инфильтрата.

4. Усиливающаяся чувствительность – дети в состоянии латентной туберкулезной инфекции, имеющие усиливающуюся чувствительность к туберкулину. Усиливающейся чувствительностью считали увеличение размера инфильтрата на 6 мм и более по сравнению с предыдущей пробой.

5. Латентная туберкулезная инфекция (ЛТИ) – в данную группу были объединены дети, находящиеся в состоянии латентной туберкулезной инфекции, но не имеющие гиперергической или усиливающейся чувствительности к туберкулину и не подлежащие диспансерному учету в противотуберкулезном учреждении.

Кроме иммунологических тестов пациенты подвергались полному клинко-рентгенологическому обследованию, включая, в том числе, компьютерную томографию органов грудной клетки (при наличии показаний к ней). Положительной реакцией на туберкулин считали образование инфильтрата диаметром 5 мм и более, на АТР – инфильтрат любого размера.

При анализе результатов измерений для оценки значимости различий размеров инфильтратов положительных проб с туберкулином и АТР использовался критерий Манна –Уитни, для сравнения парных данных результатов обеих проб использовался критерий Уилкоксона для связанных выборок. Различия считались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ , где  $p$  – достигнутый уровень значимости. Для выявления зависимости частоты обнаружения туберкулеза от характера реакции на иммунологические тесты использовался критерий  $\chi^2$ . Описание количественных признаков приводится в виде медианы и межквартильного размаха ( $Me (Q_1; Q_3)$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проанализированы результаты иммунологических тестов 1 204 детей. Возраст детей для разных групп наблюдения, включенных в исследование, представлен в табл 1.

Т а б л и ц а 1

| Возраст детей, включенных в исследование                |          |                                                |
|---------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------|
| Показатель                                              | <i>n</i> | <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i> , лет |
| Все дети                                                | 1204     | 7 (5; 10)                                      |
| Группа 1. Выраж                                         | 531      | 6 (5; 8)                                       |
| Группа 2. Выраженная и гиперергическая чувствительность | 94       | 8 (6; 11)                                      |
| Группа 3. Усиливающаяся чувствительность                | 64       | 10 (8; 12)                                     |
| Группа 4. Контакты                                      | 126      | 6 (4; 9)                                       |
| Группа 5. ЛТИ                                           | 389      | 8 (6; 11)                                      |

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2–4: *n* – количество детей.

Количество детей в группах диспансерного учета, вошедших в исследование, различалось. Многочисленными оказались группы детей с выражением туберкулиновой чувствительности (531 человек) и ЛТИ (389 детей). Количество детей с выраженными и гиперергическими реакциями на туберкулин составило 94. В группу детей с усиливающейся чувствительностью к туберкулину были включены 64 ребенка. Таким образом, всего обследовано 689 детей, подлежащих наблюдению в VI группе диспансерного учета (ГДУ) (выраж, гиперергия, усиливающаяся чувствительность). 126 детей, включенных в исследование, представляли группу эпидемиологического риска (контакт с больными туберкулезом).

Из 1 204 одновременно проведенных на разных предплечьях проб доля положительных реакций Манту составила 92,4% (1 113), в том числе 6,6% (80) – гиперергических. Положительный результат с АТР был обнаружен у 73 (6,0%) детей, из них у 38 (3,2%) – гиперергический (рис. 1).

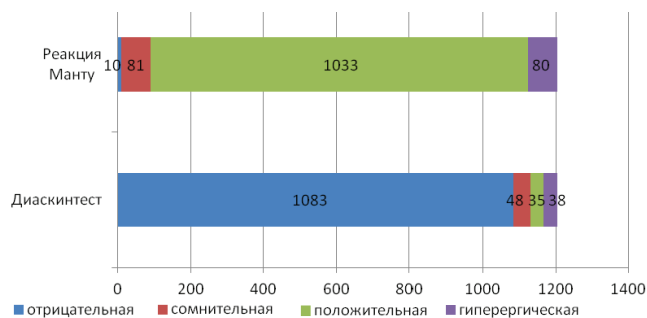


Рис 1. Сравнительные результаты иммунологических тестов ( $n = 1\,204$ )

Доля сомнительных проб с применением туберкулина и АТР составила 6,7% (81) и 4,0% (48) соответственно. Отрицательные реакции среди всех обследуемых на первый аллерген были зарегистрированы у 10 (0,8%) детей, на второй – у 1083 (89,9%).

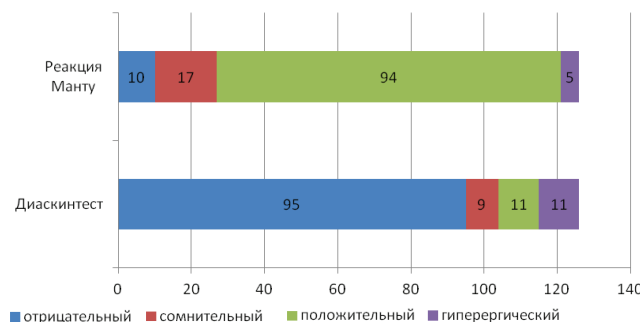
Обнаружено, что размеры инфильтратов при положительных, в том числе гиперергических, результатах кожных проб с туберкулином и АТР (1 113 и 73 пробы соответственно) различались как среди всех обследованных де-

тей, так и в отдельных группах. Отсутствие значимых различий в размерах инфильтратов на иммунологические тесты у детей обнаружено лишь в группе детей с усиливающейся чувствительностью к туберкулину и группе детей с ЛТИ, что, возможно, связано с малым количеством детей с положительной реакцией на АТР в этих группах. Размер инфильтрата в разных группах детей, а так же величина достигнутого уровня значимости различий представлены в табл. 2.

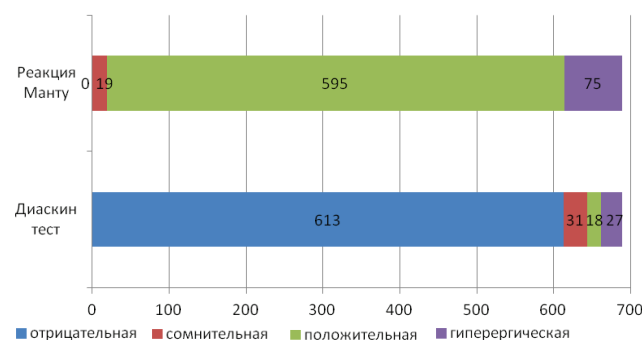
Таблица 2

| Размер инфильтрата при положительных иммунологических тестах в разных группах детей |                                                         |               |                                          |             |                                          |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------|-------------|------------------------------------------|----------|
| Показатель                                                                          |                                                         | Реакция Манту |                                          | Диаскинтест |                                          | <i>p</i> |
|                                                                                     |                                                         | <i>n</i>      | <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i> | <i>n</i>    | <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i> |          |
| Все дети                                                                            |                                                         | 1113          | 11 (9; 13)                               | 73          | 15 (11; 16)                              | < 0,001  |
| Группа 1. Контакты                                                                  |                                                         | 99            | 11 (9; 13)                               | 22          | 14,5 (11; 15,5)                          | 0,008    |
| VI<br>ГДУ                                                                           | Группа 2. Выраж                                         | 512           | 10 (9; 12)                               | 15          | 15 (10; 15)                              | < 0,001  |
|                                                                                     | Группа 3. Выраженная и гиперергическая чувствительность | 94            | 17 (16; 19)                              | 27          | 15 (14; 17)                              | 0,008    |
|                                                                                     | Группа 4. Усиливающаяся чувствительность                | 64            | 12 (10; 14)                              | 3           | 10; 10; 10                               | 0,13     |
| Группа 5. ЛТИ                                                                       |                                                         | 344           | 10 (9; 12)                               | 6           | 11,5 (9; 14)                             | 0,22     |

IV группа диспансерного наблюдения включала детей из контакта с больными туберкулезом (*n* = 126). В большинстве случаев контактные дети реагировали на пробу Манту положительно – 99 (78,6%), из них у 5 (4%) отмечался гиперергический характер чувствительности к туберкулину, тогда как положительная реакция на АТР регистрировалась лишь в 22 (17,5%) случаях, из них у половины детей (11) она имела гиперергический характер. Сомнительная реакция на АТР среди детей данной группы регистрировалась почти в два раза реже, чем при проведении пробы Манту – 9 (7,1%) и 17 (13,5%) соответственно. В остальных случаях отмечались отрицательные реакции на АТР (рис. 2).

Рис. 2 Сравнительные результаты иммунологических тестов у детей IV ГДУ (*n* = 126)

Результаты иммунологических проб у детей, которые имеют повышенный риск развития туберкулеза по результатам проведенной туберкулинодиагностики (вираж, гиперергия, усиливающаяся чувствительность) (*n* = 689), распределились следующим образом: при проведении пробы Манту было 670 (97,2%) положительных реакций, из них 75 (10,9%) гиперергических; на АТР – 45 (6,5%) и 27 (3,9%) соответственно. Сомнительные реакции на введение туберкулина регистрировались у 19 (2,8%) детей, на АТР у 31 (4,5%) ребенка. Отрицательных реакций Манту в данной группе не было, а на АТР большинство детей 613 (89%) не реагировали (рис. 3).

Рис. 3 Сравнительные результаты иммунологических тестов у детей VI ГДУ (*n* = 689)

Дети, отобранные в детских учреждениях и поликлиниках по результатам массовой туберкулинодиагностики с виражами туберкулиновой чувствительности ( $n = 531$ ), при динамическом обследовании у фтизиатра в 96,4% (512) случаев реагировали на туберкулин положительно. В том числе 3% (16) – гиперергически, тогда как положительный кожный тест с АТР отмечался только у 15 (2,8%) детей, но у половины из них (8 (1,5%) детей) – с гиперергической чувствительностью. Сомнительную чувствительность имели 19 (3,6%) и 22 (4,1%) ребенка к туберкулину и АТР соответственно.

В то же время дети с выраженной и гиперергической чувствительностью на туберкулин ( $n = 94$ ) и на АТР реагировали положительно в 28,7% случаев (27 детей), в том числе в 20,2% случаев (19 детей) гиперергически. У 6 (6,4%) детей отмечалась сомнительная реакция и у 61 (64,9%) – отрицательная.

У детей с усиливающейся чувствительностью на туберкулин ( $n = 64$ ) лишь в 9,4% случаях (6 детей) отмечались положительная и сомнительная реакции на кожный тест с АТР (по 4,7%, то есть по три ребенка). Гиперергических реакций на иммунологические тесты в данной группе зарегистрировано не было, у 58 (90,6%) детей отсутствовала реакция на кожный тест с АТР.

Таким образом, среди детей, имеющих гиперчувствительность замедленного типа на АТР, в группе детей с виражами преобладали сомнительные пробы, в группе детей с выраженной и гиперергической чувствительностью к туберкулину – гиперергические пробы, а в группе детей с усиливающейся чувствительностью к туберкулину одинаково редко встречались сомнительные и положительные пробы, при этом гиперергические отсутствовали.

Полученные результаты по распределению ответных реакций на кожную пробу с АТР у детей данных групп сопоставимы с результатами других подобных исследований [14].

Положительно реагировали на туберкулин 344 детей (88,4%) с АТИ, и только у 6 (1,5%) детей обнаруживалась положительная реакция на АТР. Число сомнительных проб регистрировалось у 45 (11,6%) и 8 (2,1%) детей соответственно. Большинство обследуемых детей из этой группы обнаруживали отрицательную реакцию на АТР – 375 (96,4%) (рис. 4).

Значимость различий в реакциях на иммунологические тесты была исследована с помощью критерия Уилкоксона для парных выборок. При анализе данных независимо от характера реак-

ции как для всех детей в исследовании, так и в каждой из групп (контакт, вираж, гиперергия, усиливающаяся чувствительность, АТИ), были получены значимые различия ( $p < 0,001$ ). При анализе данных детей только с положительной (в том числе и гиперергической) реакцией на АТР (73 ребенка), но без учета их принадлежности к различным диспансерным группам был получен уровень значимости различий  $p = 0,006$ .

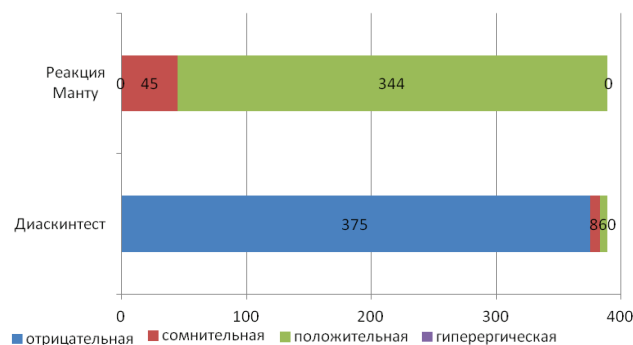


Рис. 4. Сравнительные результаты иммунологических тестов среди детей с АТИ ( $n = 389$ )

Однако для детей внутри каждой группы диспансерного учета различия в реакциях на оба иммунологических теста оказались незначимыми ( $p = 0,109$  для детей из контакта с больными туберкулезом,  $p = 0,063$  для детей с виражом туберкулиновых реакций,  $p = 0,581$  для детей с выраженной и гиперергической чувствительностью к туберкулину). Различий в размере инфильтрата у детей, положительно реагирующих на АТР ( $n = 73$ ), выявлено не было ( $p = 0,620$ ).

В большинстве случаев (1000 (83,1%) детей) отмечались сочетания отрицательного результата диаскин-теста и положительного результата реакции Манту. В 6 (0,5%) случаях выявлены сомнительные реакции на оба иммунологических теста. В случаях отрицательной реакции Манту результат диаскин-теста также был отрицательным (10 (100%) детей). Среди детей, имеющих сомнительную реакцию на туберкулин, 2,5% реагировали на АТР положительно (2 из 81) и 7,4% – сомнительно (6 из 81).

Совпадения результатов на обе пробы для разных типов реакций представлены в табл. 3.

Из 73 детей с положительным результатом кожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным, попавших в настоящее исследование, у 17 человек был впоследствии выявлен туберкулез, что составило 23,3%. При этом аналогичный результат на пробу Манту наблюдался у 113 детей, из которых туберкулез был диа-

гностирован только в 1,4% случаях (16 человек). Кроме того, туберкулез был диагностирован в 1,2% случаев (у 1 ребенка из 81) с сомнительной чувствительностью к туберкулину. Необходимо отметить, что частота выявления локальных форм туберкулеза повышается в случае гиперергических реакций на АТР (из 38 детей у 12 диагностирован

туберкулез, что составило 31,6%) (табл. 4). Среди случаев совпадения гиперергических результатов двух иммунологических тестов частота выявления локальных форм туберкулеза еще выше – из 15 детей, у которых регистрировались гиперергические реакции и на туберкулин и на АТР, у 6 был выявлен туберкулез, что составило 40,0%.

Т а б л и ц а 3

| Частота совпадений результатов иммунологических тестов |               |                 |              |                 |               |                 |           |                 |
|--------------------------------------------------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------|-----------------|
| Показатель                                             | Реакция Манту |                 |              |                 |               |                 | Итого ДСТ |                 |
|                                                        | Положительный |                 | Сомнительный |                 | Отрицательный |                 |           |                 |
|                                                        | <i>n</i>      | Отн. кол-во, %* | <i>n</i>     | Отн. кол-во, %* | <i>n</i>      | Отн. кол-во, %* | <i>n</i>  | Отн. кол-во, %* |
| Положительный результат ДСТ                            | 71            | 5,9             | 2            | 0,2             | 0             | 0               | 73        | 6,1             |
| Сомнительный результат ДСТ                             | 42            | 3,5             | 6            | 0,5             | 0             | 0               | 48        | 4,0             |
| Отрицательный результат ДСТ                            | 1000          | 83,1            | 73           | 6,0             | 10            | 0,8             | 1083      | 89,9            |
| Итого реакций Манту                                    | 1113          | 92,4            | 81           | 6,7             | 10            | 0,8             | 1204      | 100             |

\* относительно полного количества обследованных ( $n = 1204$ ).

Т а б л и ц а 4

| Частота выявления локальных форм туберкулеза при различных результатах иммунологических тестов |               |                      |                |             |                      |                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------|----------------|-------------|----------------------|----------------|
|                                                                                                | Реакция Манту |                      |                | Диаскинтест |                      |                |
|                                                                                                | <i>n</i>      | Обнаружен туберкулез |                | <i>n</i>    | Обнаружен туберкулез |                |
|                                                                                                |               | Абс.                 | Отн. кол-во, % |             | Абс.                 | Отн. кол-во, % |
| Отрицательный                                                                                  | 10            | –                    | –              | 1083        | –                    | –              |
| Сомнительный                                                                                   | 81            | 1                    | 1,2            | 48          | –                    | –              |
| Положительный (в т.ч. гиперергический)                                                         | 1113 (80)     | 16 (6)               | 1,4 (7,5)      | 73 (38)     | 17 (12)              | 23,3 (31,6)    |

Таким образом, положительные результаты кожной пробы с АТР необходимо расценивать как показатель активности туберкулезной инфекции, дополняющий результаты пробы Манту, позволяющий более эффективно формировать группы высокого риска развития туберкулеза.

## ВЫВОДЫ

При углубленном обследовании детей, отобранных в детских учреждениях и поликлиниках после массовой туберкулинодиагностики, результаты кожных проб с АТР и туберкулином различались. При выражении туберкулиновых проб положительная реакция на АТР регистрировалась только в единичных случаях (у 15 из 531, 2,8%). В группе детей с выраженными и гиперергическими реакциями на туберкулин в 28,7% (27 из 94) случаев реакции на АТР совпадали; у детей с усиливающейся чувствительностью к

туберкулину иммунологический ответ при применении диаскинтеста выявлялся в 4,7% (3 из 64) случаев.

Среди детей из эпидемиологической группы риска (контакт с больным туберкулезом) в 78,5% случаев регистрировалась положительная реакция Манту и лишь в 17,5% случаев положительная реакция на АТР;  $\chi^2 = 326,5$ ;  $p < 0,001$ .

Выраженность местной реакции (размер инфильтрата) в целом среди всех обследованных при положительных результатах диаскинтеста была выше, чем при положительных результатах реакции Манту (на АТР 15 (11; 16), на туберкулин 11, (9; 13);  $p < 0,001$ ).

Чаще локальные формы туберкулеза в настоящем исследовании выявлялись среди детей с гиперергическими реакциями на кожную пробу с АТР (12 из 38 детей; 31,6%);  $\chi^2 = 306,3$ ;  $p < 0,001$  и при совпадении гиперергических результатов двух иммунологических тестов (6 из 15 детей, 40,0%);  $\chi^2 = 303,5$ ;  $p < 0,001$ .

## 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенова В.А., Барышникова Л.А., Севостьянова Т.А., Клевню Н.И. Туберкулез у детей в России и задачи фтизиатрической и общей педиатрической службы по профилактике и раннему выявлению заболевания // *Туберкулез и болезни легких*. 2014; 3: 40–46.
2. Поддубная Л.В., Шилова Е.П., Степченко И.М. и др. Иммунологические пробы у детей, их роль в формировании групп риска по туберкулезу // *Туберкулез и социально значимые заболевания*. 2016; 1: 20–23.
3. Довгалюк И.Ф., Старшинова А.А., Зубарева С.В. Возможности применения диаскинтеста в практической работе врача-педиатра // *Педиатрия*. 2013; 1: 65–68.
4. Мотанова Л.Н., Коваленко Г.Е., Попова Ю.В. Опыт применения диаскинтеста на территории с неблагоприятной эпидемической ситуацией // *Туберкулез и болезни легких*. 2014; 4: 34–39.
5. Иконина И.В., Корниенко С.В., Кондрашева Л.В. и др. Опыт применения кожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным у детей Воронежской области // *Туберкулез и болезни легких*. 2014; 7: 54–59.
6. Слобоцкая Л.В., Иванова Д.А., Кочетков Я.А. и др. Сравнительные результаты кожного теста с препаратом, содержащим рекомбинантный белок SFP-10-ESAT-6, и лабораторного теста QuantiFERON-GIT // *Туберкулез и болезни легких*. 2012; 10: 27–32.
7. Лозовская М.Э., Белушков В.В., Новик Г.А. и др. Совершенствование диагностики туберкулеза у детей на основе иммуноаллергических тестов // *Туберкулез и болезни легких*. 2012; 8: 40–43.
8. Барышникова Л. А., Лебедева Н. О., Каткова Л. И. и др. Опыт новой технологии скрининга детей и подростков на туберкулезную инфекцию в Самарской области // *Туберкулез и болезни легких*. 2012; 11: 27–31.
9. Барышникова Л.А., Лебедева Н.О., Каткова Л.И. и др. Эффективность нового препарата для диагностики туберкулеза у детей и подростков // *Вопросы современной педиатрии*. 2012; 11: 104–108.
10. Фатыхова Р.Х., Алексеев А.П. Эффективность скрининговых обследований детского населения на наличие туберкулезной инфекции в Республике Татарстан // *Туберкулез и болезни легких*. 2016; 6: 39–42.
11. Мордовская Л.И., Ощепкова Н.М. Опыт применения аллергена туберкулезного рекомбинантного с целью скрининга туберкулеза у детей в Республике Саха (Якутия) // *Туберкулез и социально значимые заболевания*. 2016; 1: 34–36.
12. Стасько Е.Ю., Хасаншин Г.С. Анализ применения кожной пробы с препаратом аллергена туберкулезного рекомбинантного как скринингового метода обследования на туберкулез детей старше 7 лет в Пензенской области в 2015 г. // *Туберкулез и болезни легких*. 2016; 3: 52–56.
13. Приказ Минздравсоцразвития России от 28.10.09 № 855 «О внесении изменения в приложение к приказу Минздрава России от 21 марта 2003 г. № 109». М., 2009: 5.
14. Ставицкая Н.В., Молчанова Н.В., Дудченко Д.В. и др. Оптимизация скрининга туберкулезной инфекции у детей // *Туберкулез и болезни легких*. 2013; 12: 59–64.

Поступила в редакцию 04.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Кабанец Надежда Николаевна, ассистент кафедры фтизиатрии и пульмонологии, СибГМУ, г. Томск.  
Филинук Ольга Владимировна, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой фтизиатрии и пульмонологии, СибГМУ, г. Томск.  
Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, член-корр. РАН, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.  
Морозова Ксения Сергеевна, аспирант кафедры фтизиатрии и пульмонологии, СибГМУ, г. Томск.  
Колоколова Ольга Валентиновна, канд. мед. наук, доцент кафедры фтизиатрии и пульмонологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Кабанец Надежда Николаевна, e-mail: nava-a4@mail2000.ru

УДК 616-053.2-092.19:57.083.3](571.16)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-30-38

For citation: Kabanets N.N., Filinyuk O.V., Urazova O.I., Morozova K.S., Kolokolova O.V. Comparative evaluation of immunological tests for children at risk in the Tomsk Region. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 30–38

## Comparative evaluation of immunological tests for at-risk children in Tomsk Region

Kabanets N.N., Filinyuk O.V., Urazova O.I., Morozova K.S., Kolokolova O.V.

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

### ABSTRACT

**The purpose of this paper** is to compare the results of immunological tests (tests with recombinant allergen TB in standard dilution (RAT) and the Mantoux tuberculin test) in children at risk of developing tuberculosis in Tomsk Region.

**Materials and methods.** A retrospective analysis of 1204 outpatient medical records of children and adolescents at the age from 1 to 16 was performed.

**Results.** When two tests are carried out at the same time (skin test with RAT (Diaskin-test) and Mantoux tuberculin test), the proportion of positive reactions to tuberculin was 92,4%, including 6,6% of hyperergic reactions, while there were 6,0% of positive reactions to RAT, including 3,2% of hyperergic reactions. The biggest number of positive reactions to RAT was recorded among children with severe and hyperergic tuberculin sensitivity (28,7%) and children from tuberculosis prevalence areas (17,5%). The lowest number of positive reactions to RAT was recorded among children with conversion of tubercular tests and children with latent TB infection (LTBI) – 2,8% and 1,5% respectively.

**Conclusions.** The results of skin tests with RAT as compared to the tests with tuberculin are different. When there is a conversion of tubercular test the positive reaction to Diaskintest was detected only in a few cases (2,8% of cases) as compared to prevailing (in 96,4% of cases) positive reaction to tuberculin; in children with severe and hyperergic results the tuberculin reaction to RAT was the same in every third child (28,7%); in children with increasing sensitivity to tuberculin the immunological response during Diaskintest was detected in 4,7% of cases.

More often local forms of tuberculosis were detected among children with hyperergic reactions to skin tests with RAT (12 of 38 children, 31,6%),  $\chi^2 = 306,3$ ;  $p < 0,001$ , and when there is an overlap of hyperergic results of two immunological tests (6 of 15 children, 40,0%)  $\chi^2 = 303,5$ ;  $p < 0,001$

**Key words:** Mantoux tuberculin skin test, recombinant TB allergen in standard dilution, tuberculosis screening among children.

### REFERENCES

1. Aksenova V.A., Baryshnikova L.A., Sevostyanova T.A., Klevno N.I. Tuberkulez u detej v Rossii i zadachi ftiziatricheskoj i obschej pediatricheskoj sluzhby po profilaktike i rannemu vyjavleniyu zabolevaniya [Childhood Tuberculosis in Russia, goals of the TB service and general pediatric service for TB prevention and early detection] // *Tuberkulez i bolezni legkih – Tuberculosis and lung diseases*. 2014; 3: 40–46 (in Russian).
2. Poddubnaya L. V., Shilova E. I., Stepchenko I.M. et al. Optimizaciya skrininga tuberkuleznoj infekcii u detej [Immunological tests in children, their role in the formation of groups at risk of tuberculosis] // *Tuberkulez i social'no znachimye zabolevaniya – Tuberculosis and other socially significant diseases*. 2016; 1: 20–23 (in Russian).
3. Dovgalyuk I.F., Starshinova A.A., Zubareva S.V. Vozmozhnosti primeneniya diaskintesta v prakticheskoy rabote vracha-pediatra [The possibility of using Diaskintest in practical work of doctor-pediatrician] // *Pediatrics – Pediatrics*. 2013; 1: 65–68 (in Russian).
4. Motanova L.N., Kovalenko G.E., Popova Y.V. Opyt primeneniya diaskintesta na territorii s neblagopriyatnoj

- epidemiceskoy situatsii [Experience in using Diaskintest in an unfavorable epidemic situation area] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2013; 1: 65–68 (in Russian).
5. Ikonina I.V., Kornienko S.V., Kondrashova L.V. et al. Sravnitel'nye rezul'taty kozhnogo testa s preparatom, soderzhaschim rekombinantnyj belok SFP-10-ESAT-6, i laboratornogo testa QuantiFERON-GIT [The Experience of use of skin tests with tubercular recombinant allergen in children in the Voronezh region] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2014; 4: 34–39 (in Russian).
  6. Slogotskaya L.V., Ivanov D.A., Kochetkov Ya.A. et al. Sovershenstvovanie diagnostiki tuberkuleza u detej na osnove immunoallergicheskikh testov Sravnitel'nye rezul'taty kozhnogo testa s preparatom, soderzhaschim rekombinantnyj belok SFP-10-ESAT-6, i laboratornogo testa QuantiFERON-GIT [Results of the skin test containing recombinant SFP-10-ESAT-6 protein versus the laboratory test QuantiFERON-GIT] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2014; 7: 54–59 (in Russian).
  7. Lozovskaya M.E., Belouskhov V.V., Novik G.A. et al. Sovershenstvovanie diagnostiki tuberkuleza u detej na osnove immunoallergicheskikh testov [Improvement of tuberculosis diagnosis in children, by using new immunoallergic tests] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2012; 8: 40–43 (in Russian).
  8. Baryshnikova L.A., Lebedeva N.O., Katkov I.L. et al. Opyt novoy tehnologii skrininga detej i podrostkov na tuberkuljoznuyu infektsiyu v Samarskoj oblasti [Experience new technology screening children and adolescents for tuberculosis in Samara Region] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2012; 11: 27–32 (in Russian).
  9. Baryshnikova L.A., Lebedeva N.O., Katkova L.I. et al. Effektivnost' novogo preparata dlya diagnostiki tuberkuleza u detej i podrostkov [Experience with a new tuberculosis infection screening technology among children and adolescents the Samara Region] // *Voprosy sovremennoj pediatrii – Voprosy sovremennoj pediatrii*. 2012; 11: 104–108 (in Russian).
  10. Fatykhova R.Kh., Alekseev A.P. Voprosy sovremennoj pediatrii [Efficiency of screening for tuberculosis infection among children in Tatarstan Republic] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2016; 6: 39–42 (in Russian).
  11. Mordovskaya L.I., Oshchepkova N.M. Opyt primeneniya allergena tuberkuleznogo rekombinantnogo s cel'yu skrininga tuberkuleza u detej v respublike Saha (Yakutiya) [Experience of the recombinant tuberculosis allergen as a screening for pediatric tuberculosis in the Sakha Republic (Yakutia)] // *Tuberkulez i social'no znachimye zabolovaniya – Tuberculosis and other socially significant diseases*. 2016; 6: 39–42 (in Russian).
  12. Stasko E.Yu., Khasanshin G.S. Analiz primeneniya kozhnoy proby s preparatom allergena tuberkuleznogo rekombinantnogo kak skriningovogo metoda obsledovaniya na tuberkulez detej starshe 7 let v Penzenskoj oblasti v 2015 g. [Analysis of the use of skin testing with the drug recombinant TB allergen as a screening method to be tested for TB children older than 7 years in the Penza Region in 2015] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2016; 3: 52–56 (in Russian).
  13. Prikaz Minzdravsocrazvitiya Rossii ot 28.10.09 № 855 "O vnesenii izmeneniya v prilozhenie k prikazu Minzdrava Rossii ot 21 marta 2003 g. №109". [The order of the health Ministry of Russia dated 28.10.09 No. 855 "On amending Annex to order of Ministry of health of Russia from March 21, 2003 No. 109"]. M., 2009: 5 (in Russian).
  14. Stavitskaya N.V., Molchanova N.V., Dudchenko D.V. et al. Optimizatsiya skrininga tuberkuleznoj infektsii u detej [Optimization of screening for tuberculosis infection in children] // *Tuberkulez i bolezni legkib – Tuberculosis and lung diseases*. 2013; 12: 59–64 (in Russian).

Received April 04.2016

Accepted December 01.2016

Kabanets Nadezhda N., Assistant of Department of Tuberculosis and Pulmonology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Filinyuk Olga V., MD, Associate Professor, Head of Department of Tuberculosis and Pulmonology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., MD, Professor, Corresponding Member of RAS, Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Morozova Kseniya S., Postgraduate of Department of Tuberculosis and Pulmonology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kolokolova Olga V., PhD, Associate Professor, Department of Tuberculosis and Pulmonology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Kabanets Nadezhda N., nava-a4@mail2000.ru

УДК 616.24-006-079.4-073.756.8

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-39-55

Для цитирования: Колмогоров В.Г., Коновалов В.К., Леонов С.Л., Лобанов М.Н. Роль прицельных 3D-реконструкций при анализе качественных характеристик поверхности шаровидных образований легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 39–55

## Роль прицельных 3D-реконструкций при анализе качественных характеристик поверхности шаровидных образований легких

Колмогоров В.Г.<sup>1</sup>, Коновалов В.К.<sup>2</sup>, Леонов С.Л.<sup>3</sup>, Лобанов М.Н.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Диагностический центр Алтайского края  
Россия, 656038, г. Барнаул, Комсомольский пр., 75а*

<sup>2</sup> *Алтайский государственный медицинский университет  
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40*

<sup>3</sup> *Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова  
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46*

<sup>4</sup> *Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования  
Россия, 656045, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1/3*

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Повышение точности лучевой диагностики шаровидных образований легких (ШОЛ) путем разработки компьютерно-томографической семиотики качественных характеристик их поверхности и состояния окружающих бронхов с применением прицельных 3D-реконструкций.

**Материал и методы.** Обследовано 560 пациентов с ШОЛ в возрасте 3–89 лет. Прицельная 3D-реконструкция осуществлялась с использованием опции программы 3D Fly Through (Toshiba Medical Systems, Япония), при которой исключали ткани, окружающие ШОЛ на расстоянии 5–10 мм от наружных границ. ШОЛ вписывали в объем куба. При первичном центральном и периферическом раке легкого определялось преобладание количества больных с выражено шероховатой поверхностью ШОЛ над слабо шероховатой поверхностью. При инфильтративном туберкулезе, пневмонии, эхинококке, ретенционных кистах определялось преобладание количества больных со слабо шероховатой поверхностью ШОЛ над выражено шероховатой поверхностью. При единичных метастазах рака, единичных и множественных туберкуломах определялось преобладание количества больных с неравномерно гладкой поверхностью ШОЛ над равномерно гладкой поверхностью. При множественных метастазах рака, очаговом туберкулезе, цистицеркозе определялось преобладание количества больных с равномерно гладкой поверхностью ШОЛ над неравномерно гладкой поверхностью. При доброкачественных опухолях, эозинофильном инфильтрате, гамартохондроме, аспергилломе, хроническом абсцессе, внутрилегочной гематоме не определялось различий между количеством больных с равномерно гладкой поверхностью ШОЛ и неравномерно гладкой поверхностью. При первичном раке легкого, единичных и множественных туберкуломах, эхинококке, цистицеркозе определялось преобладание количества больных с выражено деформированными бронхами, окружающими ШОЛ, над умеренно деформированными бронхами. При инфильтративном и очаговом туберкулезе определялось преобладание количества больных с умеренно деформированными бронхами, окружающими ШОЛ, над выражено деформированными бронхами.

**Результаты.** При пневмонии, доброкачественных опухолях, ретенционных кистах, гамартохондромах, аспергилломах, хронических абсцессах, внутрилегочной гематоме не определялось различий между

✉ Колмогоров Владимир Геннадьевич, e-mail: vkolmogorov@dcak.ru

количеством больных с выражено деформированными бронхами, окружающими ШОЛ, и умеренно деформированными бронхами. У больных с единичными и множественными метастазами, эозинофильным инфильтратом бронхи, окружающие ШОЛ, не были изменены. Необходима разработка программного обеспечения, позволяющего количественно характеризовать поверхность ШОЛ и степень деформации окружающих бронхов.

**Ключевые слова:** шаровидные образования легких, мультиспиральная компьютерная томография, 3D-реконструкция, поверхность шаровидных образований легких.

## ВВЕДЕНИЕ

При визуальной интерпретации дескрипторов шаровидных образований легких (ШОЛ) при мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) используются традиционные подходы, безусловно оправдавшие себя при аналоговых методах исследования. В частности характеризуются контуры ШОЛ, свойственные суммационной теневой картине классических медицинских изображений. Они оцениваются с чисто описательной позиции – четкие, нечеткие, недостаточно четкие, бугристые, волнистые, полициклические, лучистые, фестончатые, ландшафтообразные и т.п.

Эти описания неоднозначны, неточны, зависят от личностных зрительных впечатлений врача-рентгенолога, что приводит к поливариантной трактовке заключений и, как следствие, к неверной диагностике [1]. Кроме того при таком подходе не представляется возможным получить целостное представление об изучаемом объекте.

Вычислительные методы и современное программное обеспечение компьютерных томографов открывают новые возможности, позволяющие рассматривать поверхность ШОЛ на всем ее протяжении со всех сторон полипозиционно [2–4]. Характерно, что во время дополнительной обработки МСКТ-изображений применяют развитое и сложное программное обеспечение, разрабатываемое на основе исследований тканеэквивалентных фантомов [5–7] с последующим использованием полученных результатов в клинике [8, 9]. При этом используется терминология, заимствованная из программных продуктов, разработанных для профессиональных программных сред с целью создания и редактирования 3D-графики и анимации: отображение затененной поверхности, проекции минимальной и максимальной интенсивности, рендеринг и т.д.

Цель исследования – повышение точности лучевой диагностики ШОЛ путем разработки компьютерно-томографической семиотики качественных характеристик их поверхности и состояния окружающих бронхов с применением прицельных 3D-реконструкций.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведена МСКТ у 560 пациентов с ШОЛ в возрасте 3–89 лет на компьютерных томографах Aquillion 64 и Asteion 4 (Toshiba Medical Systems, Япония) в фазе максимального вдоха. Перед сканированием проводилась тренировка задержки дыхания, позволявшая увеличить время задержки вдоха. Шаг сканирования – 1,0 мм, напряжение на трубке 120 kV у взрослых (у детей – 80 kV). Осуществлялась реконструкция срезов толщиной 1 мм, матрица 512 × 512 элементов. С целью детального изучения полученных изображений, их сравнения у разных пациентов сканы записывали в формате DICOM на оптические компакт-диски. Апостериорный анализ сканов проводили при помощи программы Vitrea 2 (Toshiba Medical Systems) [10]. Обследовано 359 (64,1%) мужчин и 201 женщина (35,9%). У всех пациентов диагнозы были верифицированы морфологическими, бактериологическими и клиническими методами (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

| Распределение больных по формам заболеваний (n = 560) |             |                          |     |
|-------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|-----|
| Форма заболевания                                     | Абс. кол-во | Отн. кол-во,<br>M ± m, % |     |
| Первичный рак:                                        |             |                          |     |
| центральный                                           | 78          | 13,9                     | 1,5 |
| периферический                                        | 45          | 8,0                      | 1,1 |
| Метастазы рака:                                       |             |                          |     |
| единичные                                             | 61          | 10,9                     | 1,3 |
| множественные                                         | 32          | 5,7                      | 1,0 |
| Инфильтративный туберкулез                            | 91          | 16,2                     | 1,6 |
| Туберкуломы:                                          |             |                          |     |
| единичные                                             | 67          | 12,0                     | 1,4 |
| множественные                                         | 18          | 3,2                      | 0,7 |
| Очаговый туберкулез                                   | 39          | 7,0                      | 1,1 |
| Пневмония                                             | 64          | 11,4                     | 1,3 |
| Эхинококк                                             | 12          | 2,1                      | 0,6 |
| Доброкачественные опухоли                             | 10          | 1,8                      | 0,6 |
| Ретенционные кисты                                    | 9           | 1,6                      | 0,5 |
| Цистицеркоз                                           | 7           | 1,2                      | 0,5 |
| Эозинофильный инфильтрат                              | 6           | 1,1                      | 0,4 |
| Гамартохондрома                                       | 6           | 1,1                      | 0,4 |
| Аспергиллома                                          | 5           | 0,9                      | 0,4 |
| Хронический абсцесс                                   | 5           | 0,9                      | 0,4 |
| Внутрилегочная гематома                               | 5           | 0,9                      | 0,4 |

Прицельная 3D-реконструкция осуществлялась с использованием опции программы 3D Fly Through (Toshiba Medical Systems, Япония), при которой исключали ткани, окружающие ШОЛ на расстоянии 5–10 мм от наружных границ, ШОЛ вписывали в объем куба. При диссеминации множественных ШОЛ небольших размеров (2–5 мм) в объем куба включали их группу. Рассматривали поверхность ШОЛ в шести плоскостях соответственно граням вырезанного куба (рис. 1).

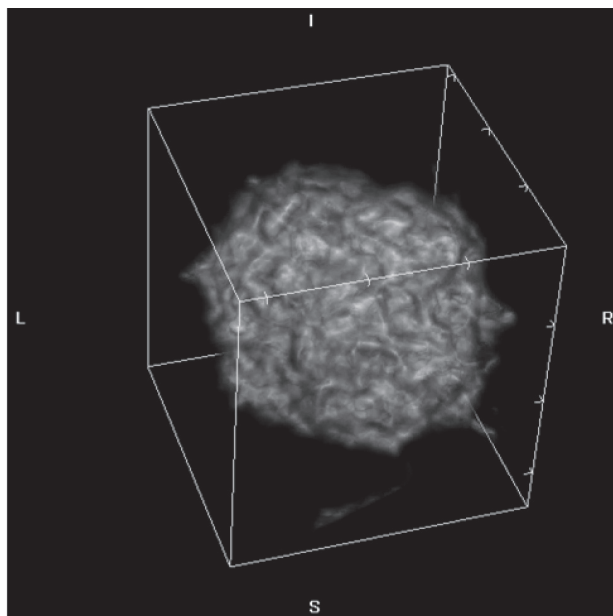


Рис. 1. Прицельная 3D-реконструкция поверхности ШОЛ больного, 63 года: периферический рак в переднем сегменте верхней доли правого легкого

Необходимо отметить, что поверхность – традиционное определение для двумерного многообразия в пространстве [11]. Используется отличающаяся терминология в описании ее характеристик в различных областях знаний. Так, применяется термин «шероховатость» – совокупность микронеровностей поверхности, описываемая набором параметров, характеризующих

среднюю и максимальную высоту неровностей и их ширину, средние расстояния между ними и т.д. [12]. Возможно использовать этот термин и при изучении медицинских изображений ШОЛ. Так как этому определению можно дать аналитическое выражение, впоследствии возможна и количественная характеристика поверхности ШОЛ. Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием критерия Стьюдента с вероятностью безошибочного прогноза 95% ( $p < 0,05$ ) (А.М. Мерков, Л.Е. Поляков. Санитарная статистика. Л.: Медицина. 1974). Средние значения представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из преимуществ прицельного 3D-моделирования явилась возможность рассмотреть поверхность ШОЛ в разных проекциях и с разных сторон полипозиционно.

При этом за выражено шероховатую поверхность ШОЛ (в противоположность слабо шероховатой поверхности) принималась такая поверхность, когда количество ее неровностей было заметно больше во всех шести рассматриваемых плоскостях. За гладкую равномерную поверхность ШОЛ принималась такая поверхность, когда не отмечалось неровностей во всех шести рассматриваемых плоскостях. За гладкую неравномерную поверхность ШОЛ принималась такая, когда хотя бы в одной из рассматриваемых плоскостях отмечались выступы (рис. 2).

При локализации ШОЛ в непосредственной близости от средостения, ребер, купола диафрагмы у 37 (6,6%) больных невозможно было визуализировать поверхность, прилежащую к этим анатомическим образованиям. У обследованных больных поверхность ШОЛ была шероховатой и гладкой, окружающие бронхи деформированы и не изменены (рис. 3–18).

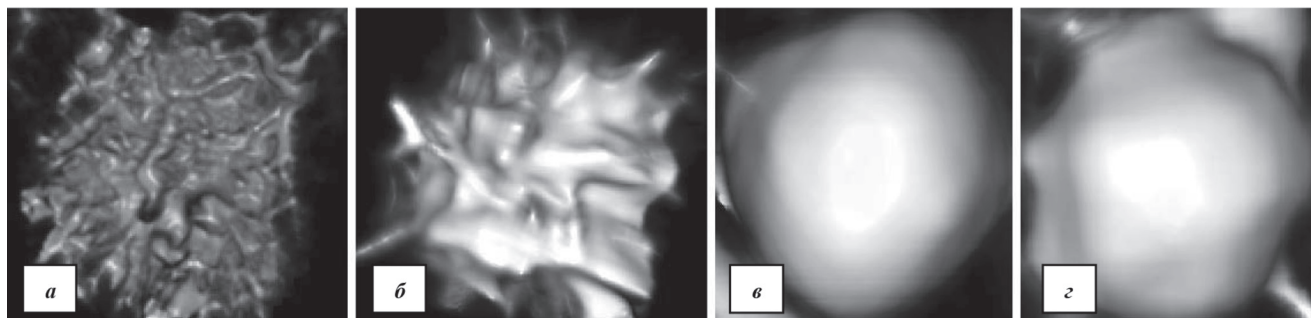


Рис. 2. Виды состояния поверхности ШОЛ: а – выражено шероховатая поверхность; б – слабо шероховатая поверхность; в – равномерно гладкая поверхность; г – неравномерно гладкая поверхность

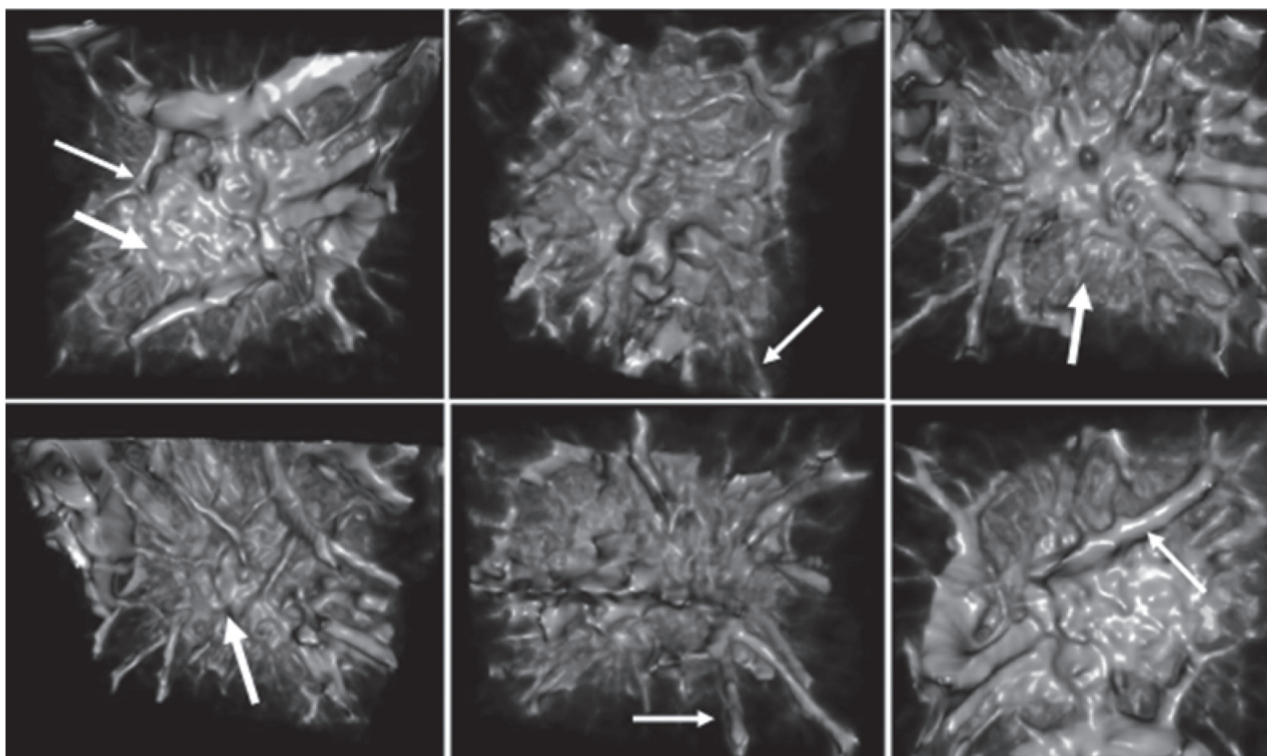


Рис. 3. Поверхность ШОЛ больного, 63 года: центральный рак в заднем базальном сегменте нижней доли левого легкого. Широкие стрелки – выражено шероховатая поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи

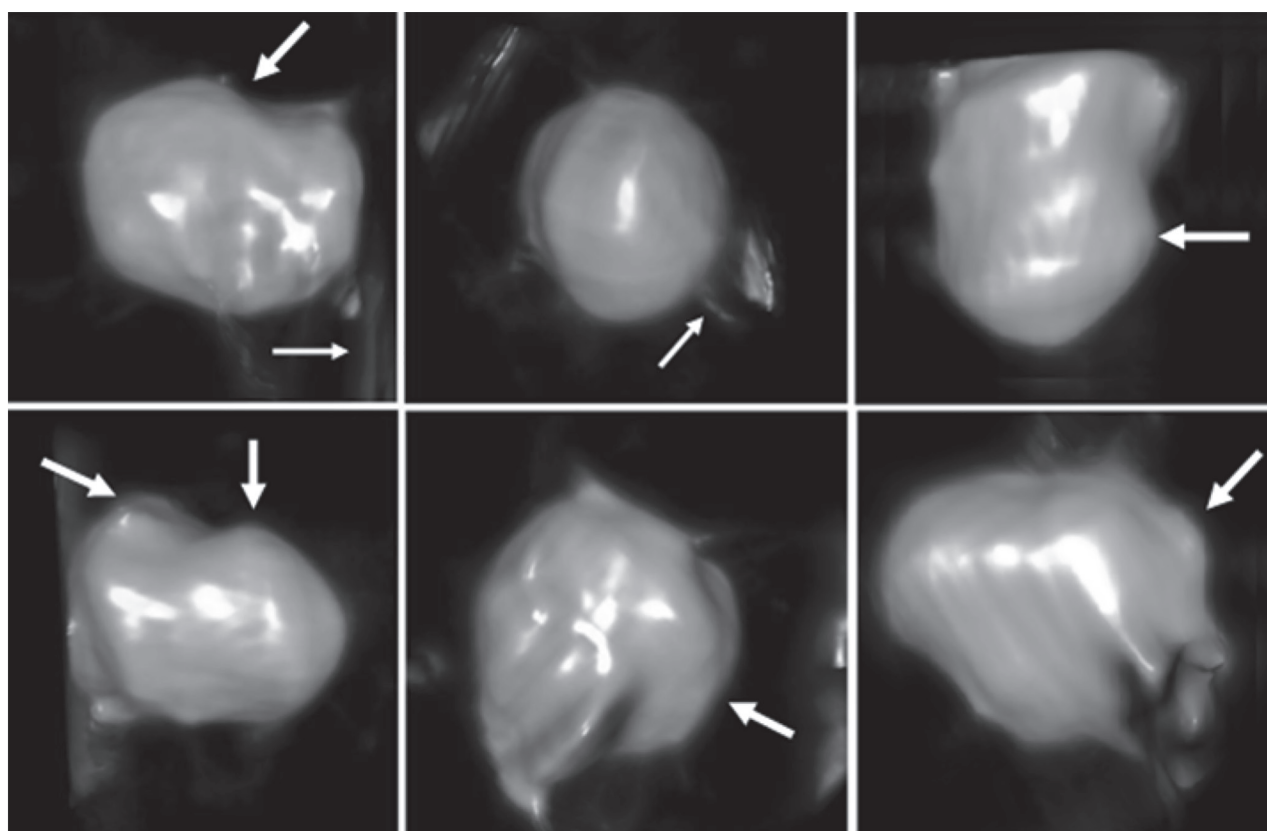


Рис. 4. Поверхность ШОЛ больной, 71 год: единственный метастаз рака щитовидной железы в медиальном сегменте средней доли правого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – неизменные бронхи

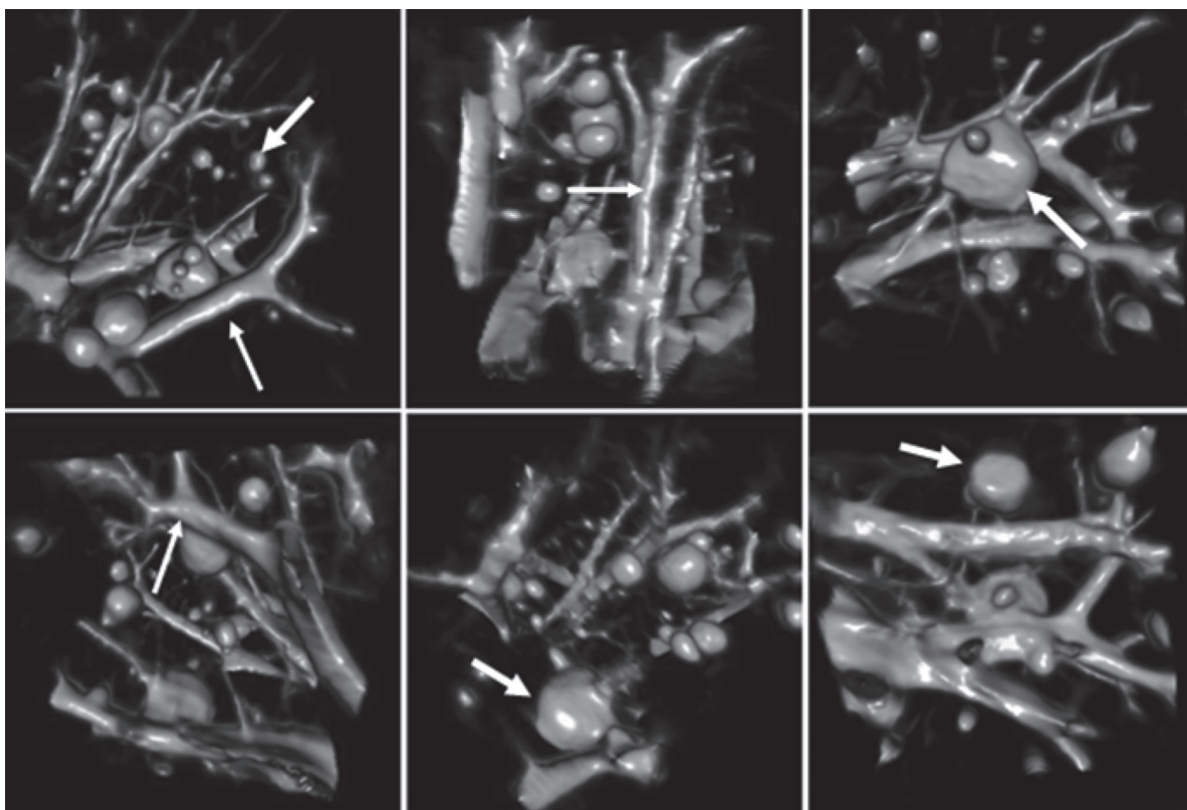


Рис. 5. Поверхность ШОЛ больной, 28 лет: множественные метастазы рака молочной железы в нижней доле левого легкого. Широкие стрелки – гладкая равномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – неизменные бронхи

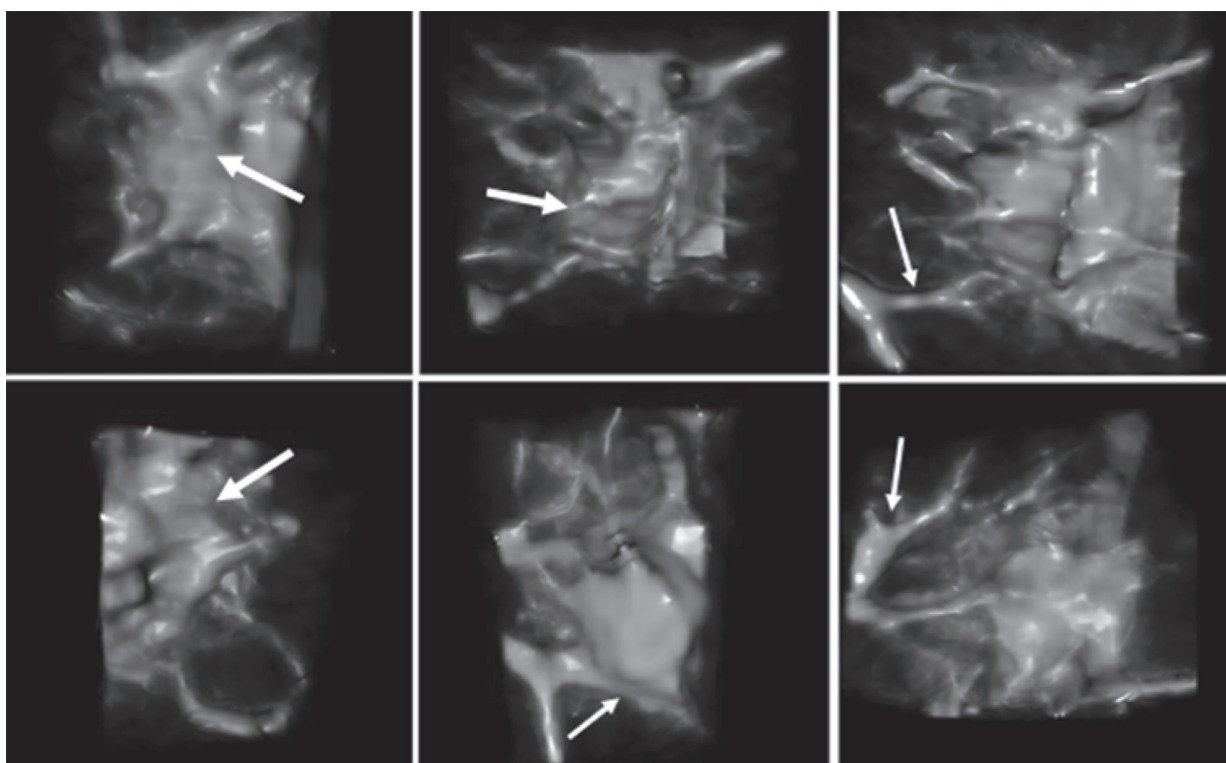


Рис. 6. Поверхность ШОЛ больной, 14 лет: инфильтративный туберкулез в верхушечном и заднем сегментах верхней доли правого легкого. Широкие стрелки – слабо шероховатая поверхность ШОЛ; узкие стрелки – умеренно деформированные бронхи

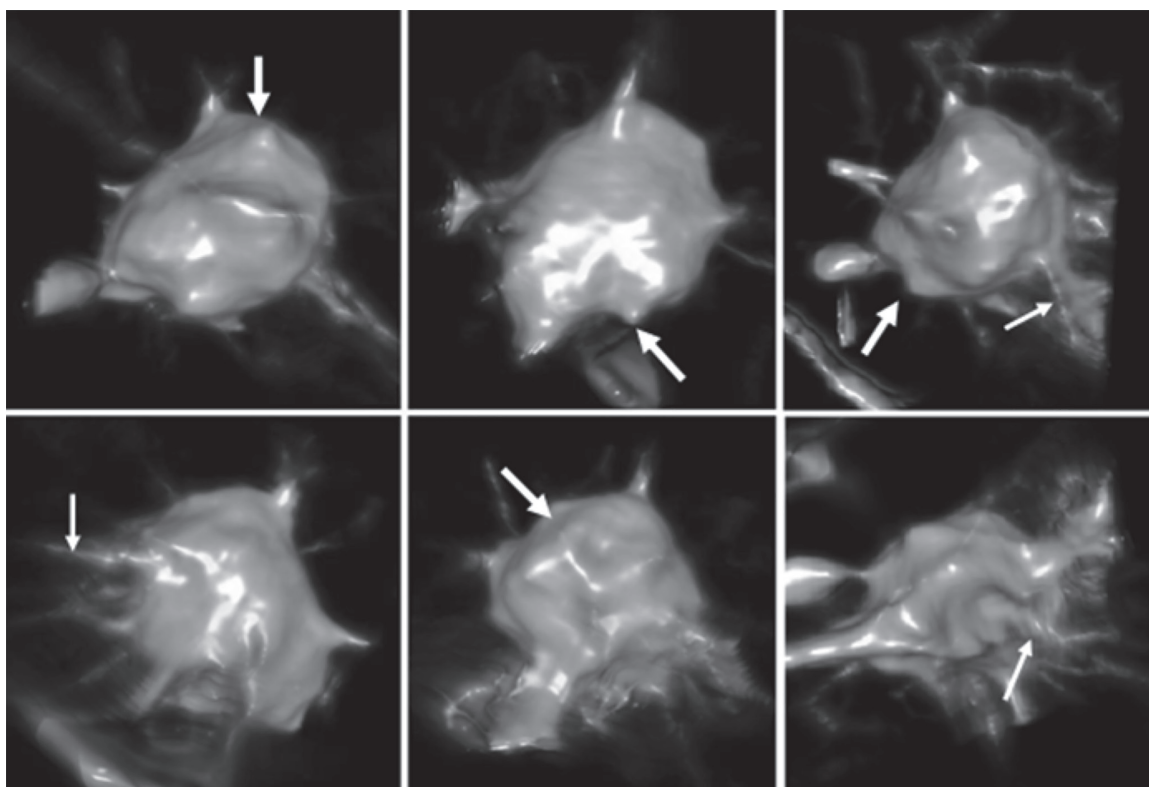


Рис. 7. Поверхность ШОЛ больного, 61 год: единичная туберкулома в заднем сегменте верхней доли правого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи

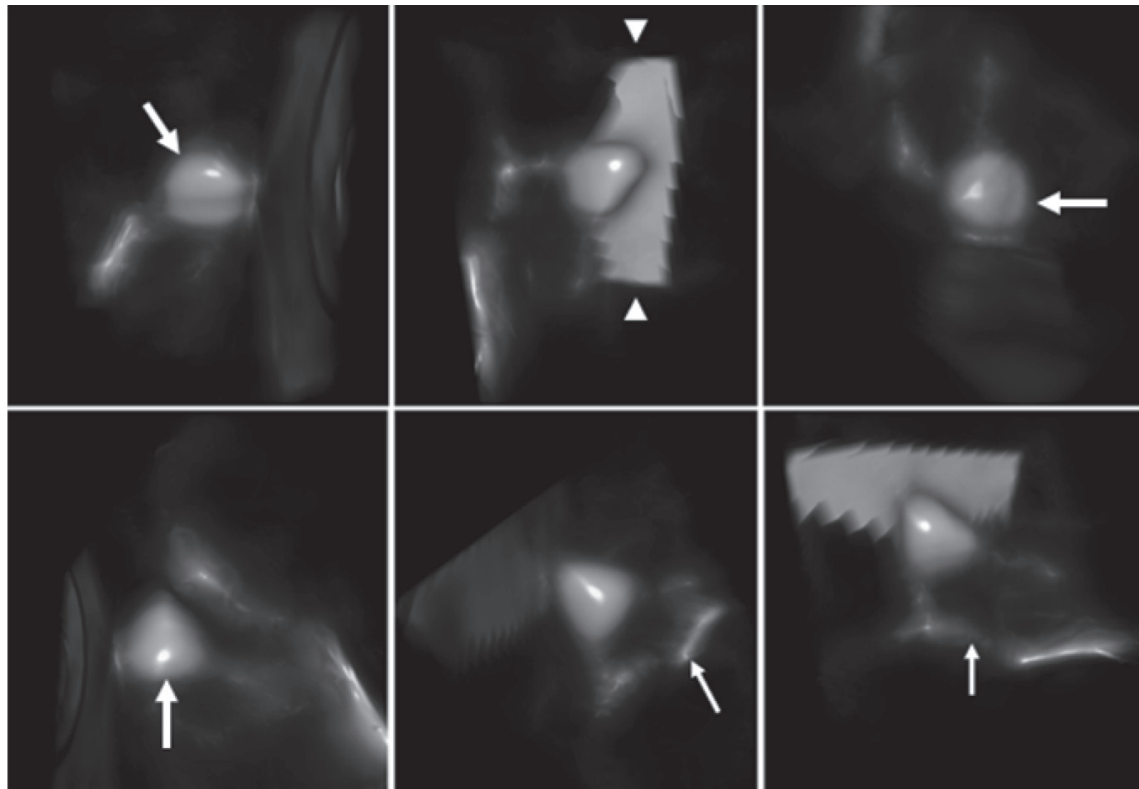


Рис. 8. Поверхность ШОЛ больной, 7 лет: очаговый туберкулез в латеральном сегменте средней доли справа. Широкие стрелки – гладкая равномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – умеренно деформированные бронхи; головки стрелок – междолевая плевра

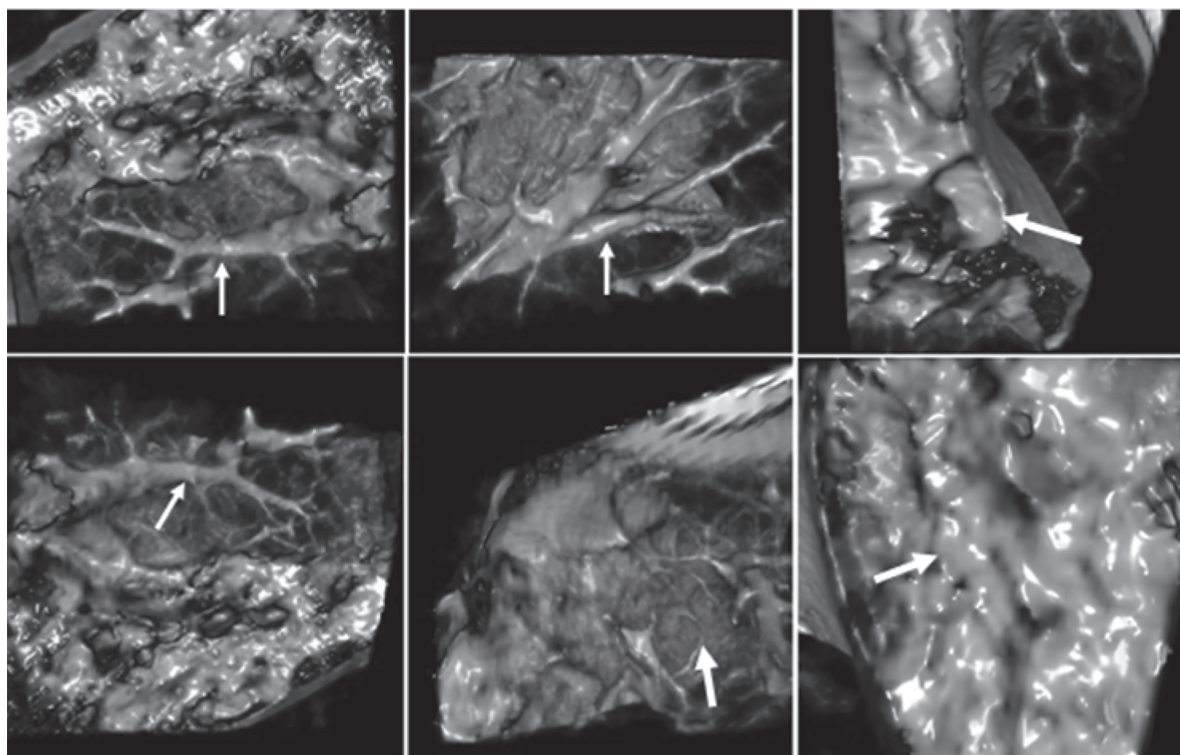


Рис. 9. Поверхность ШОЛ больного, 61 год: сегментарная пневмония в переднем базальном сегменте нижней доли левого легкого. Широкие стрелки – слабо шероховатая поверхность ШОЛ; узкие стрелки – умеренно деформированы бронхи

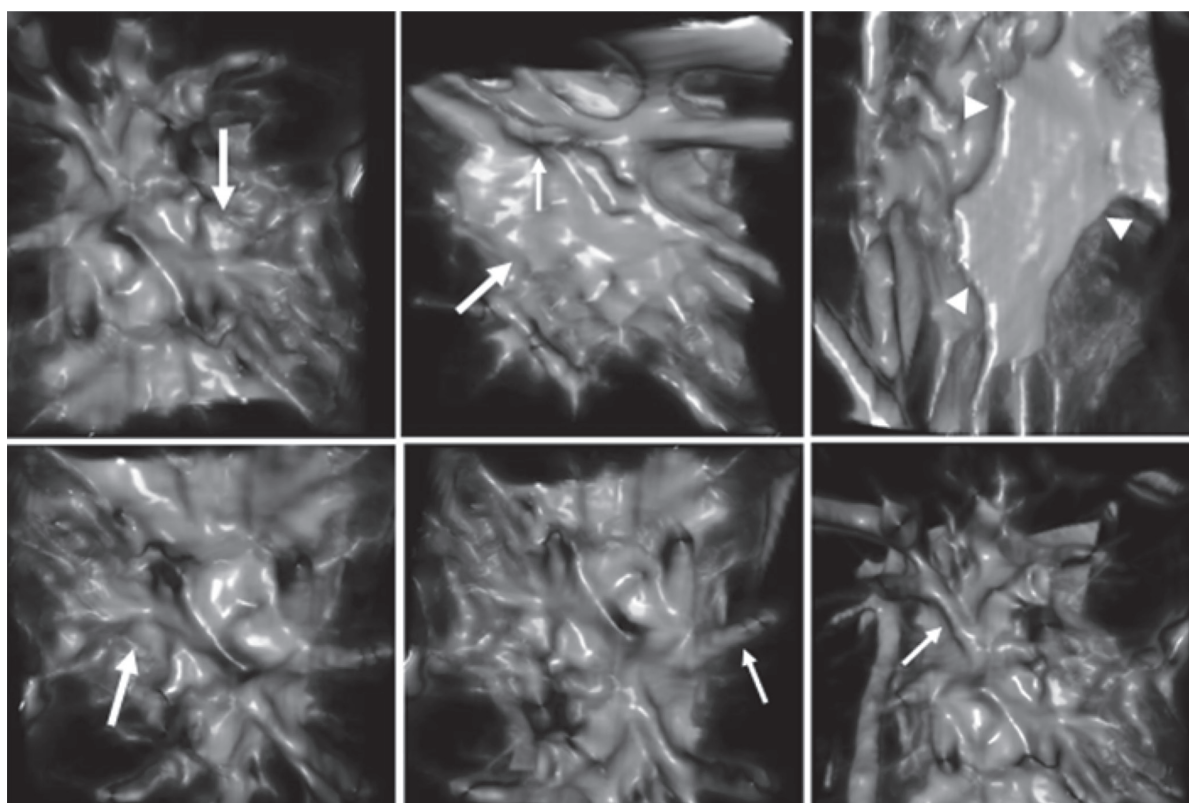


Рис. 10. Поверхность ШОЛ больной, 50 лет: эхинококк в верхушечном сегменте нижней доли левого легкого. Широкие стрелки – слабо шероховатая поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи; головки стрелок – междолевая плевра

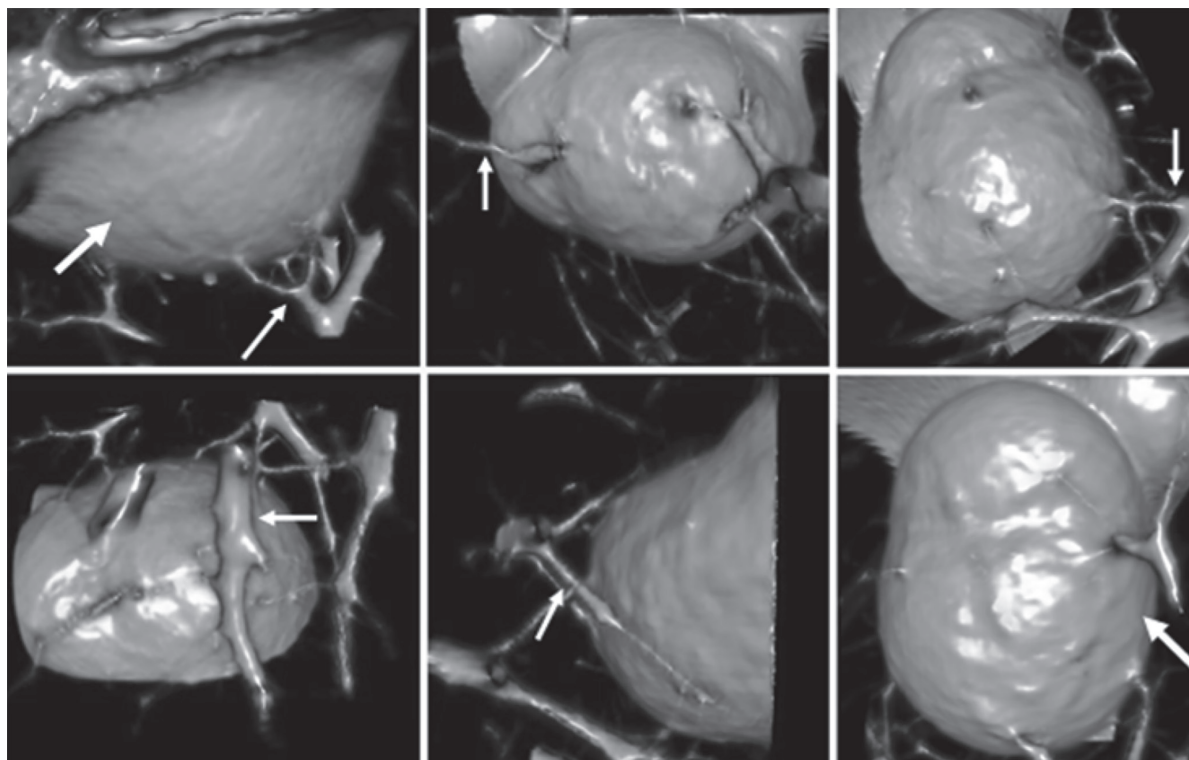


Рис. 11. Поверхность ШОЛ больного, 49 лет: внутрилегочная липома в переднем сегменте верхней доли левого легкого. Широкие стрелки – гладкая равномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – умеренно деформированные бронхи

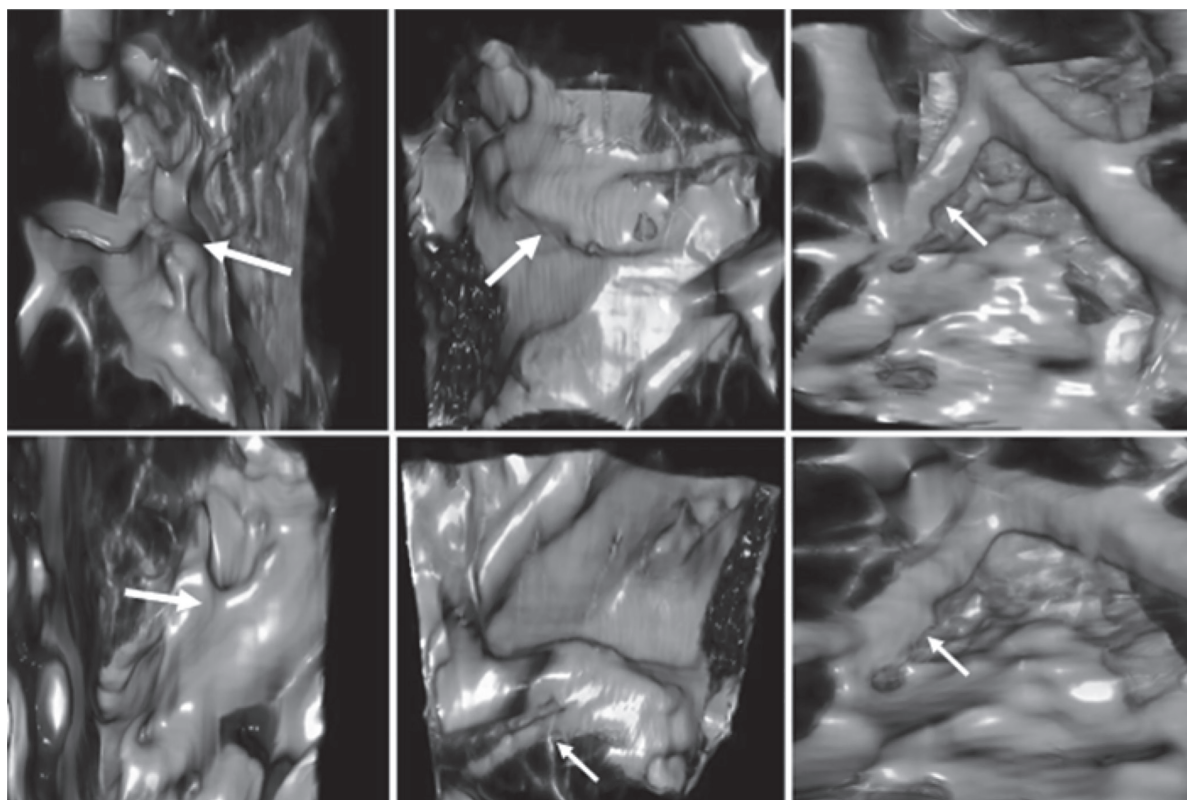


Рис. 12. Поверхность ШОЛ больного, 31 год: ретенционные кисты в заднем базальном сегменте нижней доли правого легкого. Широкие стрелки – слабо шероховатая поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи

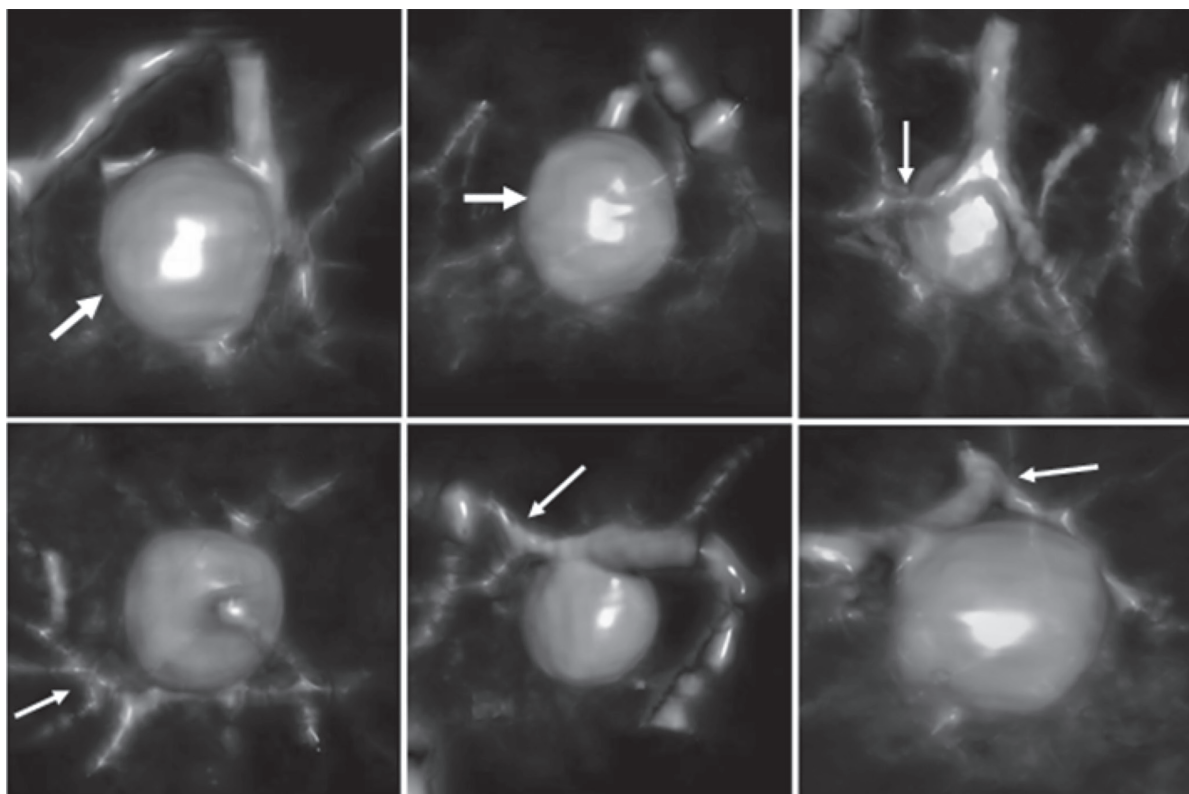


Рис. 13. Поверхность ШОЛ больного, 47 лет: цистицеркоз в верхушечном сегменте нижней доли правого легкого. Широкие стрелки – гладкая равномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи

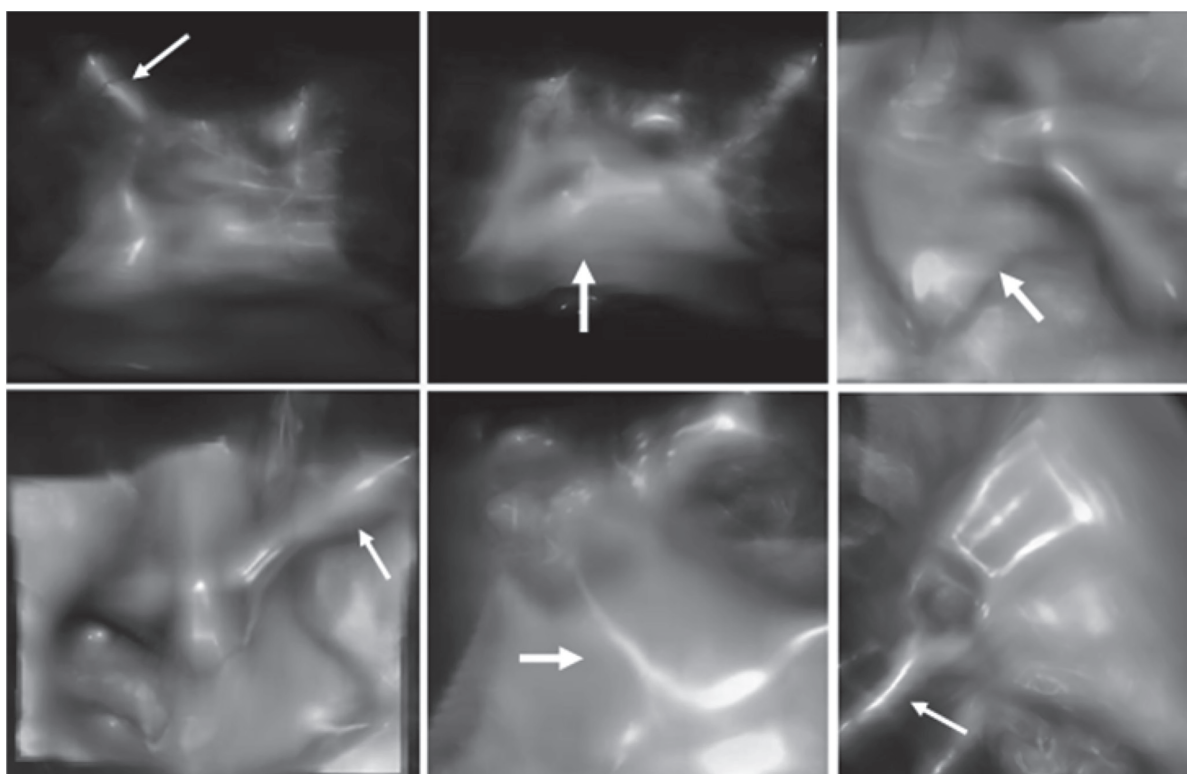


Рис. 14. Поверхность ШОЛ больной, 45 лет: эозинофильный инфильтрат в верхушечном сегменте нижней доли левого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – неизмененные бронхи

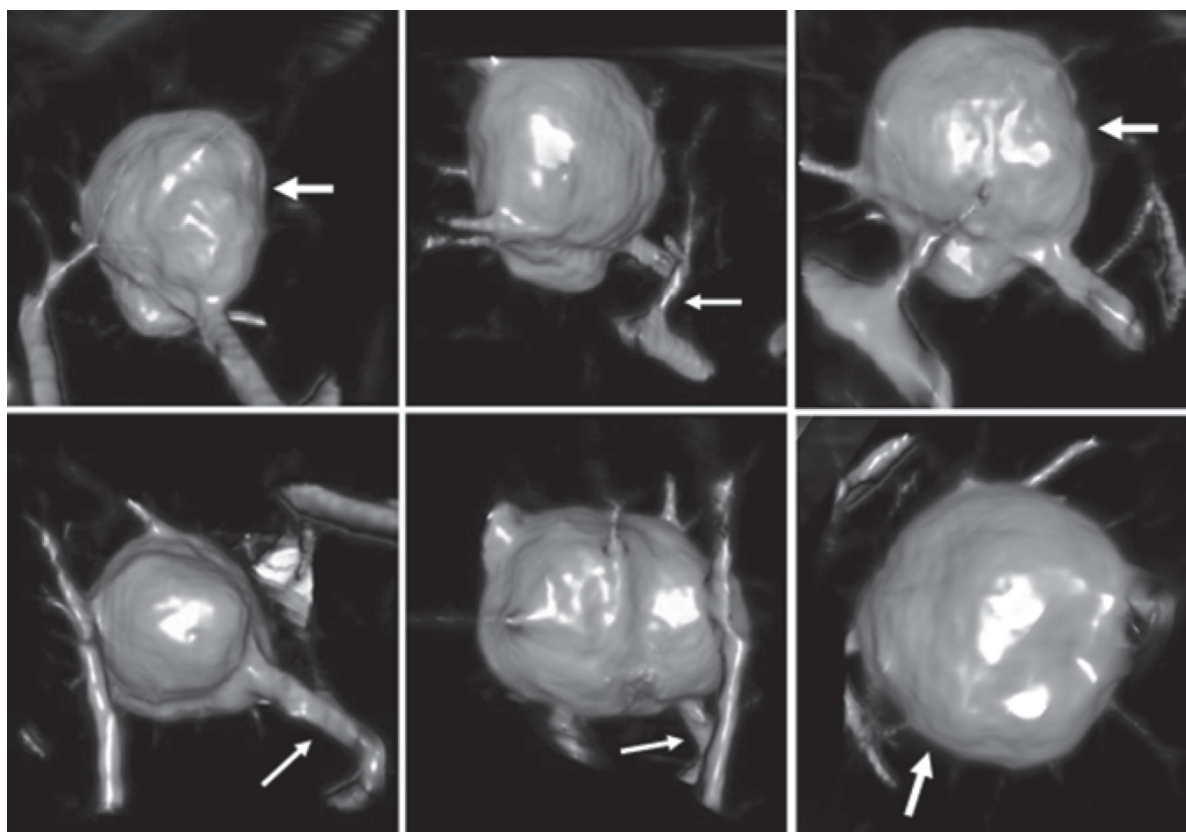


Рис. 15. Поверхность ШОЛ больного, 78 лет: гамартохондрома в заднем базальном сегменте нижней доли правого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – умеренно деформированные бронхи

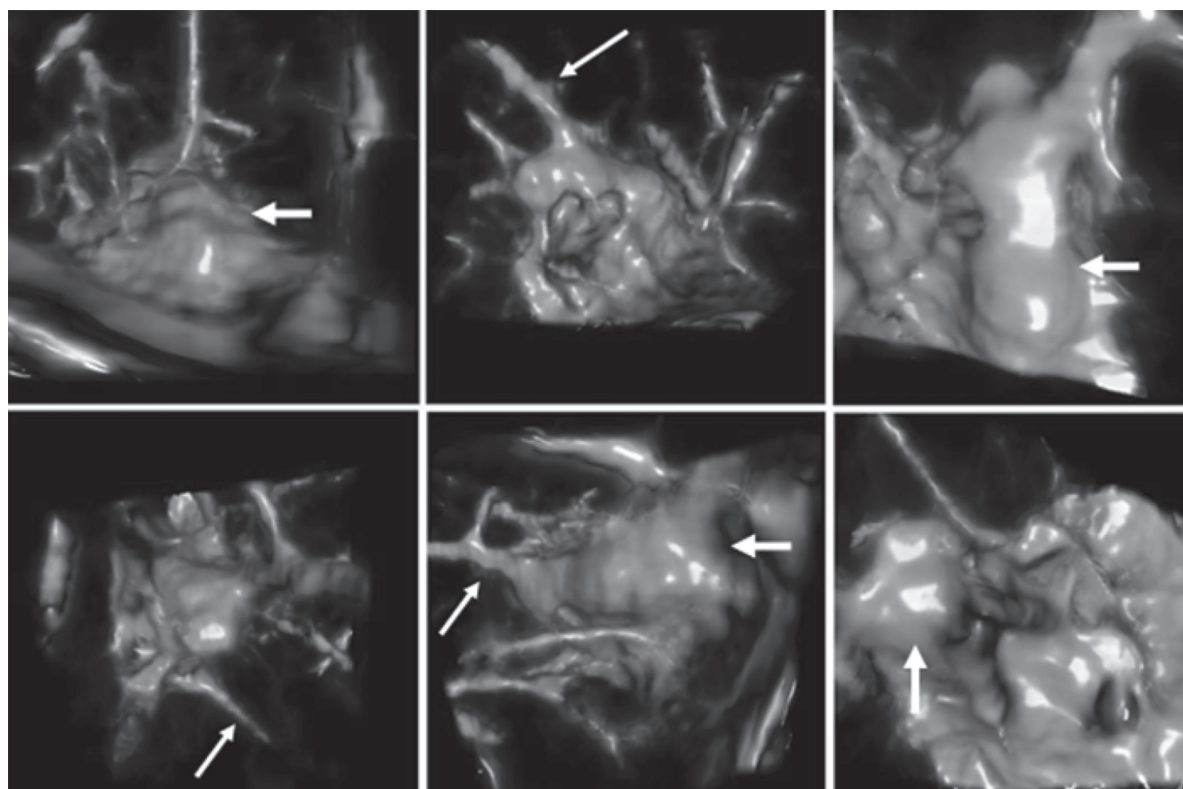


Рис. 16. Поверхность ШОЛ больной, 40 лет: аспергиллома в заднем сегменте верхней доли правого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи

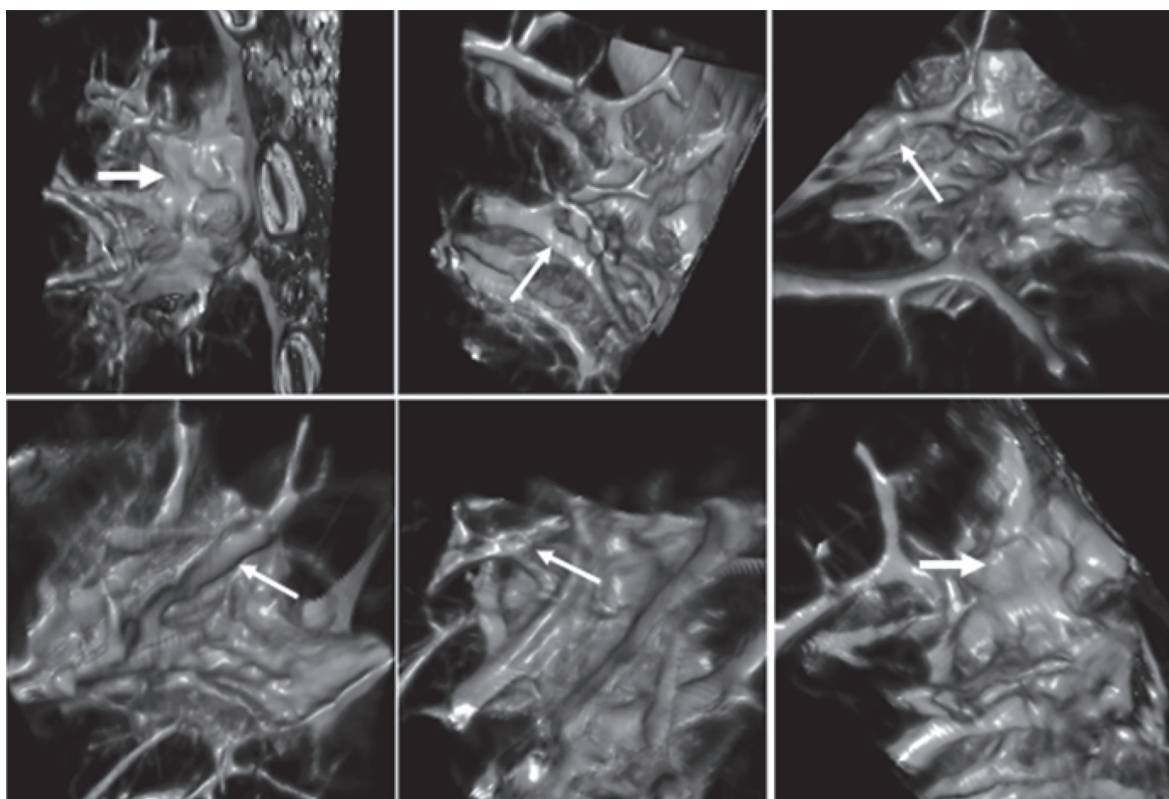


Рис. 17. Поверхность ШОЛ больного, 70 лет: хронический абсцесс в верхнем язычковом сегменте левого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – выражено деформированные бронхи

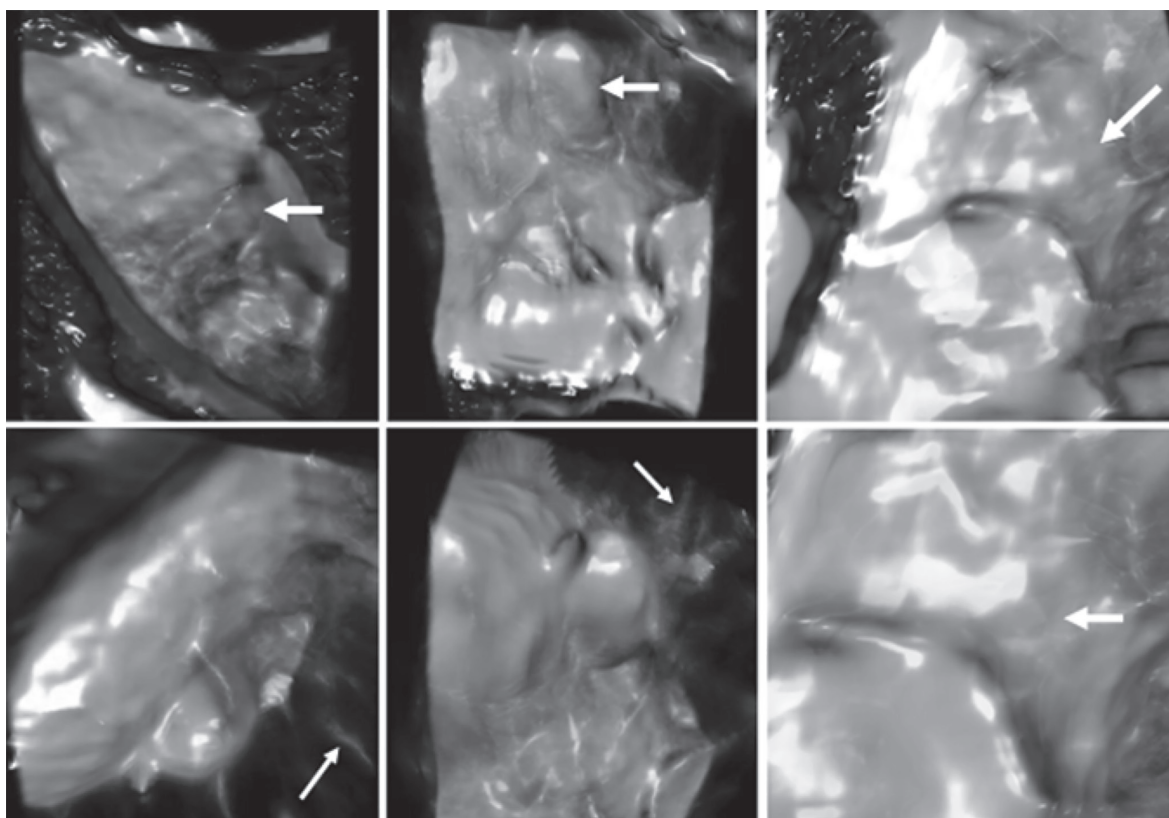


Рис. 18. Поверхность ШОЛ больного, 37 лет: внутрилегочная гематома в латеральном базальном сегменте нижней доли левого легкого. Широкие стрелки – гладкая неравномерная поверхность ШОЛ; узкие стрелки – умеренно деформированные бронхи

У 299 (53,4%) больных поверхность ШОЛ была выражено шероховатой или слабо шероховатой. При первичном центральном и периферическом раке легкого определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено шероховатой поверхностью ШОЛ над слабо шероховатой поверхностью:  $13,6 \pm 1,4$  против  $0,4 \pm 0,3$  ( $p = 0,001$ ) и  $7,9 \pm 1,1$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$ ) соответственно. При инфильт-

ративном туберкулезе, пневмонии, эхинококке, ретенционных кистах определялось статистически значимое преобладание количества больных со слабо шероховатой поверхностью ШОЛ над выражено шероховатой поверхностью:  $15,7 \pm 1,5$  против  $0,5 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$ ),  $10,5 \pm 1,3$  против  $0,9 \pm 0,4$  ( $p = 0,001$ ),  $1,8 \pm 0,6$  против  $0,4 \pm 0,3$  ( $p = 0,05$ ),  $1,4 \pm 0,5$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,05$ ) соответственно (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

| Состояние шероховатой поверхности ШОЛ           |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
|-------------------------------------------------|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------|
| Форма заболевания                               | Выражено шероховатая   |                        |          | Слабо шероховатая      |                        |          | <i>p</i> |
|                                                 | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          |          |
|                                                 |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |          |
| Первичный рак:<br>центральный<br>периферический | 76                     | 13,6                   | 1,4      | 2                      | 0,4                    | 0,3      | 0,001    |
|                                                 | 44                     | 7,9                    | 1,1      | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 0,001    |
| Инфильтративный туберкулез                      | 3                      | 0,5                    | 0,2      | 88                     | 15,7                   | 1,5      | 0,001    |
| Пневмония                                       | 5                      | 0,9                    | 0,4      | 59                     | 10,5                   | 1,3      | 0,001    |
| Эхинококк                                       | 2                      | 0,4                    | 0,3      | 10                     | 1,8                    | 0,6      | 0,05     |
| Ретенционные кисты                              | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 8                      | 1,4                    | 0,5      | 0,05     |
| Всего                                           | 131                    | 23,4                   | 1,8      | 168                    | 30,0                   | 1,9      | 0,05     |

У 261 (46,6%) больного поверхность ШОЛ была равномерно гладкая или неравномерно гладкая. При единичных метастазах рака определялось статистически значимое преобладание количества больных с неравномерно гладкой поверхностью ШОЛ над равномерно гладкой поверхностью:  $8,0 \pm 0,4$  против  $2,9 \pm 0,7$  ( $p = 0,001$ ). При множественных метастазах рака определялось статистически значимое преобладание количества больных с равномерно гладкой поверхностью ШОЛ над неравномерно гладкой поверхностью:  $5,2 \pm 0,9$  против  $0,5 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$ ). При единичных и множественных туберкуломах определялось статистически значимое преобладание количества больных с неравномерно гладкой поверхностью ШОЛ над равномерно гладкой поверхностью:  $11,8 \pm 1,4$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$ ) и  $3,0 \pm 0,7$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,001$ ) соответственно. При очаговом туберкулезе определялось статистически значимое преобладание количества больных с равномерно гладкой поверхностью ШОЛ над не-

равномерно гладкой поверхностью:  $5,2 \pm 0,9$  против  $1,3 \pm 0,4$  ( $p = 0,001$ ). При доброкачественных опухолях не определялось статистически значимых различий между количеством больных с равномерно гладкой поверхностью и неравномерно гладкой поверхностью ШОЛ:  $1,4 \pm 0,5$  против  $0,4 \pm 0,3$  ( $p = 0,1$ ). При цистицеркозе определялось статистически значимое преобладание количества больных с равномерно гладкой поверхностью ШОЛ над неравномерно гладкой поверхностью:  $1,1 \pm 0,3$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,02$ ). При эозинофильном инфильтрате, гамартохондроме, аспергилломе, хроническом абсцессе, внутрилегочной гематоме не определялось статистически значимых различий между количеством больных с равномерно гладкой поверхностью и неравномерно гладкой поверхностью ШОЛ:  $0,4 \pm 0,3$  против  $0,7 \pm 0,3$  ( $p = 0,5$ ),  $0,2 \pm 0,2$  против  $0,9 \pm 0,4$  ( $p = 0,25$ ),  $0,2 \pm 0,2$  против  $0,7 \pm 0,3$  ( $p = 0,25$ ),  $0,2 \pm 0,2$  против  $0,7 \pm 0,3$  ( $p = 0,25$ ),  $0,2 \pm 0,2$  против  $0,7 \pm 0,3$  ( $p = 0,25$ ) соответственно (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

| Состояние гладкой поверхности ШОЛ |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------|
| Форма заболевания                 | Равномерно гладкая     |                        |          | Неравномерно гладкая   |                        |          | <i>p</i> |
|                                   | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          |          |
|                                   |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |          |
| Метастазы рака:                   |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
| единичные                         | 16                     | 2,9                    | 0,7      | 45                     | 8,0                    | 0,4      | 0,001    |
| множественные                     | 29                     | 5,2                    | 0,9      | 3                      | 0,5                    | 0,2      | 0,001    |
| Туберкуломы:                      |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
| единичные                         | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 66                     | 11,8                   | 1,4      | 0,001    |
| множественные                     | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 17                     | 3,0                    | 0,7      | 0,001    |

О к о н ч а н и е т а б л . 3

| Форма заболевания         | Равномерно гладкая     |                        |          | Неравномерно гладкая   |                        |          | <i>p</i> |
|---------------------------|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------|
|                           | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          |          |
|                           |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |          |
| Очаговый туберкулез       | 29                     | 5,2                    | 0,9      | 10                     | 1,3                    | 0,4      | 0,001    |
| Доброкачественные опухоли | 8                      | 1,4                    | 0,5      | 2                      | 0,4                    | 0,3      | 0,1      |
| Цистицеркоз               | 6                      | 1,1                    | 0,3      | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 0,02     |
| Эозинофильный инфильтрат  | 2                      | 0,4                    | 0,3      | 4                      | 0,7                    | 0,3      | 0,5      |
| Гамартохондрома           | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 5                      | 0,9                    | 0,4      | 0,25     |
| Аспергиллома              | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 4                      | 0,7                    | 0,3      | 0,25     |
| Хронический абсцесс       | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 4                      | 0,7                    | 0,3      | 0,25     |
| Внутрилегочная гематома   | 1                      | 0,2                    | 0,2      | 4                      | 0,7                    | 0,3      | 0,25     |
| Всего                     | 96                     | 17,1                   | 1,6      | 165                    | 29,5                   | 1,9      | 0,001    |

У 461 (82,3%) больного бронхи, окружающие ШОЛ, были выражено деформированы или умеренно деформированы. При первичном центральном и периферическом раке легкого определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено деформированными бронхами над умеренно деформированными бронхами:  $12,0 \pm 1,4$  против  $2,0 \pm 0,6$  ( $p = 0,001$ ),  $6,6 \pm 1,0$  против  $1,4 \pm 0,5$  ( $p = 0,001$ ) соответственно. При инфильтративном туберкулезе определялось статистически значимое преобладание количества больных с умеренно деформированными бронхами над выражено деформированными бронхами:  $13,6 \pm 1,4$  против  $2,7 \pm 0,7$  ( $p = 0,001$ ). При единичных и множественных туберкуломах определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено деформированными бронхами над умеренно деформированными бронхами:  $9,6 \pm 1,2$  против  $2,3 \pm 0,6$  ( $p = 0,001$ ),  $2,7 \pm 0,7$  против  $0,5 \pm 0,3$  ( $p = 0,01$ ) соответственно. При очаговом туберкулезе определялось статистически значимое преобладание количества больных с умеренно деформированными бронхами над выражено деформированными бронхами:  $4,8 \pm 0,9$  против  $2,1 \pm 0,6$  ( $p = 0,02$ ). При пневмонии не определялось статистически значимых различий между количеством больных

с выражено деформированными бронхами и умеренно деформированными бронхами:  $4,8 \pm 0,9$  против  $6,6 \pm 1,0$  ( $p = 0,25$ ). При эхинококке определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено деформированными бронхами над умеренно деформированными бронхами:  $1,8 \pm 0,6$  против  $0,4 \pm 0,3$  ( $p = 0,05$ ). При доброкачественных опухолях, ретенционных кистах не определялось статистически значимых различий между количеством больных с выражено деформированными бронхами и умеренно деформированными бронхами:  $0,5 \pm 0,3$  против  $1,2 \pm 0,5$  ( $p = 0,25$ ),  $1,1 \pm 0,4$  против  $0,5 \pm 0,3$  ( $p = 0,25$ ) соответственно. При цистицеркозе определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено деформированными бронхами над умеренно деформированными бронхами:  $1,1 \pm 0,4$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,05$ ). При гамартохондроме, аспергилломе, хронических абсцессах, внутрилегочных гематомах не определялось статистически значимых различий между количеством больных с выражено деформированными бронхами и умеренно деформированными бронхами:  $0,4 \pm 0,3$  против  $0,7 \pm 0,3$  ( $p = 0,5$ ),  $0,7 \pm 0,3$  против  $0,2 \pm 0,2$  ( $p = 0,5$ ),  $0,5 \pm 0,3$  против  $0,4 \pm 0,3$  ( $p = 0,5$ ),  $0,2 \pm 0,2$  против  $0,7 \pm 0,3$  ( $p = 0,5$ ) соответственно (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

| Виды состояния бронхов, окружающих ШОЛ |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
|----------------------------------------|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------|
| Форма заболевания                      | Деформация             |                        |          |                        |                        |          | <i>p</i> |
|                                        | Выраженная             |                        |          | Умеренная              |                        |          |          |
|                                        | Абс.<br>кол-во больных | Отн. кол-во больных, % |          | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          |          |
|                                        |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |          |
| Первичный рак:                         |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
| центральный                            | 67                     | 12,0                   | 1,4      | 11                     | 2,0                    | 0,6      | 0,001    |
| периферический                         | 37                     | 6,6                    | 1,0      | 8                      | 1,4                    | 0,5      | 0,001    |
| Инфильтративный туберкулез             | 15                     | 2,7                    | 0,7      | 76                     | 13,6                   | 1,4      | 0,001    |
| Туберкуломы:                           |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
| единичные                              | 54                     | 9,6                    | 1,2      | 13                     | 2,3                    | 0,6      | 0,001    |
| множественные                          | 15                     | 2,7                    | 0,7      | 3                      | 0,5                    | 0,3      | 0,01     |
| Очаговый туберкулез                    | 12                     | 2,1                    | 0,6      | 27                     | 4,8                    | 0,9      | 0,02     |

О к о н ч а н и е т а б л . 4

| Форма заболевания         | Деформация             |                        |     |                        |                        |     | p     |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-----|------------------------|------------------------|-----|-------|
|                           | Выраженная             |                        |     | Умеренная              |                        |     |       |
|                           | Абс.<br>кол-во больных | Отн. кол-во больных, % |     | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |     |       |
|                           |                        | M                      | m   |                        | M                      | m   |       |
| Пневмония                 | 27                     | 4,8                    | 0,9 | 37                     | 6,6                    | 1,0 | 0,25  |
| Эхинококк                 | 10                     | 1,8                    | 0,6 | 2                      | 0,4                    | 0,3 | 0,05  |
| Доброкачественные опухоли | 3                      | 0,5                    | 0,3 | 7                      | 1,2                    | 0,5 | 0,25  |
| Ретенционные кисты        | 6                      | 1,1                    | 0,4 | 3                      | 0,5                    | 0,3 | 0,25  |
| Цистицеркоз               | 6                      | 1,1                    | 0,4 | 1                      | 0,2                    | 0,2 | 0,05  |
| Гамартохондрома           | 2                      | 0,4                    | 0,3 | 4                      | 0,7                    | 0,3 | 0,5   |
| Аспергиллома              | 4                      | 0,7                    | 0,3 | 1                      | 0,2                    | 0,2 | 0,5   |
| Хронический абсцесс       | 3                      | 0,5                    | 0,3 | 2                      | 0,4                    | 0,3 | 0,5   |
| Внутрилегочная гематома   | 1                      | 0,2                    | 0,2 | 4                      | 0,7                    | 0,3 | 0,5   |
| Всего                     | 262                    | 46,8                   | 2,1 | 199                    | 35,5                   | 2,0 | 0,001 |

У 99 (17,7%) больных бронхи, окружающие ШОЛ, не были изменены: у 61 (10,9%) больного при единичных метастазах:  $10,9 \pm 1,3$  против  $82,3 \pm 1,6$  всех больных с деформациями бронхов ( $p = 0,001$ ), у 32 (5,7%) больных с множественны-

ми метастазами:  $5,7 \pm 1,0$  против  $82,3 \pm 1,6$  всех больных с деформациями бронхов ( $p = 0,001$ ), у 6 (1,1%) больных с эозинофильным инфильтратом:  $1,1 \pm 0,4$  против  $82,3 \pm 1,6$  всех больных с деформациями бронхов ( $p = 0,001$ ) (табл. 5).

Т а б л и ц а 5

| Виды состояния бронхов, окружающих ШОЛ |                        |                        |          |                        |                        |          |          |
|----------------------------------------|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------|
| Форма заболевания                      | Не изменены            |                        |          | Деформированы          |                        |          | <i>p</i> |
|                                        | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          | Абс. кол-во<br>больных | Отн. кол-во больных, % |          |          |
|                                        |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |                        | <i>M</i>               | <i>m</i> |          |
| Метастазы рака:                        |                        |                        |          | 461                    | 82,3                   | 1,6      |          |
| единичные                              | 61                     | 10,9                   | 1,3      |                        |                        |          | 0,001    |
| множественные                          | 32                     | 5,7                    | 1,0      |                        |                        |          | 0,001    |
| Эозинофильный инфильтрат               | 6                      | 1,1                    | 0,4      |                        |                        |          | 0,001    |
| Всего                                  | 99                     | 17,7                   | 1,6      | 461                    | 82,3                   | 1,6      | 0,001    |

## ВЫВОДЫ

1. При первичном центральном и периферическом раке легкого определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено шероховатой поверхностью ШОЛ над слабо шероховатой поверхностью.

2. При инфильтративном туберкулезе, пневмонии, эхинококке, ретенционных кистах определялось статистически значимое преобладание количества больных со слабо шероховатой поверхностью ШОЛ над выражено шероховатой поверхностью.

3. При единичных метастазах рака, единичных и множественных туберкуломах определялось статистически значимое преобладание количества больных с неравномерной гладкой поверхностью ШОЛ над равномерной гладкой поверхностью.

4. При множественных метастазах рака, очаговом туберкулезе, цистицеркозе определялось статистически значимое преобладание количества больных с равномерной гладкой поверхно-

стью ШОЛ над неравномерной гладкой поверхностью.

5. При доброкачественных опухолях, эозинофильном инфильтрате, гамартохондроме, аспергилломе, хроническом абсцессе, внутрилегочной гематоме не определялось статистически значимых различий между количеством больных с равномерной гладкой поверхностью ШОЛ и неравномерной гладкой поверхностью.

6. При первичном раке легкого, единичных и множественных туберкуломах, эхинококке, цистицеркозе определялось статистически значимое преобладание количества больных с выражено деформированными бронхами, окружающими ШОЛ, над умеренно деформированными бронхами.

7. При инфильтративном и очаговом туберкулезе определялось статистически значимое преобладание количества больных с умеренно деформированными бронхами, окружающими ШОЛ, над выражено деформированными бронхами.

8. При пневмонии, доброкачественных опухолях, ретенционных кистах, гамартохондроме, аспергилломе, хронических абсцессах, внутрилегочной гематоме не определялось статистически значимых различий между количеством больных с выражено деформированными бронхами, окружающими ШОЛ, и умеренно деформированными бронхами.

9. У больных с единичными и множественными метастазами, эозинофильным инфильтратом бронхи, окружающие ШОЛ, не были изменены.

10. Необходима разработка программного обеспечения, позволяющего количественно характеризовать поверхность ШОЛ и степень деформации окружающих бронхов.

## 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Розенштраух А.С. Психофизиологические факторы в рентгенодиагностике // *Вестник рентгенологии и радиологии*. 1994; 4: 57–61.
2. Коновалов В.К., Шойхет Я.Н., Лобанов М.Н., Шевчук Ю.А., Бобров И.П., Колмогоров В.Г. Применение 3D-реконструкций при топографической мультиспиральной компьютерно-томографической диагностике шаровидных образований легких // *Проблемы клинической медицины*. 2011; 1–2: 52–59.
3. Солодкий В.А., Котляров П.М., Щербихина Е.В., Егорова Е.В., Шадури Е.В. Роль мультипланарных реконструкций при постпроцессинговой обработке изображений в диагностике очаговых образований легких // *Медицинская визуализация*. 2010; 2: 81–87.
4. Хоружик С.А., Михайлов А.Н. Основы КТ-визуализации. Часть 2. Постпроцессинговая обработка изображений // *Радиология-практика*. 2011; 4: 52–65.
5. Руководство пользователя рабочей станции Vitrea® 2, версия 3.9, пакет программного обеспечения анализа легких VPMC-7854B (08/2006). Компания Vital Images Inc. 2006: 9–19.
6. Kim M., Lee J.M., Yoon J.H., Son H., Choi J.W., Han J.K. et al. Adaptive iterative dose reduction algorithm in CT: effect on image quality compared with filtered back projection in body phantoms of different sizes // *Korean J. Radiol.* 2014; 15: 195–204. DOI: 10.3348/kjr.2014.15.2.195.
7. Xie X., Zhao Y., Snijder R.A., van Ooijen P.M., de Jong P.A., Oudkerk M. et al. Sensitivity and accuracy of volumetry of pulmonary nodules on low-dose 16- and 64-row multi-detector CT: an anthropomorphic phantom study // *Eur. Radiol.* 2013; 23: 139–147. DOI: 10.1007/s00330-012-2570-7.
8. Chae H.-D., Park C. M., Park S. J., Lee S. M., Kim K. G., Goo J. M. Computerized Texture Analysis of Persistent Part-Solid Ground-Glass Nodules: Differentiation of Preinvasive Lesions from Invasive Pulmonary Adenocarcinomas // *Radiology*. 2014; 273 (1): 285–293. DOI: 10.1148/radiol.14132187.
9. Song Y.S., Park C.M., Park S.J., Lee S.M., Jeon Y.K., Goo J.M. Volume and Mass Doubling Times of Persistent Pulmonary Subsolid Nodules Detected in Patients without Known Malignancy // *Radiology*. 2014; 273 (1): 276–284. DOI: 10.1148/radiol.14132324.
10. Higuchi K., Nagao M., Matsuo Y., Sunami S., Kamitani T., Jinnouchi M. et al. Detection of ground-glass opacities by use of hybrid iterative reconstruction (iDose) and low-dose 256-section computed tomography: a phantom study // *Radiol. Phys. Technol.* 2013; 6: 299–304. DOI: 10.1007/s12194-013-0200-y.
11. Ильин В.А., Позняк Э.Г. Аналитическая геометрия. М.: Физматлит, 2002: 240.
12. Кудрявцев А.Д. Курс математического анализа. М.: Дрофа, 2006: 570.

Поступила в редакцию 06.06.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Колмогоров Владимир Геннадьевич, канд. мед. наук, зав. отделом лучевой диагностики, Диагностический центр Алтайского края, г. Барнаул.

Коновалов Владимир Константинович, д-р мед. наук, профессор кафедры онкологии, лучевой терапии, лучевой диагностики, Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул.

Леонов Сергей Леонидович, д-р техн. наук, профессор кафедры технологии автоматизированных производств, Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул.

Лобанов Михаил Николаевич, канд. мед. наук, зав. отделом лучевой диагностики, Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования, г. Барнаул.

(✉) Колмогоров Владимир Геннадьевич, e-mail: vkolmogorov@dcak.ru

УДК 616.24-006-079.4-073.756.8

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-39-55

For citation: Kolmogorov V.G., Konovalov V.K., Leonov S.L., Lobanov M.N. The role of target 3d reconstructions when analysing qualitative characteristics of the surface of circular-shaped growth in the lungs. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 39-55

## The role of target 3D-reconstructions when analysing qualitative characteristics of the surface of circular-shaped growth in the lungs

Kolmogorov V.G.<sup>1</sup>, Konovalov V.K.<sup>2</sup>, Leonov S.L.<sup>3</sup>, Lobanov M.N.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Diagnostic Center of the Altai Territory  
75a, Komsomolsky Av., Barnaul, Russian Federation

<sup>2</sup> Altai State Medical University  
40, Lenina Av., Barnaul, Russian Federation

<sup>3</sup> Altai State Technical University named after I.I. Polzunov  
46, Lenina Av., Barnaul, Russian Federation

<sup>4</sup> Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis  
1/3, Lupidevskogo Str., Barnaul, Russian Federation

### ABSTRACT

**The purpose of this paper** is to improve the accuracy of X-ray diagnostics of circular-shaped growth (CSG) by developing computed tomographic semiotics of qualitative characteristics of its surface and the state of the surrounding bronchi using target 3D-reconstruction.

**Material and methods.** 560 patients at the age of 3–89 years were examined. Target 3D reconstruction was carried out with the use of 3D Fly Through program (Toshiba Medical Systems, Japan) which removed the tissue surrounding CSG at a distance of 5–10 mm from the outer boundaries.

CSG was inscribed into a cube. In case of the primary central and peripheral lung cancer a number of patients with severe rough surface of CSG prevailed over a number of patients with slightly rough surface was detected. In case of infiltrative tuberculosis, pneumonia, echinococcus, retention cysts the prevalence of a number of patients with slightly rough surface of CSG over a number of patients with rough surface was identified. In case of single cancer metastases, single and multiple tuberculomas the prevalence of a number of patients with non-uniform smooth surface of CSG over a number of patients with uniform smooth surface was identified. In case of multiple cancer metastasis, focal tuberculosis, cysticercosis the prevalence of a number of patients with a uniform smooth surface of CSG over a number of patients with uneven smooth surface was identified. In case of benign tumors, eosinophilic infiltrate, gamartohondroma, aspergilloma, chronic abscess, intrapulmonary hematoma there was not difference between the number of patients with a uniform smooth surface of CSG and a number of patients with uneven smooth surface. In case of primary lung cancer metastasis, single and multiple tuberculomas, echinococcus, cysticercosis there was a prevalence of the number of patients with expressed deformed bronchi surrounding CSL over a number of patients with moderately deformed bronchi. In case of infiltrative and focal tuberculosis there was prevalence of a number of patients with moderately deformed bronchi surrounding CSL over a number of patients with expressed deformed bronchi.

**Results.** In case of pneumonia, benign tumors, retention cysts, gamartohondroma, aspergilloma, chronic abscesses, and intrapulmonary hematomas there was no difference between the number of patients with expressed deformed bronchi surrounding CSL, and a number of patients with moderately deformed bronchi. Patients with single and multiple metastases, eosinophilic infiltration, bronchi surrounding CSL were not changed. It is necessary to develop a software that allows quantitatively characterize the surface of CSL and the degree of deformation of the surrounding bronchi.

**Key words:** circle-shaped growth in lungs, multispiral computed tomography, 3D-reconstruction, surface of circle-shaped growth in lungs.

## REFERENCES

1. Rozenshtau L.S. Psihofiziologicheskie faktory v rentgenodiagnostike [Physiological factors in Diagnostic Radiology] // *Vestnik rent-genologii i radiologii – Russian journal of radiology*. 1994; 4: 57–61. (in Russian).
2. Kononov V.K., Shojhet Ja.N., Lobanov M.N., Shevchuk Ju.A., Bobrov I.P., Kolmogorov V.G. Primenenie 3D rekonstrukcij pri topograficheskoj mul'tispiral'noj komp'juter-no-tomograficheskoj diagnostike sharovidnyh obrazovanij legkih [Application of 3D reconstructions for topographic multislice computed tomography diagnosis of lung spherical formations] // *Problemy klinicheskoj mediciny – Problems of clinical medicine*. 2011; 1–2: 52–59 (in Russian).
3. Solodkij V.A., Kotljarov P.M., Shherbahina E.V., Egorova E.V., Shaduri E.V. Rol' mul'tiplanarnyh rekonstrukcij pri postprocessingovoj obrabotke izobrazhenij v diagnostike ochagovyh obrazovanij legkih [The role of multiplanar reconstructions postprocessing imaging in the diagnosis of lung focal lesions] // *Medicinskaja vizualizacija – Medical imaging*. 2010; 2: 81–87 (in Russian).
4. Horuzhik S.A., Mihajlov A.N. Osnovy KT-vizualizacii. Chast' 2. Postprocessingovaja obrabotka izobrazhenij [Basics of CT imaging. Part 2. Postprocessing image treatment] // *Radiologija-praktika – Radiology-practice*. 2011; 4: 52–65 (in Russian).
5. User guide of Vitrea® 2 workstation, version 3.9, a software package of lung analysis VPMC-7854B (08/2006). Vital Images Inc. Company. 2006: 9–19.
6. Kim M., Lee J.M., Yoon J.H., Son H., Choi J.W., Han J.K., Choi B.I. Adaptive iterative dose reduction algorithm in CT: effect on image quality compared with filtered back projection in body phantoms of different sizes // *Korean J. Radiol.* 2014; 15(2): 195–204. DOI: 10.3348/kjr.2014.15.2.195.
7. Xie X., Zhao Y., Snijder R.A., van Ooijen P.M., de Jong P.A., Oudkerk M. de Bock G.H., Vliegthart R., Greuter M.J. Sensitivity and accuracy of volumetry of pulmonary nodules on low-dose 16- and 64-row multi-detector CT: an anthropomorphic phantom study // *Eur. Radiol.* 2013; 23(1): 139–147. DOI: 10.1007/s00330-012-2570-7.
8. Chae H.D., Park C. M., Park S. J., Lee S. M., Kim K. G., Goo J. M. Computerized Texture Analysis of Persistent Part-Solid Ground-Glass Nodules: Differentiation of Pre-invasive Lesions from Invasive Pulmonary Adenocarcinomas // *Radiology*. 2014; 273(1): 285–293. DOI: 10.1148/radiol.14132187.
9. Song Y.S., Park C.M., Park S.J., Lee S.M., Jeon Y.K., Goo J.M. Volume and Mass Doubling Times of Persistent Pulmonary Subsolid Nodules Detected in Patients without Known Malignancy // *Radiology*. 2014; 273 (1): 276–284. DOI: 10.1148/radiol.14132324.
10. Higuchi K., Nagao M., Matsuo Y., Sunami S., Kamitani T., Jinnouchi M., Yonezawa M., Yamasaki Y., Yabuuchi H., Hatkenaka M., Honda H. Detection of ground-glass opacities by use of hybrid iterative reconstruction (iDose) and low-dose 256-section computed tomography: a phantom study // *Radiol. Phys. Technol.* 2013; 6: 299–304. DOI: 10.1007/s12194-013-0200-y.
11. Il'in V.A., Poznjak Je.G. Analiticheskaja geometrija [Analytic geometry]. M.: Phizmatlit Publ., 2002: 240 (in Russian).
12. Kudrjavcev L.D. Kurs matematicheskogo analiza [Mathematical Analysis Course]. M.: Drofa Publ., 2006: 570 (in Russian).

Received June 06.2016

Accepted December 01.2016

**Kolmogorov Vladimir G.**, PhD, Head of the Department of Radiation Diagnosis, Diagnostic Center of the Altai Territory, Barnaul, Russian Federation.

**Kononov Vladimir K.**, MD, Professor of the Department of Oncology, Radiation Therapy, Radiation Diagnosis with the Course of Additional Post-graduate Education, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

**Leonov Sergey L.**, DTSc, Professor of the Department of Automated Production Technology, Altai State Technical University named after I.I. Polzunov, Barnaul, Russian Federation.

**Lobanov Mikhail N.**, PhD, Head of the Department of Radiation Diagnosis of the Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis, Barnaul, Russian Federation.

(✉) **Kolmogorov Vladimir G.**, e-mail: vkolmogorov@dcak.ru

УДК 616.831-092.18:616.894-053.8-092.9

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-56-65

Для цитирования: Комлева Ю.К., Горина Я.В., Черных А.И., Лопатина О.Л., Шабалова А.А., Труфанова Л.В., Оловянникова Р.Я., Ендржеевская-Шурыгина В.Ю., Салмина А.Б. Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 56–65

## Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера

Комлева Ю.К.<sup>1</sup>, Горина Я.В.<sup>1</sup>, Черных А.И.<sup>2</sup>, Лопатина О.Л.<sup>1</sup>,  
Шабалова А.А.<sup>1</sup>, Труфанова Л.В.<sup>1</sup>, Оловянникова Р.Я.<sup>1</sup>,  
Ендржеевская-Шурыгина В.Ю.<sup>1</sup>, Салмина А.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Красноярский государственный медицинский университет (КГМУ) имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

<sup>2</sup> Красноярская межрайонная клиническая больница (КМКБ) № 20 им. И.С. Берзона Россия, 660123, г. Красноярск, Инструментальная ул., 12а

### РЕЗЮМЕ

Болезнь Альцгеймера является многофакторным нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся наличием бета-амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Бета-амилоид является важным фактором риска и играет центральную роль в возникновении и прогрессировании болезни Альцгеймера. Однако вопрос о влиянии бета-амилоида на гиппокампальный нейрогенез во взрослом мозге остается открытым.

**Цель исследования** – изучение влияния процесса обучения на нейрогенез, пролиферацию, выживаемость и миграцию клеток в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на самцах зрелых крыс линии Wistar в возрасте 7 мес. Опытная группа – животные с экспериментальной болезнью Альцгеймера после введения бета-амилоида 1-42 в СА1 зону гиппокампа билатерально по 5 мкл. Контрольная группа – ложно-оперированные животные, которым вводили растворитель для бета-амилоида – фосфатно-солевого буфера – в СА1 зону билатерально по 5 мкл. Для оценки рабочей памяти, а также консолидации памяти использовали нейроповеденческое тестирование в водном лабиринте Морриса. Изучение миграции клеток осуществляли путем введения бромдезоксисуридина (50 мг/кг). Экспрессию молекул-маркеров нейрогенеза (Ki-67, PSA-NCAM, PCNA) в гиппокампе исследовали методом иммуногистохимии с последующей конфокальной микроскопией.

**Результаты.** Показано, что моделирование болезни Альцгеймера приводит к нарушениям когнитивных функций и запоминания у животных. В группе с экспериментальной болезнью Альцгеймера выявлено снижение уровня пролиферации клеток ( $p = 0,043$ ), нарушение миграции ( $p = 0,031$ ), но не выживаемости клеток ( $p = 0,985$ ) по сравнению с контрольной группой. Обучение в водном лабиринте Морриса животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера способствует миграции клеток-предшественников по ростральному миграционному пути ( $p = 0,011$ ). Количество нейробластов ( $p = 0,809$ ) и проли-

ферация клеток-предшественников нейронов ( $p = 0,083$ ) значимо не меняется по сравнению с группой без обучения.

**Заключение.** При моделировании болезни Альцгеймера у животных наблюдается когнитивная дисфункция, снижение уровня пролиферации и миграции клеток, что свидетельствует о нарушении нейрогенеза за счет токсического действия амилоида. Обсуждается связь полученных результатов с механизмами развития локальной инсулинорезистентности.

**Ключевые слова:** PCNA, Ki-67, BrdU, миграция клеток, болезнь Альцгеймера, инсулинорезистентность.

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой необратимое нейродегенеративное заболевание, вызывающее нарушение когнитивных функций, которое определяется сочетанием расстройств памяти с нарушением интеллектуальной деятельности у людей старше 65 лет [1]. Прогрессирование болезни Альцгеймера связано с тремя ключевыми нейрпатологическими особенностями: образование бета-амилоидных бляшек в связи с мутациями генов пресенилин-1 и пресенилин-2 [2]; накопление внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и синаптическая дисфункция [3]. Эти события происходят главным образом в неокортексе, гиппокампе и других подкорковых областях, которые являются ответственными за реализацию когнитивной функции [4]. Между тем бета-амилоид является важным фактором риска и играет центральную роль в возникновении и прогрессировании болезни Альцгеймера, а также развитии локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга, характерной для нейродегенерации альцгеймеровского типа [5–7]. Однако до настоящего времени остается открытым вопрос о том, как бета-амилоид влияет на гиппокампальный нейрогенез во взрослом мозге.

Цель исследования: изучение влияния процесса обучения на нейрогенез, пролиферацию, выживаемость и миграцию клеток в норме и при экспериментальной болезни Альцгеймера.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментального исследования использовали самцов зрелых крыс линии Wistar в возрасте 7 мес. Животные содержались в виварии при стандартных условиях (температура  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  и световой цикл – 12 ч день и 12 ч ночь) в клетках со свободным доступом к пище и воде.

Для проведения исследования сформированы четыре группы. Контрольная группа 1: ложно-оперированные (ЛО) животные ( $n = 5$ ) с тре-

нировкой в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Контрольная группа 2: ЛО животные ( $n = 5$ ) без тренировки в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Группа 3: животные с экспериментальной БА ( $n = 5$ ) с тренировкой в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Группа 4: животные с экспериментальной БА ( $n = 5$ ) без тренировки в течение 5 дней в лабиринте Морриса. Животным контрольных групп вводили фосфатно-солевой буфер. Животным групп 3, 4 вводили бета-амилоид.

Для подавления ноцицепции использовали ксилазин, анестезию проводили интраперитонеальным введением хлоралгидрата. Хирургический уровень анестезии сохранялся от 45 мин до 1 ч. После проверки болевой чувствительности, оценки частоты дыхания, сердечных сокращений и уверенности в безболезненности, отсутствии страдания животного крысу фиксировали в стереотаксической рамке. Моделирование болезни Альцгеймера, проведение ложных операций, а также оценку признаков данной патологии осуществляли согласно методике, представленной нами ранее [8]. Использовали нейроповеденческое тестирование в водном лабиринте Морриса для оценки оперативной и долговременной памяти в соответствии со стандартными протоколами [9].

Перед проведением диагностического оценочного теста выполнялась тренировка исследуемых животных в течение 4 последовательных дней. При исследовании параметров в течение 1 дня оценивали рабочую память, при изучении параметров на следующий день – консолидацию памяти.

Для идентификации мигрирующих нейробластов крысам был введен бромдезоксидеоксигидратин (Bromodeoxyuridin, BrdU) (Sigma-Aldrich, США) в дозе 50 мг/кг дважды в день в течение 3 последовательных дней, начиная с 7-го дня после введения бета-амилоида или PBS в соответствии со стандартным протоколом [10]. После окончания введения BrdU часть животных (ЛО животные и

животные с экспериментальной моделью БА) обучали в водном лабиринте Морриса в течение 4 дней. На 5-й день после инъекций BrdU (14-й день после моделирования) через 30 мин после тестирования в водном лабиринте Морриса осуществляли транскардиальную перфузию согласно ранее представленной методике [8].

Экспрессию маркеров нейрогенеза, а именно Ki-67 (маркер пролиферирующих клеток в G1-, S-, G2-фазах), PSA-NCAM (маркер нейробластов), PCNA (маркер пролиферирующих клеток в фазе S) оценивали методом иммуногистохимии для свободно плавающих срезов, который проводили согласно методике [8]. Изображения срезов головного мозга получали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i, затем подсчитывали количество клеток, которые экспрессируют маркеры нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа, латеральных стенках боковых желудочков (субвентрикулярная зона), ростральном миграционном пути и олифакторных луковицах. При этом оценивали пять полей зрения для субвентрикулярной зоны, рострального миграционного пути и олифакторных луковиц, для гиппокампа – семь полей зрения.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна – Уитни. Различия принимали значимыми при  $p \leq 0,05$ ,  $p$  – уровень значимости. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения консолидации памяти и влияния тренировок животных в водном лабиринте Морриса были использованы два протокола. Первый протокол – животные обучались в водном лабиринте Морриса в течение 4 дней с оценкой на 5-й день. Второй протокол – животные не подвергались обучению в водном лабиринте Морриса. Оценивали число входов в квадрат со скрытой платформой, время нахождения в данном квадрате.

В результате изучения поведения по двум разным протоколам, согласно которым различия состояли в особенностях тренировок животных, можно заключить, что при моделировании БА наблюдаются нарушения когнитивных функций и запоминания у животных, а именно значительно подавляются возможности оперативной памяти. При обучении животных в водном лабиринте

Морриса отмечается улучшение процесса консолидации памяти в группе ложно-оперированных животных и при экспериментальной болезни Альцгеймера, тогда как оперативная память значительно не меняется (рис. 1).

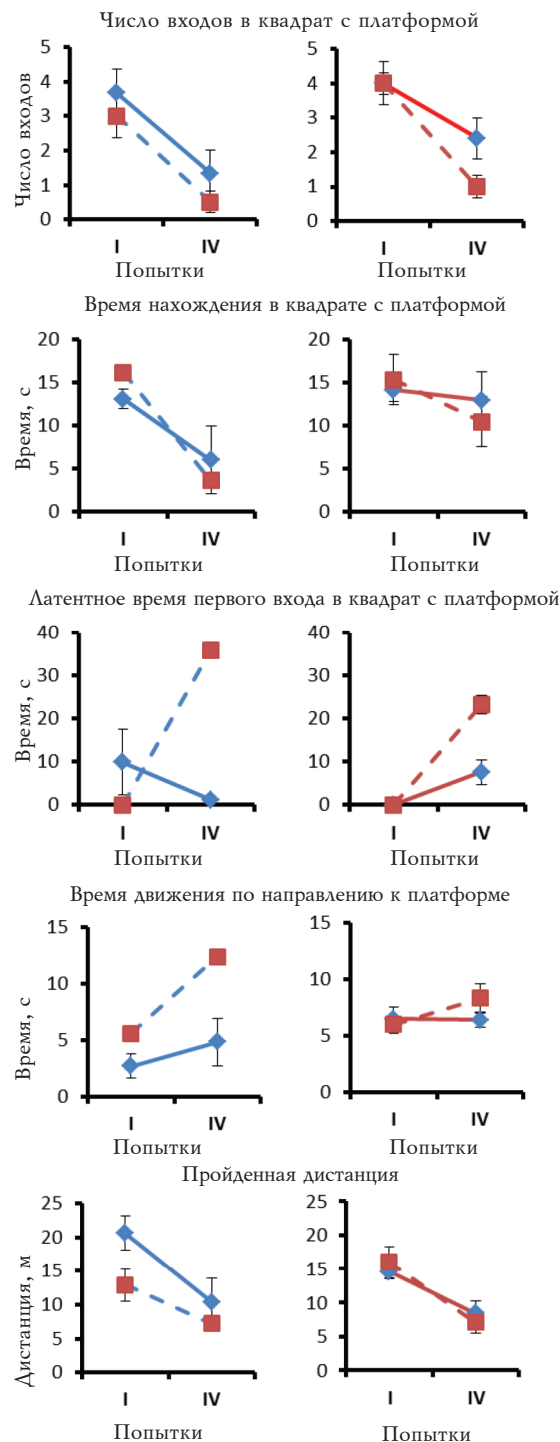


Рис. 1. Результаты нейropsychического тестирования в водном лабиринте Морриса на 5-й день тестирования: синий цвет – ложно-оперированные животные (сплошной – с тренировками, пунктиром – животные без тренировок); красный цвет – животные с нейродегенерацией (сплошной – с тренировками, пунктиром – животные без тренировок)

Для идентификации мигрирующих нейробластов крысам был введен BrdU, поэтому миграцию по ростральному пути из субвентрикулярной зоны в ольфакторные луковицы изучали по количеству клеток BrdU+/PSA-NCAM+ (рис. 2).

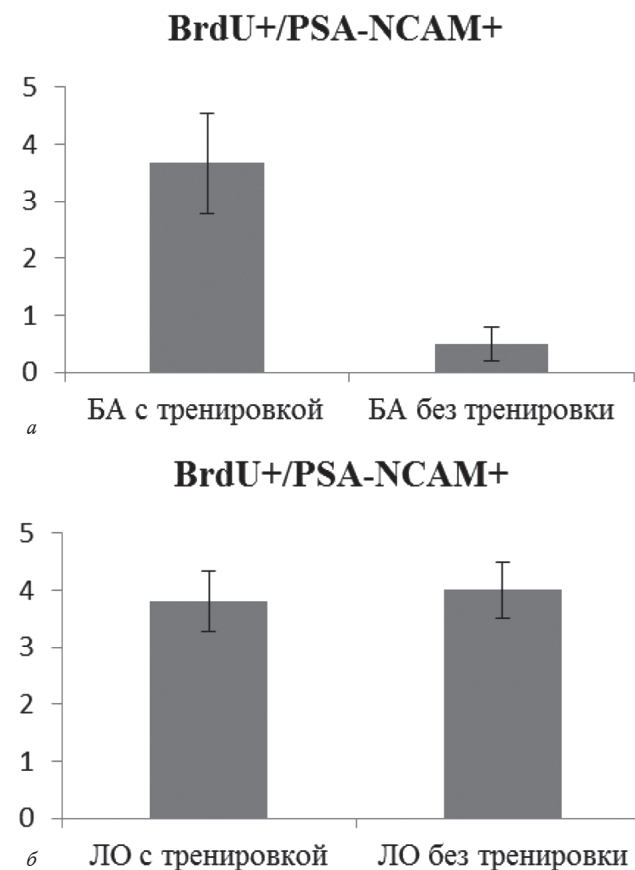


Рис. 2. Экспрессия BrdU+/PSA-NCAM+ клеток в ростральном миграционном пути: а – при нейродегенерации ( $p = 0,011$ ), б – при проведении ложной операции ( $p = 0,809$ )

Выявлено, что у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера количество клеток BrdU+/PSA-NCAM+ статистически значимо снижалось  $0,50 \pm 0,29$  по сравнению с ложно-оперированными животными:  $4,00 \pm 0,49$  ( $p = 0,031$ ). Таким образом, нарушение миграции нейробластов по ростральному миграционному пути может быть вызвано токсическим действием бета-амилоида [11]. Мы определяли экспрессию клеток BrdU+/NeuN+ в зубчатой извилине гиппокампа для изучения выживаемости зрелых гранулярных нейронов. При моделировании нейродегенерации и при проведении ложной операции не выявлено статистически значимых различий ( $p = 0,985$ ) в субгранулярном слое зубчатой извилины BrdU+/NeuN+ клеток ( $1,40 \pm 0,46$  и  $1,44 \pm 0,38$  соответственно). Это свидетельствует о том, что бета-амилоид не оказывает значимого влияния на

выживаемость зрелых нейронов. В результате исследования пролиферирующих клеток в G1-, S-, G2-фазах (в интерфазе) отмечено снижение экспрессии маркера Ki67 в субгранулярной зоне зубчатой извилины при моделировании нейродегенерации  $4,24 \pm 0,25$  по сравнению с проведением ложной операции  $7,42 \pm 1,30$  ( $p = 0,043$ ) (рис. 3). При изучении пролиферирующих клеток в фазе S было выявлено статистически значимое снижение клеток PCNA+ в субгранулярной зоне при нейродегенерации  $2,50 \pm 0,99$  по сравнению с ложно-оперированными животными  $6,4 \pm 0,6$  ( $p = 0,021$ ). Таким образом, происходит снижение уровня пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа при моделировании нейродегенерации (рис. 4).

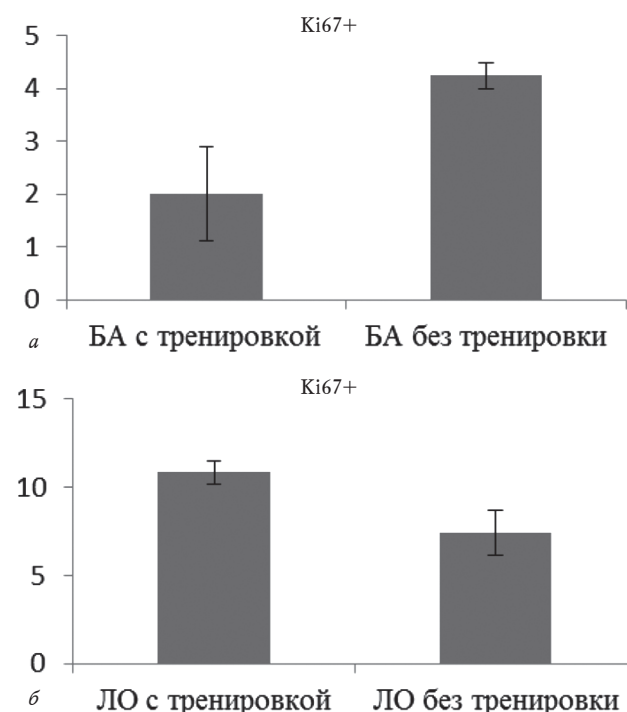


Рис. 3. Экспрессия Ki67+ клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа: а – при нейродегенерации ( $p = 0,083$ ), б – при проведении ложной операции ( $p = 0,038$ )

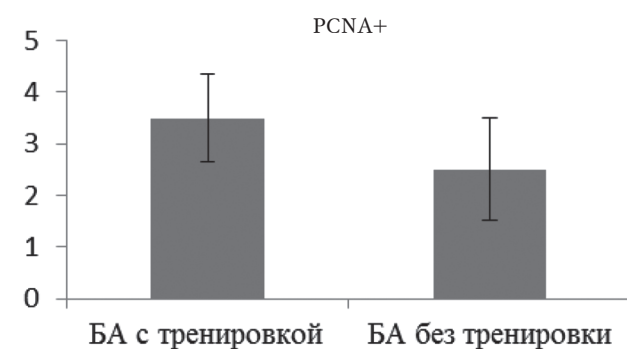


Рис. 4. Экспрессия PCNA+ клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа при нейродегенерации ( $p = 0,461$ )

При изучении мигрирующих нейробластов при нейродегенерации у крыс с тренировкой памяти выявили значимое увеличение количества BrdU+/PSA-NCAM+ клеток  $3,67 \pm 0,88$  по сравнению с нетренированными крысами  $0,50 \pm 0,29$  ( $p = 0,011$ ) (см. рис. 2, а). На ложно-оперированных животных стимуляция когнитивных функций такого влияния не оказывает. В контрольной группе после тренировок количество мигрирующих нейробластов составило  $3,80 \pm 0,52$ , что практически не отличается от группы без обучения  $4,00 \pm 0,49$  ( $p = 0,809$ ) (см. рис. 2, б). Таким образом, когнитивная стимуляция у животных с нейродегенерацией способствует восстановлению миграции клеток-предшественников по ростральному пути.

При изучении выживаемости зрелых гранулярных нейронов не выявлено статистически значимых различий в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа BrdU+/NeuN+ клеток при проведении ложной операции с обучением  $0,75 \pm 0,37$  и без него  $1,40 \pm 0,46$  ( $p = 0,311$ ) и при моделировании нейродегенерации с обучением и без него ( $1,67 \pm 0,21$  и  $1,44 \pm 0,38$ , соответственно) ( $p = 0,662$ ). Это свидетельствует о том, что на выживаемость зрелых нейронов как при моделировании нейродегенерации, так и в контрольной группе тренировки в водном лабиринте Морриса значимого влияния не оказывают.

Также не оказывает значимого влияния и обучение в водном лабиринте Морриса на экспрессию маркера Ki67 в субгранулярной зоне зубчатой извилины при моделировании нейродегенерации  $2,00 \pm 0,89$  по сравнению с группой без обучения  $4,24 \pm 0,25$  ( $p = 0,083$ ) (см. рис. 3, а). При проведении ложной операции тренировки в водном лабиринте Морриса вызывают увеличение экспрессии Ki67 у тренированных животных  $10,83 \pm 0,65$  по сравнению с животными без обучения  $7,42 \pm 1,30$  ( $p = 0,042$ ) (см. рис. 3, б).

При изучении экспрессии маркера PCNA в зависимости от обучения не выявлено статистически значимого изменения клеток PCNA+ в субгранулярной зоне при нейродегенерации после обучения  $3,50 \pm 0,85$  по сравнению с животными без тренировок  $2,50 \pm 0,99$  ( $p = 0,461$ ) (рис. 4).

Таким образом, не происходит изменения уровня пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа при моделировании нейродегенерации со стимуляцией когнитивной функции и без нее. Вместе с тем на здоровый мозг обучение оказывает положительное влияние, проявляющееся увеличением экспрессии маркеров активно пролиферирующих клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания представляют собой хронический и медленно прогрессирующий процесс. Характерными признаками нейродегенерации являются нарушения нейрогенеза, синаптогенеза; интенсификация апоптоза; дисрегуляция ангиогенеза. Дополнительным признаком нейродегенерации альцгеймеровского типа считают локальную инсулинорезистентность, развивающуюся в ткани головного мозга. Нарушение нейрогенеза при нейродегенерации затрагивает все этапы этого процесса (от поддержания пула стволовых и прогениторных клеток до механизмов миграции и дифференцировки), что находит свое отражение в нарушении когнитивных функций и механизмов памяти [13].

Установлено, что нейротоксическое действие интрагиппокампаально введенного бета-амилоида вызывает нарушение запоминания у животных за счет подавления рабочей памяти. Вместе с тем обучение животных в водном лабиринте Морриса способствует улучшению процесса консолидации памяти в группе ложно-оперированных животных и при экспериментальной болезни Альцгеймера, тогда как рабочая память значимо не меняется. Это сопровождается снижением количества пролиферирующих клеток в гиппокампе и числа мигрирующих BrdU+/PSA-NCAM+ клеток по ростральному пути из субвентрикулярной зоны в ольфакторные луковицы у животных с моделью болезни Альцгеймера. Однако статистически значимых различий в экспрессии BrdU+/NeuN+ клеток в субгранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа не обнаружено, что указывает на отсутствие существенного влияния бета-амилоида на выживаемость зрелых нейронов. Результаты исследования мигрирующих нейробластов при нейродегенерации у крыс с тренировкой памяти выявили значимое увеличение количества BrdU+/PSA-NCAM+ клеток по сравнению с нетренированными крысами. На ложно-оперированных животных стимуляция когнитивных функций такого влияния не оказывает. Это свидетельствует о том, что когнитивная стимуляция у животных с нейродегенерацией способствует восстановлению миграции клеток-предшественников по ростральному пути. Вместе с тем тренировки в водном лабиринте Морриса не оказывают значимого влияния на экспрессию BrdU+/NeuN+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа как при моделировании нейродегенерации, так и в контрольной группе. Интересно, что в отличие от группы ложно-оперированных животных экспрессия Ki67 в гиппокампе под дей-

ствием обучения в группе с экспериментальной болезнью Альцгеймера не меняется, но увеличивается количество нейробластов. В совокупности это позволяет сделать вывод о том, что при нейродегенерации обучение стимулирует преимущественно ранние этапы нейрогенеза.

Результаты исследований нейрогенеза в тканях головного мозга свидетельствуют о том, что с возрастом и при болезни Альцгеймера имеет место значительное снижение эффективности пролиферации прогениторных клеток и их количества [14]. Большинство исследований, в которых рассматривается нейрогенез в гиппокампе или субвентрикулярной зоне у трансгенных мышей, экспрессирующих одну или две мутации в гене, кодирующем APP (белок-предшественник амилоида), показывают нарушение пролиферации клеток-предшественников и (или) нарушение нейрональной дифференцировки [15, 16]. Кроме того установлено, что инъекция в дозе 5 мкл с концентрацией 1 мМ A $\beta$ 1-42 или A $\beta$ 25-35 в боковой желудочек уменьшает пролиферацию клеток в субвентрикулярной зоне в течение следующих 5 дней [17]. Экспериментально показано, что увеличение пролиферации клеток характерно для начальных этапов нейродегенерации, но затем нейрогенез подавляется [18].

Одним из важных факторов подавления нейрогенеза является локальная инсулинорезистентность [19]. Ранее было показано [20] снижение экспрессии инсулинзависимого глюкозного транспортера (GLUT4) на фоне увеличения экспрессии инсулинрегулируемой аминопептидазы IRAP в гиппокампе животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера (модель с интрагиппокампальным введением бета-амилоида, аналогичная представленной в данном исследовании). Известно, что инсулиноподобный фактор роста, играющий важную роль в развитии болезни Альцгеймера [21], стимулирует пролиферацию нейронных клеток-предшественников, способствуя интенсификации нейрогенеза в гиппокампе, регулирует синаптическую пластичность, повышает выживаемость нейронов, а также ингибирует их гибель [22]. Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные о нарушении процессов нейрогенеза и миграции клеток дополняют представления о негативном влиянии нарушения инсулиновой сигнальной трансдукции в гиппокампе при экспериментальной болезни Альцгеймера.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обучение оказывает положительное влияние на здоровый мозг, что проявляется интенсификацией нейрогенеза и миграции клеток, тог-

да как при экспериментальной болезни Альцгеймера такой эффект отсутствует или носит неполноценный характер. Поскольку процесс обучения у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера восстанавливает количество нейробластов и миграционную способность клеток-предшественников, логично предположить, что эффект стимуляции процессом обучения механизмов консолидации памяти у животных с болезнью Альцгеймера, но не резистентных к действию тренировки процессов оперативной (рабочей) памяти, зависит от состояния «резервного» пула нейрональных предшественников, а именно нейробластов, способных быстро активироваться в ответ на развитие патологического процесса, реализуя компенсаторный механизм.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Эксперименты проводили после рассмотрения заявки и протокола на использования лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» (выписка из протокола № 20 от 7 октября 2015 г.).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит студентку 4-го курса педиатрического факультета КГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого В.В. Волкову за техническое сопровождение эксперимента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Khorrami A., Ghanbarzadeh S., Mahmoudi J., Nayebi A.M., Maleki-Dizaji N., Garjani A. Investigation of the memory impairment in rats fed with oxidized-cholesterol-rich diet employing passive avoidance test // *Drug Res (Stuttg)*.

- 2015; 65 (5): 231–237. doi: 10.1055/s-0034-1370950. Epub. 2014. Mar. 25.
2. Cai Y., An S.S., Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders // *Clin Interv Aging*. 2014. 10 (6): 1163–1172. doi: 10.2147/CIA.S85808. eCollection 2015.
3. Guerrero-Mucoz M.J., Gerson J., Castillo-Carranza D.L. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease // *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 464. doi: 10.3389/fncel.2015.00464. eCollection 2015.
4. Li Y., Wang X., Li Y., Sun Y., Sheng C., Li H., Li X., Yu Y., Chen G., Hu X., Jing B., Wang D., Li K., Jessen F., Xia M., Han Y. Abnormal Resting-State Functional Connectivity Strength in Mild Cognitive Impairment and Its Conversion to Alzheimer's Disease // *Neural Plast*. 2016: 4680972. doi: 10.1155/2016/4680972. Epub. 2015. Dec. 30.
5. Rudolph S., Klein A.N., Tusche M., Schlosser C., Elfgen A., Brenner O., Teunissen C., Gremer L., Funke S.A., Kutsche J., Willbold D. Competitive Mirror Image Phage Display Derived Peptide Modulates Amyloid Beta Aggregation and Toxicity // *PLoS One*. 2016; 11 (2): e0147470. doi: 10.1371/journal.pone.0147470. eCollection 2016.
6. Esparza T.J., Zhao H., Cirrito J.R., Cairns N.J., Bateman R.J., Holtzman D.M., Brody D.L. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls // *Ann Neurol*. 2013; 73 (1): 104–119. doi: 10.1002/ana.23748. Epub. 2012. Dec. 7.
7. Горина Я.В., Салмина А.Б., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Федюкович Л.В., Успенская Ю.А., Морозова Г.А., Демко И.В., Петрова М.М. Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера // *Сибирское медицинское обозрение*. 2014; 4: 11–19.
8. Комлева Ю.А., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.А., Волкова В.В., Салмина А.Б. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в олифакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Сибирское медицинское обозрение*. 2015; 5: 45–49.
9. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nat Protoc*. 2006; 1 (2): 848–858. doi:10.1038/nprot.2006.116.
10. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease // *Neuroscience*. 2007; 147 (1): 28–36. Epub. 2007. May. 17.
11. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods Cell Biol*. 2008; 85: 243–272.
12. Tarczyluk M.A., Nagel D.A., Rhein Parri H., Tse E.H., Brown J.E., Coleman M.D., Hill E.J. Amyloid  $\beta$  1–42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab*. 2015; 35 (8): 1348–1357. doi: 10.1038/jcbfm.2015.58. Epub. 2015. Apr. 8.
13. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // *Neuron*. 2011; 70 (4): 687–702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
14. Brinton R.D., Wang J.M. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent // *Curr. Alzheimer Res*. 2006; 3 (3): 185–190.
15. Donovan M.H., Yazdani U., Norris R.D., Games D., German D.C., Eisch A.J. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease // *J. Comp. Neurol*. 2006; 495 (1): 70–83.
16. Lazarov O., Marr R.A. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads // *Exp. Neurol*. 2010; Jun. 223 (2): 267–281. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.009. Epub. 2009. Aug. 19.
17. Haughey N.J., Liu D., Nath A., Borchard A.C., Mattson M.P. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Neuromolecular Med*. 2002; 1 (2): 125–135.
18. Mirochnic S., Wolf S., Staufenbiel M., Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease // *Hippocampus*. 2009; Oct. 19 (10): 1008–1018. doi: 10.1002/hipo.20560.
19. Ziegler A.N., Levison S.W., Wood T.L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis // *Nat. Rev. Endocrinol*. 2015; Mar. 11 (3): 161–170. doi: 10.1038/nrendo.2014.208. Epub. 2014. Dec. 2.
20. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.А., Волкова В.В., Герцог Г.Е., Попова Н.Н., Салмина А.Б. Особенности экспрессии молекул-маркеров инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Проблемы эндокринологии*. 2015; 4: 43–48.
21. Gontier G., George C., Chaker Z., Holzenberger M., And S. Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid- $\beta$  Clearance // *J. Neurosci*. 2015; Aug 19. 35 (33): 11500–11513. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0343-15.2015.
22. Madathil S.K., Saatman K.E. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome // Source Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects / Kobeissy FH, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2015. Chapter 7.

Поступила в редакцию 06.10.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Комлева Юлия Константиновна, канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Горина Яна Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Черных Анатолий Игоревич, врач-хирург, КМКБ № 20 им. И.С. Берзона, г. Красноярск.

Лопатина Ольга Леонидовна, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Шабалова Анна Андреевна, ассистент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Труфанова Людмила Васильевна, канд. биол. наук, доцент, декан фармацевтического факультета, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Оловянникова Раиса Яковлевна, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Ендржеевская-Шурыгина Виктория Юлиановна, канд. хим. наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana\_20@bk.ru.

УДК 616.831-092.18:616.894-053.8-092.9

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-56-65

For citation: Komleva Yu.K., Gorina Ya.V., Chernykh A.I., Lopatina O.L., Shabalova A.A., Trufanova L.V., Olovyannikova R.Ya., Endrzhhevskaya-Shurygina V.Yu., Salmina A.B. Characteristics of brain cell proliferation and migration in animals with experimental Alzheimer's disease undergoing cognitive training. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 56–65

## Characteristics of brain cell proliferation and migration in animals with experimental Alzheimer's disease undergoing cognitive training

Komleva Yu.K.<sup>1</sup>, Gorina Ya.V.<sup>1</sup>, Chernykh A.I.<sup>2</sup>, Lopatina O.L.<sup>1</sup>, Shabalova A.A.<sup>1</sup>,  
Trufanova L.V.<sup>1</sup>, Olovyannikova R.Ya.<sup>1</sup>, Endrzhhevskaya-Shurygina V. Yu.<sup>1</sup>, Salmina A.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky  
1, Partizana Geleznuyka Str., 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Krasnoyarsk Inter-regional Clinical Hospital № 20 named after I.S. Berzona  
12a, Instrumentalnaya Str., 660123, Krasnoyarsk, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aims.** Alzheimer's disease is a multifactorial neurodegenerative disease characterized by the presence of amyloid beta peptide containing plaques, and neurofibrillary tangles. Beta-amyloid is a major risk factor and it plays a central role in the onset and progression of Alzheimer's disease. However, question of the influence of beta-amyloid on neurogenesis in the hippocampus in the adult brain is still open. The purpose of this paper is to study cognitive functions and their association with proliferation, survival and migration of newly-formed cells in normal adult rat brain and in the experimental Alzheimer's disease.

**Materials and methods.** Rats (Wistar, males, 7 months) were used. Experimental group (Alzheimer's disease model with the intrahippocampal administration of beta-amyloid 1-42 (5 µl) bilaterally in the CA1 area) and a control group (sham-operated animals with the intrahippocampal administration of Phosphate buffered saline (5 µl) bilaterally in the CA1) have been tested. The study was conducted from February to July. Neurobehavioral test (Morris water maze) was used to assess working memory and memory consolidation. The study of cell migration was performed by introducing bromodeoxyuridine (50 mg/kg). Expression of neurogenesis markers in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus was studied has been studied with indirect immunohistochemistry for free-floating sections followed by the confocal microscopy.

**Results.** Modelling of Alzheimer's disease leads to impaired cognitive function and memory in animals. We found that these events were associated with the suppression of proliferative ( $p = 0,043$ ) and migratory activity of brain cells ( $p = 0,031$ ), but not survival of cells ( $p = 0,985$ ) compared to the control group. Training in Morris water maze of animals with experimental Alzheimer's disease promotes migration of progenitor cells along the rostral migration way ( $p = 0,011$ ) compared with the group without training. However, the number of neuroblasts ( $p = 0,809$ ) and proliferation of neuronal progenitor cells ( $p = 0,083$ ) were not significantly affected compared with the group without training.

**Conclusions.** Decreased level of brain cells proliferation, alterations in their migration and development of cognitive dysfunction have been found in the rat model of Alzheimer's disease, thus suggesting impairment of neurogenesis induced by amyloid. Possible involvement of local insulin resistance into the development of neurogenesis alterations is discussed.

**Key words:** PCNA, Ki-67, BrdU, cell migration, Alzheimer's disease, insulin resistance.

## REFERENCES

1. Khorrami A., Ghanbarzadeh S., Mahmoudi J., Nayebi A.M., Maleki-Dizaji N., Garjani A. Investigation of the memory impairment in rats fed with oxidized-cholesterol-rich diet employing passive avoidance test // *Drug Res (Stuttg)*. 2015; 65 (5): 231–237. doi: 10.1055/s-0034-1370950. Epub. 2014. Mar. 25.
2. Cai Y., An S.S., Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders // *Clin Interv Aging*. 2014. 10 (6): 1163–1172. doi: 10.2147/CIA.S85808. eCollection 2015.
3. Guerrero-Mucoz M.J., Gerson J., Castillo-Carranza D.L. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease // *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 464. doi: 10.3389/fncel.2015.00464. eCollection 2015.
4. Li Y., Wang X., Li Y., Sun Y., Sheng C., Li H., Li X., Yu Y., Chen G., Hu X., Jing B., Wang D., Li K., Jessen F., Xia M., Han Y. Abnormal Resting-State Functional Connectivity Strength in Mild Cognitive Impairment and Its Conversion to Alzheimer's Disease // *Neural Plast*. 2016: 4680972. doi: 10.1155/2016/4680972. Epub. 2015. Dec. 30.
5. Rudolph S., Klein A.N., Tusche M., Schlosser C., Elfgen A., Brener O., Teunissen C., Gremer L., Funke S.A., Kutzsche J., Willbold D. Competitive Mirror Image Phage Display Derived Peptide Modulates Amyloid Beta Aggregation and Toxicity // *PLoS One*. 2016; 11 (2): e0147470. doi: 10.1371/journal.pone.0147470. eCollection 2016.
6. Esparza T.J., Zhao H., Cirrito J.R., Cairns N.J., Bateman R.J., Holtzman D.M., Brody D.L. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls // *Ann Neurol*. 2013; 73 (1): 104–119. doi: 10.1002/ana.23748. Epub. 2012. Dec. 7.
7. Gorina Ja.V., Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Komleva Ju.K., Fedjukovich L.V., Uspenskaja Ju.A., Morozova G.A., Demko I.V., Petrova M.M. Nejrovospalenie i insulinorezistentnost' pri bolezni Al'cgejmera [Neuroinflammation and insulin resistance in Alzheimer's disease] // *Sibirskoe medicinskoe obozrenie – Siberian Medical Review*. 2014; 4: 11–19 (in Russian).
8. Komleva Ju.K., Malinovskaia N.A., Gorina Ja.V., Lopatina O.L., Volkova V. V., Salmina A.B. Ehkspressiya molekul CD38 i CD157 v ol'faktornyh lukovicah golovnogogo mozga pri ehksperimental'noj bolezni Al'cgejmera [Expression of CD38 and CD157 molecules in the olfactory bulb of the brain in experimental Alzheimer's disease] // *Sibirskoe medicinskoe obozrenie – Siberian Medical Review*. 2015; 5: 45–49 (in Russian).
9. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory // *Nat Protoc*. 2006; 1 (2): 848–858. doi:10.1038/nprot.2006.116.
10. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease // *Neuroscience*. 2007; 147 (1): 28–36. Epub. 2007. May. 17.
11. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods Cell Biol*. 2008; 85: 243–272.
12. Tarczylyuk M.A., Nagel D.A., Rhein Parri H., Tse E.H., Brown J.E., Coleman M.D., Hill E.J. Amyloid  $\beta$  1–42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab*. 2015; 35 (8): 1348–1357. doi: 10.1038/jcbfm.2015.58. Epub. 2015. Apr. 8.
13. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // *Neuron*. 2011; 70 (4): 687–702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
14. Brinton R.D., Wang J.M. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent // *Curr. Alzheimer Res*. 2006; 3 (3): 185–190.
15. Donovan M.H., Yazdani U., Norris R.D., Games D., German D.C., Eisch A.J. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease // *J. Comp. Neurol*. 2006; 495 (1): 70–83.

16. Lazarov O., Marr R.A. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads // *Exp. Neurol.* 2010; Jun. 223 (2): 267–281. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.009. Epub. 2009. Aug. 19.
17. Haughey N.J., Liu D., Nath A., Borchard A.C., Mattson M.P. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Neuromolecular Med.* 2002; 1 (2): 125–135.
18. Mirochnic S., Wolf S., Staufenbiel M., Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease // *Hippocampus.* 2009; Oct. 19 (10): 1008–1018. doi: 10.1002/hipo.20560.
19. Ziegler A.N., Levison S.W., Wood T.L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015; Mar. 11 (3): 161–170. doi: 10.1038/nrendo.2014.208. Epub. 2014. Dec 2.
20. Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Volkova V.V., Gertsog G.E., Popova N.N., Salmina A.B. Osobennosti ekspressii molekul-markerov insulinorezistentnosti pri eksperimentalnoy bolezni Altsgeymera [Features of molecule expression markers of insulin resistance in experimental Alzheimer's disease] // *Problemy endokrinologii – Endocrinology problem.* 2015; 4: 43–48 (in Russian).
21. Gontier G., George C., Chaker Z., Holzenberger M., And S. Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid- $\beta$  Clearance // *J. Neurosci.* 2015; Aug 19. 35 (33): 11500–11513. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0343-15.2015.
22. Madathil S.K., Saatman K.E. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome // *Source Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* / Kobeissy FH, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2015. Chapter 7.

Received October 06.2016

Accepted December 01.2016

**Komleva Yuliya K.**, PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Gorina Yana V.**, PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Chernykh Anatolii I.**, Surgeon, Krasnoyarsk Inter-regional Clinical Hospital № 20, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Lopatina Ol'ga L.**, PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Shabalova Anna A.**, Assistant of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Trufanova Lyudmila V.**, PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Olovyannikova Raisa Ya.**, PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Endrzhhevskaya-Shurygina Viktoriya Yu.**, PhD, Assistant Professor of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Salmina Alla B.**, DM, Professor, Head of Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Gorina Yana V.**, e-mail: yana\_20@bk.ru

УДК 616.858-092:616.214.8-008.1

DOI DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-66–74

Для цитирования: Кострюкова Е.С., Алифирова В.М., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Ижболдина О.П., Петров В.А., Миронова Ю.С., Латыпова А.В., Никитина М.А., Титова М.А., Тяхт А.В., Дорофеева Ю.Б., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э. Обонятельная дисфункция и изменение микробиоты как ранние немоторные проявления болезни Паркинсона. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 66–74

## Обонятельная дисфункция и изменение микробиоты как ранние немоторные проявления болезни Паркинсона

Кострюкова Е.С.<sup>1</sup>, Алифирова В.М.<sup>2</sup>, Жукова Н.Г.<sup>2</sup>, Жукова И.А.<sup>2</sup>, Ижболдина О.П.<sup>2</sup>, Петров В.А.<sup>2</sup>, Миронова Ю.С.<sup>2</sup>, Латыпова А.В.<sup>2</sup>, Никитина М.А.<sup>2</sup>, Титова М.А.<sup>2</sup>, Тяхт А.В.<sup>1</sup>, Дорофеева Ю.Б.<sup>2</sup>, Салтыкова И.В.<sup>2</sup>, Сазонов А.Э.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

Россия, 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет

Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>3</sup> Московский государственный университет (МГУ) им. М.В. Ломоносова

Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** — изучить два наиболее часто встречающихся немоторных симптома болезни Паркинсона: нарушение обоняния и запоры, а также связанное с ними фекальное разнообразие микроорганизмов у пациентов с болезнью Паркинсона.

**Материал и методы.** У 51 пациента с болезнью Паркинсона исследована ольфакторная функция с помощью обонятельного теста Sniffin Sticks Test и изучено таксономическое разнообразие фекальной микробиоты.

**Результаты.** Обонятельные нарушения в виде гипосмии и аносмии были выявлены у подавляющего большинства пациентов с болезнью Паркинсона. Обнаружены различия  $\alpha$ -разнообразия кишечных микроорганизмов в зависимости от ольфакторной характеристики больных с болезнью Паркинсона.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют расширить представления об этиологии и патогенезе болезни Паркинсона.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, немоторные симптомы, обоняние, микробиота.

### ВВЕДЕНИЕ

Одно из приоритетных направлений современной медицины — это изучение новых представлений о причинах и механизмах, а также диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний.

К этим социально значимым и до настоящего времени фатальным болезням в первую очередь относятся болезнь Паркинсона (БП) и болезнь Альцгеймера, которые не только мучительны для больных, но и ложатся тяжелым финансовым бременем на общество [1]. БП является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, занимая второе место после болез-

✉ Ижболдина Ольга Петровна, e-mail: olga.izhboldina@inbox.ru

ни Альцгеймера по количеству своих «жертв». Сегодня во всем мире насчитывается 7–10 млн пациентов с диагнозом БП [2].

Известно, что при БП за счет включения механизмов пластичности мозга длительное время болезнь развивается бессимптомно [1]. Клинический диагноз БП в настоящее время устанавливается только при наличии определенных моторных симптомов, таких как тремор, гипокинезия, ригидность и постуральная неустойчивость. Однако двигательные нарушения становятся очевидными лишь тогда, когда проходит много лет после начала патологического нейродегенеративного процесса и когда количество дофаминергических клеток черной субстанции сокращается на 90% [3]. Поэтому важнейшей задачей является разработка ранней (доклинической) диагностики БП задолго до появления первых характерных симптомов и их превентивного лечения с целью замедления гибели нейронов для продления периода бессимптомной жизни потенциального больного БП [1].

В последние десятилетия стало известно, что помимо классических двигательных расстройств БП характеризуется широким спектром немоторных симптомов, которые могут затрагивать различные сферы. Психические дисфункции характеризуются разнообразными когнитивными, поведенческими, аффективными и психотическими нарушениями. Вегетативные включают в себя широкий спектр проявлений: запоры, снижение массы тела, сухость кожи с дистальным гипергидрозом, слюнотечение, плохая переносимость жары и (или) холода, дисфагия, ноктурия, ургентные позывы к мочеиспусканию, недержание мочи, эректильная дисфункция у мужчин и аноргазмия у женщин, ортостатическая гипотензия, пароксизмы тахикардии, диффузная алопеция, сухость кожи, избыточная секреция ушной серы, себорея, трофические нарушения кожи и слезотечение [4]. Сенсорный дисбаланс проявляется парестезиями, ноющими болями в мышцах. Кроме того, больные с БП довольно часто отмечают у себя нарушения сна и бодрствования, а также расстройство обоняния [1].

Последние несколько лет особое внимание уделяется изучению именно премоторных симптомов БП, которые гипотетически могут рассматриваться как специфические маркеры заболевания. Существует мнение, что анализ совокупности немоторных проявлений БП в сочетании с методами нейровизуализации может способствовать не только подтверждению диагноза в спорных случаях, но и выявлению патологии на самом раннем этапе [5].

Среди немоторных проявлений заболевания особо следует выделить нарушение обонятельной функции, которое встречается почти у 90% пациентов [5, 6]. Однако большинство пациентов даже не упоминают об ослаблении обонятельной функции во время визита к врачу, тогда как при детальном сборе анамнеза можно выявить те или иные ольфакторные изменения. Часто при БП снижение обоняния появляется раньше двигательных нарушений. До 51% больных с БП страдают аносмией, 35% – тяжелой и 14% – умеренной гипосмией [7]. Дефицит обоняния при БП имеет двусторонний характер и не связан с тем, с какой стороны тела ассоциированы моторные нарушения, тяжестью, продолжительностью болезни и применением антипаркинсонических препаратов [8].

По данным некоторых авторов, распространенность ольфакторной дисфункции намного выше на ранней стадии БП, чем основных моторных проявлений [9]. Если бы обонятельный дефицит при БП выходил на первый план клинической картины, то заболевание вполне могло быть охарактеризовано как нейродегенеративная патология с первичными обонятельными нарушениями, сопровождающаяся двигательными расстройствами [10]. Считается, что при БП снижение обоняния происходит постепенно, начинаясь задолго (8–20 лет) до появления первых клинических моторных признаков заболевания [10, 11].

Вторым наиболее распространенным немоторным симптомом БП является констипация (запоры). Еще Джеймс Паркинсон в своей работе «Эссе о дрожательном параличе» (1817) отметил, что это заболевание практически всегда существует вместе с запорами [12]. Сегодня многие ссылаются на недостаточность знаний в тот период времени и опровергают это мнение, подкрепляя иные теории соответствующими исследованиями [13]. Однако медики-практики и ученые, которые придерживаются мнения о наличии взаимосвязи запоров и БП, неоднократно проводили эксперименты для подтверждения данного факта [13]. Так, статистические данные указывают на то, что 30% людей, страдающих хроническими запорами в течение жизни, в дальнейшем заболевают БП [14, 15]. Профессор кафедры клеточной биологии университета Колумбии Михаэль Гершон и вовсе обнаружил изменения, связанные с паркинсонизмом в тех участках головного мозга, которые отвечают за функциональность и работоспособность кишечника [16].

Но, несмотря на эти факты, доказать, что все-таки причиной болезни становятся запоры,

пока никому не удалось. Запоры при БП – далеко не редкость, они встречаются чаще, чем в 50% случаев [13, 14] из-за ухудшения перистальтики кишечника, а со временем полной его атонии. Происходит это по ряду причин: акинезии и ригидности мышц; поражения некоторых отделов головного мозга, которые отвечают за полноценную функциональность органов пищеварения; побочного действия некоторых препаратов; погрешностей в питании; возрастных нарушений. Запоры приводят к снижению всасывания леводопы, а соответственно к снижению эффективности проводимой терапии леводопосодержащими препаратами.

По данным института тихоокеанских исследований в Гонолулу, лица, которые страдали запорами, заболевали БП в 2,7 раза чаще, чем с нормальной частотой и характером дефекаций [15]. Хотя запор сам по себе не является точным предиктором БП, он может быть полезным индикатором развития данного заболевания. По данным научных исследований, встречаемость этого симптома у пациентов с идиопатической БП составляет 20–80% [13, 14, 17]. Запоры, так же как и обонятельные расстройства, могут возникать за несколько лет до появления первых моторных признаков заболевания, поэтому их относят к основным факторам высокого риска развития БП [13, 14, 17].

Если выявление изменений обонятельной функции вызывает определенные трудности, то диагностика энтеральных нарушений не представляет особого труда, т.к. пациенты часто довольно активно предъявляют жалобы на дисфункцию желудочно-кишечного тракта (замедленное опорожнение кишечника, анорексию, тошноту, рвоту, запоры). По данным некоторых исследователей тяжесть желудочно-кишечных нарушений коррелирует только с продолжительностью заболевания и выраженностью двигательного дефицита [2, 14, 17].

В последнее время появляется все больше новых гипотез патогенеза БП. Хочется отметить работы, посвященные взаимодействию микробиоты, населяющих кишечник, которые, возможно, запускают аутоиммунное воспаление, и, как следствие, являются триггером периферической нейродегенерации [17, 18]. Общность механизмов, происходящих в обонятельных и энтеральных структурах при развитии нейродегенеративного заболевания, подтверждается теорией Braak, согласно которой, дегенеративный процесс (накопление агрегатов  $\alpha$ -синуклеина) распространяется в нервной системе от периферии к центру [5, 19]. Доказательством этого является обнаружение частиц  $\alpha$ -синуклеина в оль-

факторном эпителии, а также в подслизистой и мышечной оболочках кишечника [5, 14, 17, 18].

Несмотря на множество проведенных исследований, в настоящее время понимание этиологии и патогенеза БП находится только на самом начальном этапе. Различные проявления премоторных симптомов при БП и их комбинации на сегодняшний день еще мало изучены и требуют детального рассмотрения. В связи с этим актуальным является изучение двух наиболее часто встречающихся симптомов заболевания – это нарушение обоняния и запоры, а также фекального разнообразия микроорганизмов у пациентов с БП.

Цель исследования – изучить два наиболее часто встречающихся немоторных симптома БП: нарушение обоняния и запоры, а также фекальное разнообразие микроорганизмов у пациентов с БП.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 51 человек с достоверным диагнозом БП, установленным согласно критериям клинической диагностики Банка головного мозга Общества БП Великобритании [20] в возрасте 48–83 лет (средний возраст  $(68,3 \pm 7,6)$  лет), из них 16 мужчин и 35 женщин. Длительность заболевания составила 1–17 лет, средняя продолжительность заболевания  $(6,2 \pm 3,7)$  года, средний возраст дебюта  $(62,1 \pm 8,9)$  лет. Все пациенты имели высшее или среднее специальное образование и на момент исследования получали противопаркинсоническую терапию. Так, комбинированную терапию (препараты леводопы и агонисты дофаминовых рецепторов) получали большинство пациентов – 35 (68,6%) человек, монотерапию (только агонисты дофаминовых рецепторов) принимала небольшая часть обследуемых – 16 (31,4%). Критерии включения и исключения в исследование представлены в таблице.

Все пациенты прошли стандартное неврологическое обследование. Для оценки когнитивных функций использовали МоСА-тест [21]. Обоняние исследовали с помощью адаптированной версии ольфактометрического теста Sniffin Sticks Test (Германия). Количественную оценку обонятельной функции проводили при суммарном подсчете так называемого общего балла TDI: threshold (порог восприятия запаха), discrimination (дискриминация запаха), identification (идентификация запаха). Сумма 31 балл и больше интерпретировалась как норма, 16–30 баллов указывала на гипосмию, 15 баллов и ниже – на функциональную аносмию в виде потери обоняния или крайне ослабленной способности воспринимать запах.

Т а б л и ц а 1

| Критерии включения и исключения пациентов в исследование                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Критерии включения                                                                                                                                                    | Критерии исключения                                                                                                                                                                                                |
| Подписанное информированное согласие пациента на участие в исследовании                                                                                               | Отказ от подписания информированного согласия и участия в исследовании                                                                                                                                             |
| Мужчины и женщины, возраст 45–85 лет включительно, с разными формами течения и степенью тяжести заболевания БП, получающие специфическую терапию                      | У пациента установлен синдром паркинсонизма в рамках другой патологии                                                                                                                                              |
| Отсутствие аллергических реакций в настоящее время или в анамнезе.                                                                                                    | Прием в настоящее время или в анамнезе препаратов, вызывающих лекарственный паркинсонизм и треморогенных препаратов                                                                                                |
| Отсутствие когнитивных нарушений, определяемых с помощью Монреальской шкалы оценки когнитивных функций (Montreal Cognitive Assessment, MoCA-тест) – 26 баллов и более | Наличие у пациента острого процесса или обострения хронического воспаления слизистой оболочки носа и пазух, наличие в анамнезе травм и операций на структурах полости носа и придаточных пазух                     |
|                                                                                                                                                                       | Наличие у пациента серьезной соматической патологии в стадии обострения и (или) декомпенсации                                                                                                                      |
|                                                                                                                                                                       | Наличие у пациента по данным анамнеза токсического воздействия на слизистую носа                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                       | Курение пациента в период исследования                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                       | Признаки когнитивных нарушений при выполнении MoCA-теста (меньше 26 баллов)                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                       | У пациента имеется значимое психическое заболевание (в том числе и депрессия), которое, по мнению исследователя, создаст нежелательный риск для пациента или повлияет на его приверженность протоколу исследования |

Получение ДНК микробиоты проводили стандартной методикой, модифицированной с целью более полного выделения именно метагеномной ДНК, то есть бактериальной ДНК микробиоты [22]. Подготовка библиотек и ампликонное секвенирование маркерного вариабельного участка V3–V4 бактериальных генов 16S рРНК осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно стандартному протоколу производителя [23].

Фильтрация прочтений по качеству и их таксономическая классификация были выполнены с помощью программного обеспечения QIIME [24]. Для более точного определения таксономической принадлежности прочтений применяли следующий подход: командой `pick_rep_set.py` осуществлялся подбор референсного набора операционных таксономических единиц (ОТЕ) бактерий на основании сравнения полученных прочтений генов 16S рРНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [25]. Затем командой `assign_taxonomy.py` с использованием алгоритма `rdp` присваивали таксономической информации прочтениям референсного набора на основании сравнения их со специализированной базой данных кишечной микробиоты HITdb, содержащей информацию о связи найденных ОТЕ бактерий с ближайшими культивируемыми видами [26].

Изучение  $\alpha$ -разнообразия кишечной микробиоты проводилось при помощи программного обеспечения QIIME. Для оценки  $\alpha$ -разнообразия (таксономического богатства бактериальных сообществ) выполняли прореживание образцов на уровне образца с минимальной представлен-

ностью операционных таксономических единиц (12 900 ОТЕ/образец) с последующим подсчетом индекса таксономического разнообразия `chaol` в исследуемых группах. Индексы сравнивали, применяя непараметрический Т-критерий. Для поиска зависимости между степенью потери обоняния и представленностью различных бактериальных таксонов в кишечнике использовалась линейная регрессионная модель, реализованная в статистическом языке R, с оценкой гетероскедастичности случайных ошибок тестом Голдфелда – Квандта. Результаты обонятельного теста приведены в процентах, данные о таксономической представленности прорежены до глубины 12 900 ОТЕ/образец и лог-трансформированы по основанию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа состояла из нескольких этапов. На первом этапе был проведен клинический анализ 51 больного с установленным диагнозом БП, смешанной клинической формой, умеренным темпом прогрессирования и II–III стадией по Хен и Яру.

На втором этапе у всех обследуемых лиц оценивали обонятельную функцию. Так, у 49 (96,1%) пациентов с БП выявлены обонятельные нарушения той или иной степени выраженности и лишь у 2 (3,9%) – нормосмия. В структуре обонятельных нарушений преобладала гипосмия – 34 (66,7%) человека, аносмия зафиксирована у 15 (29,4%). Несмотря на то что обонятельный дефицит был обнаружен у значительного количества пациентов с БП, только 12 (23,53%) больных активно предъявляли жалобы на снижение обоняния.

Обонятельные нарушения у этих лиц появились в среднем за  $(14,5 \pm 4,3)$  лет до первых двигательных симптомов заболевания. Вероятно, отсутствие субъективного восприятия ольфакторных изменений у пациентов с БП связано с длительным и постепенным процессом снижения обонятельной функции из-за медленно протекающего нейродегенеративного процесса. В связи с чем больные успевали привыкнуть и адаптироваться к нарушению обоняния, часто не замечая его.

Подробное изучение обоняния у пациентов с anosmией позволило выявить две подгруппы: I – 4 (26,7%) человека с «качественной» anosmией (TDI-балл = 0) и II – 11 (73,3%) с «количественной» anosmией (TDI-балл  $\leq 15$ ). У больных с «качественной» anosmией полностью отсутствовало восприятие запахов, и по каждому субтесту пациенты имели 0 баллов. Лица с «количественной» anosmией ощущали запахи плохо. При количественной оценке ольфакторной функции в данной подгруппе отмечались низкие показатели всех параметров обоняния (порог восприятия запаха, дискриминация и идентификация запаха). Причем более активно жалобы на длительное снижение обоняния предъявляли пациенты из I подгруппы.

На следующем этапе проведена оценка работы желудочно-кишечного тракта у данных пациентов с дальнейшим изучением их микробиоты. У всех обследуемых больных выявлены запоры, корректируемые приемом слабительных препаратов при отсутствии стула более 48 ч.

Последний этап – это сравнительная оценка микробиотического разнообразия у пациентов с БП в зависимости от выраженности обонятельного дефицита. Оказалось, что  $\alpha$ -разнообразие микроорганизмов, рассчитанное по индексу *chao1*, достоверно выше ( $p < 0,05$ ) у пациентов с гипосмией и «количественной» anosmией (данные две группы статистически значимо не отличались между собой), чем у пациентов с нормосмией и «качественной» anosmией (также не выявлено статистических различий внутри этих двух групп) (рис. 1, 2).

Данные результаты можно объяснить, если учесть гипотезу о влиянии снижения разнообразия кишечной микробиоты на энтеральный воспалительный процесс, запускающий агрегацию  $\alpha$ -синуклеина в кишечнике [14, 17]. Вероятно, в самом начале нейродегенеративного процесса разнообразие микроорганизмов небольшое. При продолжающейся гибели клеток начинает увеличиваться количество микробиотических таксонов, усиливая тем самым воспаление и, как следствие, нейродегенерацию. В связи с этим максимальное разнообразие микробиоты наблюдается у лиц с

гипосмией и «количественной» anosmией. В свою очередь, когда нейродегенеративный процесс достигает своего пика, микробиота перестает оказывать значимое влияние, и при этом снижается ее разнообразие.

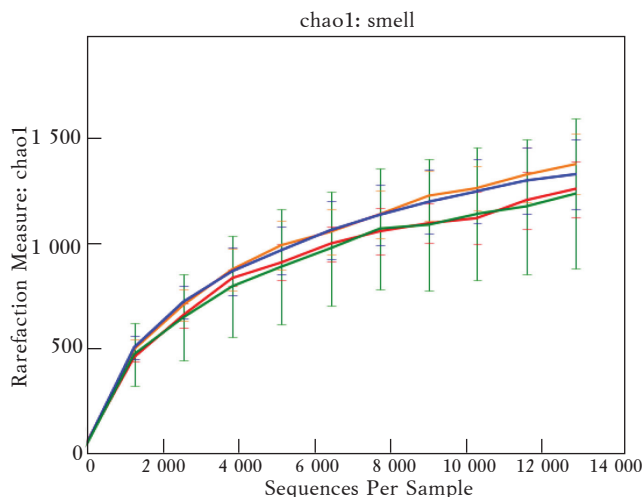


Рис. 1.  $\alpha$ -Разнообразие кишечной микробиоты в зависимости от обонятельной функции: синяя кривая – пациенты с гипосмией; оранжевая кривая – пациенты с «количественной» anosmией; зеленая кривая – пациенты с нормосмией; красная кривая – пациенты с «качественной» anosmией. Ось X – глубина прореживания прочтений 16S рРНК/образец; ось Y – значение индекса  $\alpha$ -разнообразия кишечной микробиоты, рассчитанное по индексу *chao1*

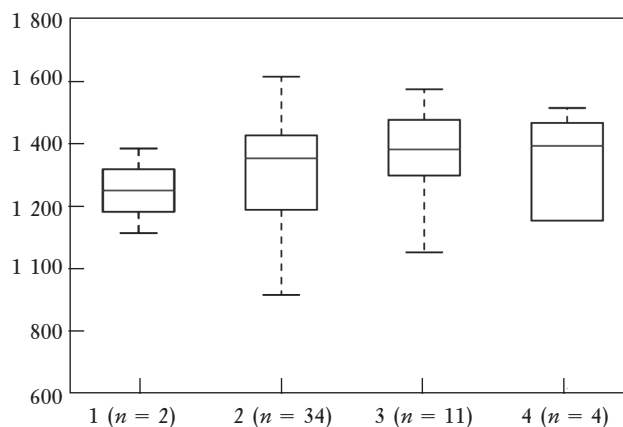


Рис. 2. Таксономическое разнообразие кишечной микробиоты у больных с болезнью Паркинсона: 1 – пациенты с нормосмией; 2 – пациенты с гипосмией; 3 – пациенты с «количественной» anosmией; 4 – пациенты с «качественной» anosmией. Ось X – распределение пациентов на группы по состоянию обонятельной функции; ось Y – значение индекса  $\alpha$ -разнообразия кишечной микробиоты, рассчитанное по индексу *chao1*

При межгрупповом сравнении отмечалась тенденция к количественному различию микробиоты ( $p < 0,05$ ) между лицами с нормосмией, гипосмией и «качественной» anosmией.

С использованием многофакторной линейной регрессии был выявлен определенный кластер бак-

терий, при этом в зависимости от состояния обоняния менялась количественная представленность следующих бактерий ( $R^2 = 0,966$ ;  $p < 0,001$ ; данные гомоскедастичны по тесту Goldfeld – Quandt,  $p = 0,06$ ): *Lactobacillus salivarius*; *Oscillospira (Flavonifractor) plautii*; *Christensenella minuta*; *Barnesiella intestinihominis*; *Gemmiger formicilis*; *Clostridium clariflavum*; *Eubacterium sapheum*; *Bacteroides caccae*; *Vectivallis vadensis*; *Bacteroides eggerthii*; *Turicibacter sanguinis*; *Catabacter hongkongensis*; *Streptococcus gordonii*; *Christensenellaminuta*; *Lachnoclostridium bathewayi*; *Porphyromonas asaccharolytica*; *Bifidobacterium bifidum*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что существует определенная взаимосвязь между микробиотой кишечника и состоянием обонятельной функции у пациентов с БП. Несмотря на полученные положительные результаты, необходимо дальнейшее изучение этой темы для лучшего понимания этиологии и патогенеза нейродегенеративных заболеваний.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП №14.604.21.0150 «Выявление биомаркеров микробиотического сообщества кишечника для ранней, доклинической диагностики болезни Паркинсона» (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0150).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

План и проведение научно-исследовательской работы полностью соответствовали принципам Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice – GCP) и Хельсинской декларации (включая поправки). Протокол исследования был одобрен независимым этическим комитетом СибГМУ (заключение № 3669 от 22 декабря 2014 г.). Письменное информированное согласие получали от всех пациентов или от их близких родственников и лиц, официально признанных ответственными за пациентов на момент проведения исследования. Пациенты и их родственники были информированы нами о характере исследования, его цели и возможных осложнениях, а также могли в любое время в одностороннем порядке прервать исследование.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. М.В. Угрюмова. М.: Научный мир, 2014. Т.1: 577.
2. Parkinson's Disease Foundation [Электронный ресурс] // Statistics on Parkinson's. Retrieved. 2015. Jul. 20. Режим доступа: [http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics).
3. Fearnley J.M., Lees A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity // *Brain*. 1991; 114 (5): 2283–2301. doi:10.1093/brain/114.5.2283
4. Голубев В.А., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс, 1999: 416.
5. Doty R. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders // *Neurobiology of Disease*. 2012; 46 (3): 527–552. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.026
6. Жукова И.А., Жукова Н.Г., Ижболдина О.П. и др. Анализ методов оценки обоняния у пациентов с болезнью Паркинсона // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015; 6 (2): 47–52. doi: 10.17116/jnevro20151156244-49
7. Морозова С.В., Савватеева Д.М., Петрова Е.И. Обонятельные расстройства у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями // *Неврологический журнал*. 2014; 19 (1): 4–8. doi.org/10.18821/1560-9545-2014-19-1-4-8
8. Haehner A., Hummel T., Reichmann H. Olfactory Loss in Parkinson's Disease // *Parkinson's Disease*. 2011; 2011: 1–6. doi.org/10.4061/2011/450939
9. Alves G., Forsaa E.B., Pedersen K.F. et al. Epidemiology of Parkinson's disease // *Journal of Neurology*. 2008; 255 (5): 18–32. doi.org/10.1007/s00415-008-5004-3
10. Handbook of Olfaction and Gustation. / ed by Doty R. Wiley & Sons Ltd., 2015: 910. doi: 10.1002/9781118971758
11. Qian Xiao, Sheng Chen, Weidong Le. Hyposmia a possible biomarker of Parkinson's disease // *Neuroscience Bulletin*. 2014; 30 (1): 134–140. doi:10.1007/s12264-013-1390-3.
12. Болезнь Паркинсона и расстройства движений / под ред. Иллариошкина С.Н., Левина О.С. М.: ЗАО «РКИ Соверо пресс», 2014: 405.
13. Chen H., Burton E.A., Ross G.W. et al. Research on the premotor symptoms of Parkinson's Disease: clinical and etiological implications // *Environ Health Perspect*. 2013; 121: 1245–1252. doi.org/10.1289/ehp.1306967
14. Noyce A.J., Bestwick J.P., Silveira-Moriyama L. et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease // *Annals of Neurology*. 2012; 72 (6): 893–901. doi.org/10.1002/ana.23687
15. Ghaisas S., Maher J., Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases // *Pharmacology & Therapeutics*. 2016; 158: 52–62. doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.012
16. Мозговая деятельность в желудочно-кишечном тракте. [Электронный ресурс] 2010. Режим доступа:

- <http://www.jv.ru/news/psikhologhiia/14347-mozgovaya-deyatelnost-v-zheludochnokishechnom-trak.html>
17. Abbott R.D., Petrovitch H., White L.R. et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease // *Neurology*. 2001; 57 (3): 456–462. doi:10.1212/WNL.57.3.456
  18. Felice V.D., Quigley E.M., Sullivan A.M. et al. Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2016; 27: 1–8. doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.03.012
  19. Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology // *Cell and tissue research*. 2004; 318 (1): 121–134. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9
  20. Gibb W.R., Lees A.J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1988; 51 (6): 745–752. doi.org/10.1136/jnnp.51.6.745
  21. Hobson J. The Montreal Cognitive Assessment (MoCA) // *Occupational Medicine*. 2015; 65 (9): 764–765. doi.org/10.1093/occmed/kqv078
  22. Egshatyan L., Kashtanova D., Popenko A. et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance // *Endocrine Connections*. 2016; 5 (1): 1–9. doi.org/10.1530/ec-15-0094
  23. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation: Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>
  24. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods*. 2010; 7 (5): 335–336. doi.org/10.1038/nmeth.f.303
  25. DeSantis T. Z., Hugenholtz P., Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 5069–5072. doi.org/10.1128/aem.03006-05
  26. Ritar J., Salojärvi J., Lahti L., de Vos W.M. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database // *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056. doi.org/10.1186/s12864-015-2265-y

Поступила в редакцию 14.10.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Кострюкова Елена Сергеевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией постгеномных исследований в биологии, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва.

Алифиров Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Наталья Григорьевна, д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Ирина Александровна, канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Ижболдина Ольга Петровна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Петров Вячеслав Алексеевич, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Миронова Юлия Сергеевна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Латыпова Алина Викторовна, ординатор кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ г. Томск.

Никитина Мария Анатольевна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ г. Томск.

Титова Марина Андреевна, канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск.

Тягт Александр Викторович, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории биоинформатики, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва.

Дорофеева Юлия Борисовна, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Салтыкова Ирина Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Сазонов Алексей Эдуардович, д-р мед. наук, зам. проректора Управления научной политики и организации научных исследований МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

(✉) Ижболдина Ольга Петровна, e-mail: [olga.izhboldina@inbox.ru](mailto:olga.izhboldina@inbox.ru)

УДК 616.858-092:616.214.8-008.1

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-66–74

For citation: Kostryukova E.S., Alifirova V.M., Zhukova N.G., Zhukova I.A., Izhboldina O.P., Petrov V.A., Mironova Yu.S., Latypova A.V., Nikitina M.A., Titova M.A., Tyakht A.V., Dorofeeva Yu.B., Saltykova I.V., Sazonov A.E. Olfaction dysfunction and modification of microbiota as early non-motor manifestations of Parkinson's disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 66–74

# Olfactory dysfunction and modification in microbiota as early non-motor manifestations of Parkinson's disease

Kostyukova E.S.<sup>1</sup>, Alifirova V.M.<sup>2</sup>, Zhukova N.G.<sup>2</sup>, Zhukova I.A.<sup>2</sup>, Izhboldina O.P.<sup>2</sup>, Petrov V.A.<sup>2</sup>, Mironova Yu.S.<sup>2</sup>, Latypova A.V.<sup>2</sup>, Nikitina M. A.<sup>2</sup>, Titova M.A.<sup>2</sup>, Tyakht A.V.<sup>1</sup>, Dorofeeva Yu.B.<sup>2</sup>, Saltykova I.V.<sup>2</sup>, Sazonov A.E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Physico-Chemical Medicine of Russian Federal Medico-Biological Agency (RIPCM) 1a, Malaya Pirogovskaya Str., Moscow, 119992, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

## ABSTRACT

**The purpose of this paper** is to study the most common non-motor symptoms of the Parkinson's disease (PD): olfactory dysfunction, constipation and associated with them variety of fecal microorganisms in patients with Parkinson's disease.

**Materials and methods.** We studied olfactory function in 51 patients with PD using Sniffin Sticks Test and taxonomic composition of fecal microbiota.

**Results.** Olfactory dysfunctions (hyposmia, anosmia) were found in most patients that participated in study as well as differences in alpha-variety of gut microbiota among groups with different olfactory characteristics.

**Conclusion.** Our findings suggest that the composition of gut microbiota must be associated with etiology and pathogenesis of PD.

**Key words:** Parkinson's disease, non-motor symptoms, olfaction, microbiota.

## REFERENCES

1. Nejrodegenerativnye zabolevaniya: ot genoma do celostnogo organizma [Neurodegenerative diseases: from genome to organism level] / ed. M.V. Ugryumova. M.: Nauchnyj mir Publ., 2014. Vol. 1: 577 (in Russian).
2. Parkinson's Disease Foundation [Электронный ресурс] // Statistics on Parkinson's. Retrieved. 2015. Jul. 20. Режим доступа: [http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics).
3. Fearnley J.M., Lees A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity // *Brain*. 1991; 114 (5): 2283–2301. doi:10.1093/brain/114.5.2283
4. Golubev V.L., Levin YA.I., Vejn A.M. Bolezn' Parkinsona i sindrom parkinsonizma [Parkinson's disease and parkinsonism syndrome]. M.: MEDpress, 1999: 416 (in Russian).
5. Doty R. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders // *Neurobiology of Disease*. 2012; 46 (3): 527–552. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.026
6. Zhukova I.A., Zhukova N.G., Izhboldina O.P. Analiz metodov ocenki obonyaniya u pacientov s boleznyu Parkinsona [Methods for evaluating sense of smell in patients with Parkinson's disease] // *Zhurnal nevrologii i psixiatrii im. S.S. Korsakova*. 2015; 6(2): 47–52. doi: 10.17116/jnevro20151156244-49 (in Russian).
7. Morozova S.V., Savateeva D.M., Petrova E.I. Obonyatel'nye rasstrojstva u pacientov s nejrodegenerativnymi zabolevaniyami [Olfactory dysfunction in patients with neurodegenerative disorders] // *Neurologicheskij zhurnal – Neurological Journal*. 2014; 19 (1): 4–8. doi: [10.18821/1560-9545-2014-19-1-4-8](https://doi.org/10.18821/1560-9545-2014-19-1-4-8) (in Russian).
8. Haehner A., Hummel T., Reichmann H. Olfactory Loss in Parkinson's Disease // *Parkinson's Disease*. 2011; 2011: 1–6. doi.org/10.4061/2011/450939
9. Alves G., Forsaa E.B., Pedersen K.F. et al. Epidemiology of Parkinson's disease // *Journal of Neurology*. 2008; 255 (5): 18–32. doi.org/10.1007/s00415-008-5004-3
10. Handbook of Olfaction and Gustation. / ed by Doty R. Wiley & Sons Ltd., 2015: 910. doi: 10.1002/9781118971758
11. Qian Xiao, Sheng Chen, Weidong Le. Hyposmia a possible biomarker of Parkinson's disease // *Neuroscience Bulletin*. 2014; 30 (1): 134–140. doi:10.1007/s12264-013-1390-3.
12. Bolezn' Parkinsona i rasstrojstva dvizhenij [Parkinson's disease and movement disorders] / ed. Illarioshkina S.N., Levina O.S. M.: ZAO "RKI Sovero press" Publ., 2014: 405 (in Russian).
13. Chen H., Burton E.A., Ross G.W. et al. Research on the premotor symptoms of Parkinson's Disease: clinical and etiological implications // *Environ Health Perspect*. 2013; 121: 1245–1252. doi.org/10.1289/ehp.1306967
14. Noyce A.J., Bestwick J.P., Silveira-Moriyama L. et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors

- for Parkinson disease // *Annals of Neurology*. 2012; 72 (6): 893–901. doi.org/10.1002/ana.23687
15. Ghaisas S., Maher J., Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases // *Pharmacology & Therapeutics*. 2016; 158: 52–62. doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.012
16. Mozgovaya deyatel'nost' v zheludochno-kishechnom trakte [Brain function in gastrointestinal tract]. [Elektronnyy resurs] [Elektronnyy resurs] 2010. Rezhim dostupa: <http://www.jv.ru/news/psikhologhiia/14347-mozgovaya-deyatelnost-v-zheludochnokishechnom-trak.html> (in Russian).
17. Abbott R.D., Petrovitch H., White L.R. et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease // *Neurology*. 2001; 57 (3): 456–462. doi:10.1212/WNL.57.3.456
18. Felice V.D., Quigley E.M., Sullivan A.M. et al. Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2016; 27: 1–8. doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.03.012
19. Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology // *Cell and tissue research*. 2004; 318 (1): 121–134. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9
20. Gibb W.R., Lees A.J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1988; 51 (6): 745–752. doi.org/10.1136/jnnp.51.6.745
21. Hobson J. The Montreal Cognitive Assessment (MoCA) // *Occupational Medicine*. 2015; 65 (9): 764–765. doi.org/10.1093/occmed/kqv078
22. Egshatyan L., Kashtanova D., Popenko A. et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance // *Endocrine Connections*. 2016; 5 (1): 1–9. doi.org/10.1530/ec-15-0094
23. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation: Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: <http://web.uri.edu/gsc/files/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>
24. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods*. 2010; 7 (5): 335–336. doi.org/10.1038/nmeth.f.303
25. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 5069–5072. doi.org/10.1128/aem.03006-05
26. Ritari J., Salojärvi J., Lahti L., de Vos W.M. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database // *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056. doi.org/10.1186/s12864-015-2265-y

Received October 14.2016

Accepted December 01.2016

**Kostryukova Elena S.**, PhD, Head of Laboratory Postgenomics Research in Biology, RIPCМ, Moscow, Russian Federation.  
**Alifirova Valentina M.**, MD, Professor, Head of the Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Natalia G.**, MD, Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Irina A.**, PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Izhboldina Olga P.**, Post-graduate Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Petrov Vyacheslav A.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory of the Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Mironova Yulia S.**, Post-graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Latypova Alina V.**, Neurology Resident, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Nikitina Maria A.**, Post-graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Titova Marina A.**, PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Tyakht Alexandr V.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Bioinformation, RIPCМ, Moscow, Russian Federation.

**Dorofeeva Yulia B.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Saltykova Irina V.**, PhD, Researcher, Central Research Laboratory of the Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Sazonov Alexey E.**, MD, Deputy Vice-Rector, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

(✉) **Izhboldina Olga P.**, e-mail: [olga.izhboldina@inbox.ru](mailto:olga.izhboldina@inbox.ru)

УДК 576.3.085.23:611.018.23

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-75–82

Для цитирования: Кулакова К.В., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н. Совместное использование разработанных коллагеносодержащих комплексов и культуры клеток для создания новых тканевых эквивалентов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 75–82

## Совместное использование разработанных коллагенсодержащих комплексов и культуры клеток для создания новых тканевых эквивалентов

Кулакова К.В., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н.

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр (ПФМИЦ)  
Россия, 603155, г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская Набережная, 18

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** – оценка возможности применения созданного комплексного модуля в качестве основы клеточно-тканевого эквивалента для лечения ран кожи и мягких тканей. В рамках поставленной цели решались задачи по изучению пространственной структуры и архитектоники поверхности разработанных базовых коллагенсодержащих материалов и их биосовместимости с клеточными культурами.

**Материал и методы.** Проведено исследование материала, который представляет собой двухслойный пленочный комплекс, состоящий из коллагенового и полисахаридного компонентов. Коллаген выделялся из дермы и был импрегнирован мелкодисперсным деминерализованным костным матриксом (ДКМ) по оригинальной методике. Для исследования дегидратированный материал был выполнен в виде пленки. Электронно-микроскопическое исследование поверхности проведено на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-IT300LV (Япония) в режиме высокого вакуума и при низких значениях тока зонда ( $< 0,1$  нА). Исследования по оценке жизнеспособности клеток в условиях культивирования на пленках из коллагенсодержащего материала (тестирование на цитотоксичность и адгезивную способность) проводили *in vitro* с использованием штаммов диплоидных фибробластов человека 4–6-го пассажа. Состояние культуры оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа Leica DM (Carl Zeiss, Австрия), оснащенного компьютерной программой контроля роста культуры (Leica IM 1000).

**Результаты.** Данные, полученные при изучении структуры поверхности разработанного комплексного модуля, показали, что он представляется перспективным в качестве базового компонента клеточно-тканевой системы: наличие большого количества структурных образований для фиксации клеток и хорошо организованного барьерного слоя, способного к паро- и водонепроницаемости. Таким образом, экспериментально подтверждено соответствие физических характеристик разработанного базового комплекса требованиям, предъявляемым к материалам для культивирования клеток. Показано отсутствие цитотоксичности на модели культуры дермальных фибробластов человека, что позволяет сделать вывод о возможности его использования в качестве основы клеточно-тканевого эквивалента. Полученные предварительные результаты указывают на целесообразность дальнейшего проведения экспериментов *in vivo*, направленных на совершенствование комплексных коллагенсодержащих материалов, разработку различных способов их применения и клиническую оценку эффективности при лечении ран различного генеза.

**Ключевые слова:** коллаген, регенерация, тканевая инженерия, клеточная культура, фибробласты.

✉ Кулакова Ксения Владимировна, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Восстановление структуры и функций поврежденных тканей на основе использования клеточных технологий и тканевой инженерии представляет собой перспективное направление регенеративной медицины. Для создания комбинированных заменителей соединительной ткани широко используется коллаген, выделяемый из различных источников. Он может применяться в различных формах и многообразных сочетаниях с лекарственными препаратами и культурами клеток в соответствии с конкретными клиническими задачами [1]. Разработка материалов, обеспечивающих структурообразующую и транспортную функции в системе «клетка – субстрат», изучение взаимодействия клеток и носителей для их культивирования представляют первоочередную задачу [2–5]. В рамках ее решения важным этапом является формирование трехмерных биодеградируемых матриц, способствующих регенерации окружающей ткани. В отделении консервации тканей ПФМИЦ (г. Нижний Новгород) разработан оригинальный метод выделения коллагена из ксеногенной дермы [6, 7] и на его основе создана гетерогенная матрица, в основу которой положен модульный принцип. Результаты исследования физико-механических свойств пленочных модификаций на разрывной машине марки Zwick 5 (Zwick GmbH. and Co., Германия) указывают на пригодность материала для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса [8].

Цель представленного исследования – оценка возможности создания на основе разработанного базового модуля клеточно-тканевого эквивалента для лечения ран кожи и мягких тканей. В рамках поставленной цели решались задачи по изучению пространственной структуры и архитектоники поверхности новых коллагенсодержащих материалов, а также их биосовместимости с клеточными культурами.

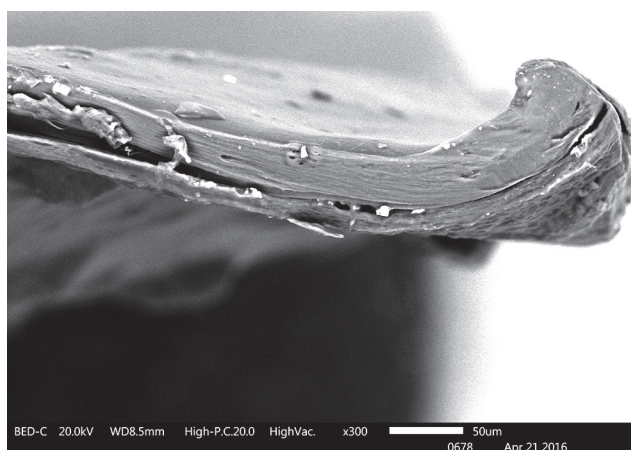
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Запатентованный материал представляет собой двухслойный пленочный комплекс, состоящий из коллагенового и полисахаридного компонентов [9]. Существует возможность модифицирования продукта в зависимости от технологических условий его изготовления и дополнения компонентами, актуальными в условиях проводимого эксперимента, либо конкретной клинической ситуации. Коллагеновый слой покрытия может быть импрегнирован мелкодисперсным деминерализованным костным матриксом (ДКМ), содержащим

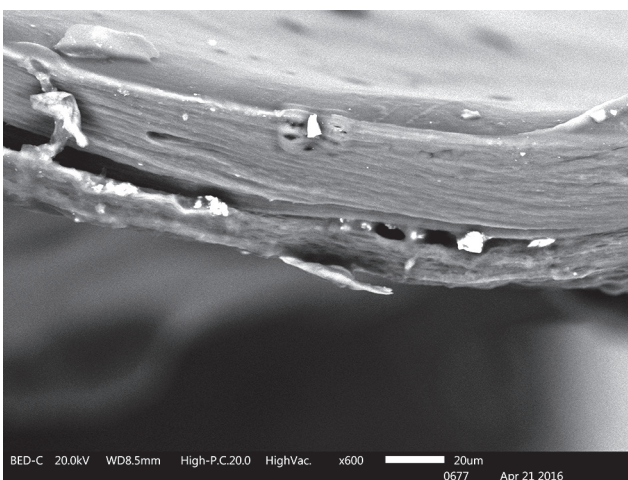
комплекс тканевых факторов роста [10–12]. Дегидратированный материал в виде пленки либо гель-пленки представляет собой раневое покрытие, выполненное с учетом современных требований, способное оптимизировать раневой процесс и значительно сокращать сроки эпителизации ран кожи [13]. Кроме того, в таком виде материал представляет собой основу для получения клеточно-тканевого комплекса. Выбор компонентов обусловлен их способностью активно влиять на регенеративный процесс и оптимизировать условия для его протекания. Аморфный коллаген III типа выполняет функцию депо аминокислот для построения собственных коллагеновых волокон фибробластами. ДКМ представляет собой структурированный коллаген I типа с сохраненной архитектоникой и в силу этого может служить эффективным носителем различных биологически активных веществ, обеспечивать необходимые особенности микрорельефа поверхности для прикрепления клеток и интенсифицировать их миграцию в область поражения из подлежащих тканей. Полисахаридный слой изолирует раневую поверхность от внешней среды и обеспечивает покрытию необходимые физические свойства: прочность, эластичность, адгезивные и адсорбционные свойства, проницаемость для жидкости и газов [14]. Электронно-микроскопическое исследование поверхности разработанного пленочного материала было выполнено на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-IT300LV (Япония) в режиме высокого вакуума и при низких значениях тока зонда ( $< 0,1$  нА), чтобы уменьшить воздействие электронного пучка на исследуемые образцы; диаметр электронного зонда до 3 нм. Оценка цитотоксичности созданного материала проведена в соответствии со следующим протоколом. В качестве тестовой культуры использованы три штамма диплоидных фибробластов человека 4–6-го пассажа (культура стерильна, микоплазмами и вирусами не контаминирована). Исходная концентрация:  $2 \times 10^5$  кл/см<sup>3</sup>. Контрольные точки исследования после пересева: 24 ч, 48, 72 ч. Условия культивирования: 37 °С, абсолютная влажность, 5% CO<sub>2</sub>, культуральные чашки Петри диаметром 35 мм (Corning, USA). Ростовая среда: DMEM (Sigma, США), 7–10%-я телячья эмбриональная сыворотка, 2%-й L-глутамин, антибиотики (100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мкг стрептомицина). Состояние культуры оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа Leica DM IL (Carl Zeiss, Австрия), оснащенного компьютерной программой контроля роста культуры (Leica IM 1000).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования поверхности пленочного материала показали следующие особенности характера структуры объекта: наличие двух разновеликих слоев, ДКМ занимает преимущественно пограничное положение, его частицы образуют хорошо различимые агломераты, размеры которых варьируют в широких пределах. На электронно-микроскопическом изображении среза исследуемого материала (рис. 1) видны вышеупомянутые слои пленки. Полисахаридный слой основы для тканевой конструкции по сравнению с коллагеновым слоем представляется более мощным, толщина его составляет 30 мкм, в то время как толщина коллагенового — 14 мкм. Поскольку полисахаридный слой обеспечивает функции адсорбции, водо-, газопроницаемости и отграничения раневой поверхности от внешней среды, такое взаимоотношение толщины слоев представляется обоснованным.



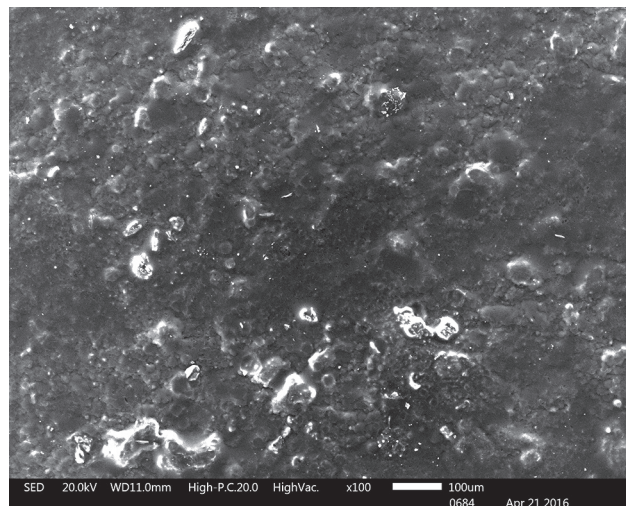
а



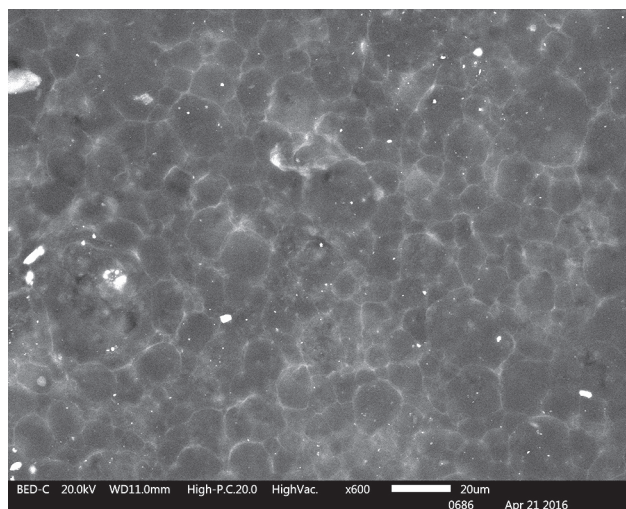
б

Рис. 1. Поперечный срез двухслойного коллагеново-полисахаридного материала с деминерализованным костным матриксом: а – ув. 300; б – ув. 600

Детальный анализ структуры коллагенового слоя подтвердил предположение, что она содержит большое количество полостей и локусов для фиксации клеток. Элементы ДКМ образуют объемные неоднородные включения в массе волокнистого фибриллярного коллагенового слоя (рис. 2).



а



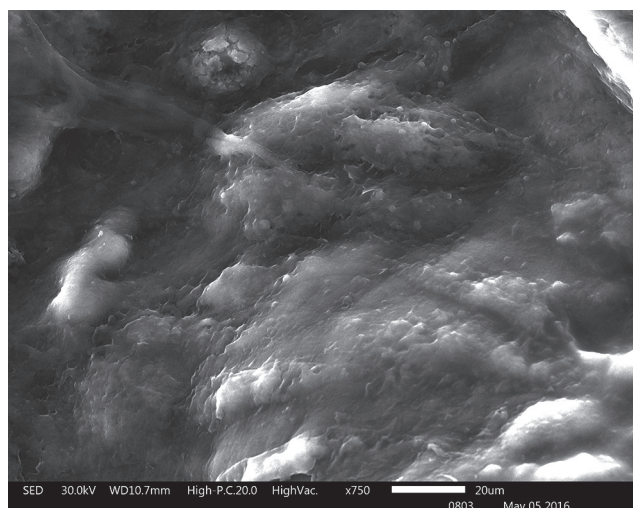
б

Рис. 2. Поверхность коллагенового слоя с деминерализованным костным матриксом. Виден хорошо организованный слой коллагена, в котором просматриваются включения деминерализованного костного матрикса: а – ув. 100; б – ув. 600

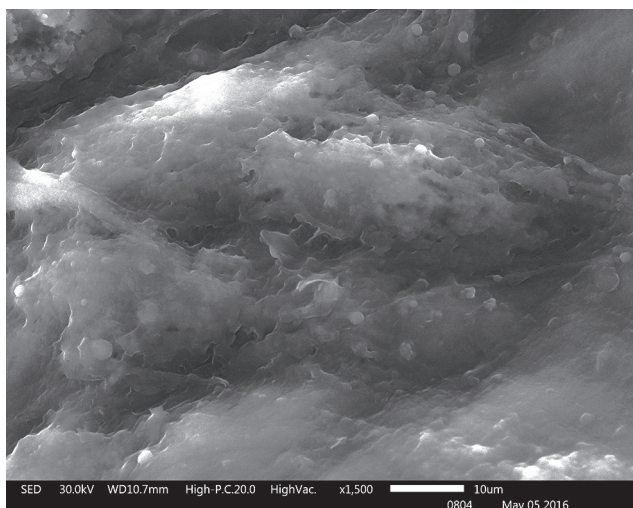
Анализ структуры поверхности коллагенового слоя материала после контакта с ростовой средой показал наличие процессов набухания, миграции частиц ДКМ из объема материала на поверхность коллагенового слоя, увеличивающей таким образом ее суммарную площадь.

Из-за большого разнообразия условий протекания раневых процессов, в ходе которых

возможны как активная экссудация из полости раны, так и отсутствие раневого отделяемого с риском образования струпа, наблюдаемая возможность миграции активных элементов в объеме созданного материала может быть эффективной.



а

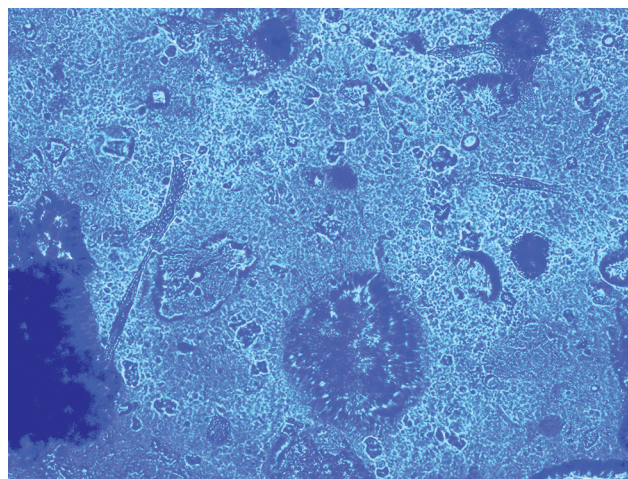


б

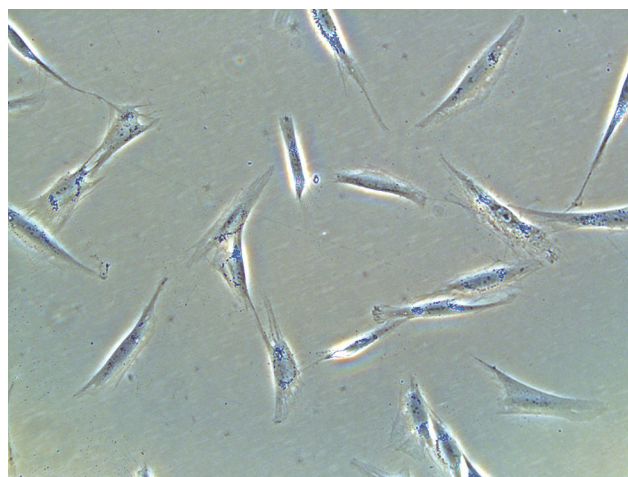
Рис. 3. Поверхность коллагенового слоя с деминерализованным костным матриксом после 24 ч контакта со средой культивирования клеток: а – ув. 750; б – ув. 1500

Таким образом, данные, полученные при изучении структуры поверхности разработанного материала, показали, что он представляется перспективным в качестве базового модуля для клеточно-тканевой системы и последующего создания на его основе тканевого эквивалента (рис. 3). При проведении исследования *in vitro* по оценке жизнеспособности фибробластов в условиях культивирования на пленках из разработанного коллагенсодержащего материала (тестирование на цитотоксичность и адгезивную способность)

установлено, что он не является токсичным для культуры дермальных фибробластов человека: не наблюдалась выраженная гибель клеток на приготовленных из него подложках; отмечались рост культуры в течение всего времени эксперимента и отсутствие клеточного дебриса в среде. Наблюдалось распластывание клеток по поверхности пленок с формированием характерного рисунка монослоя, что указывало на наличие адгезии клеток, их активный рост и пролиферацию на поверхности исследуемого материала. Через 24 ч после пересева отмечали распластывание единичных клеток как на поверхности коллагенсодержащей пленки-подложки (рис. 4, а), так и на культуральном пластике под пленкой (рис. 4, б).



а



б

Рис. 4. Фибробласты: а – на исследуемом коллагенсодержащем носителе, ув. 200, окраска азур-эозином, 24 ч культивирования. Видны включения деминерализованного костного матрикса и единичные фибробласты; б – на поверхности культурального пластика после удаления исследуемого коллагенсодержащего носителя, 24 ч культивирования, ув. 100, фазовый контраст

Через 48 ч после пересева на поверхности пленки наблюдался рост клеток разной конфлюентности: от частой сеточки до монослоя. Фи-

бробласты имели треугольную и веретеновидную форму, с выраженными отростками, четкими ядрами (рис. 5).

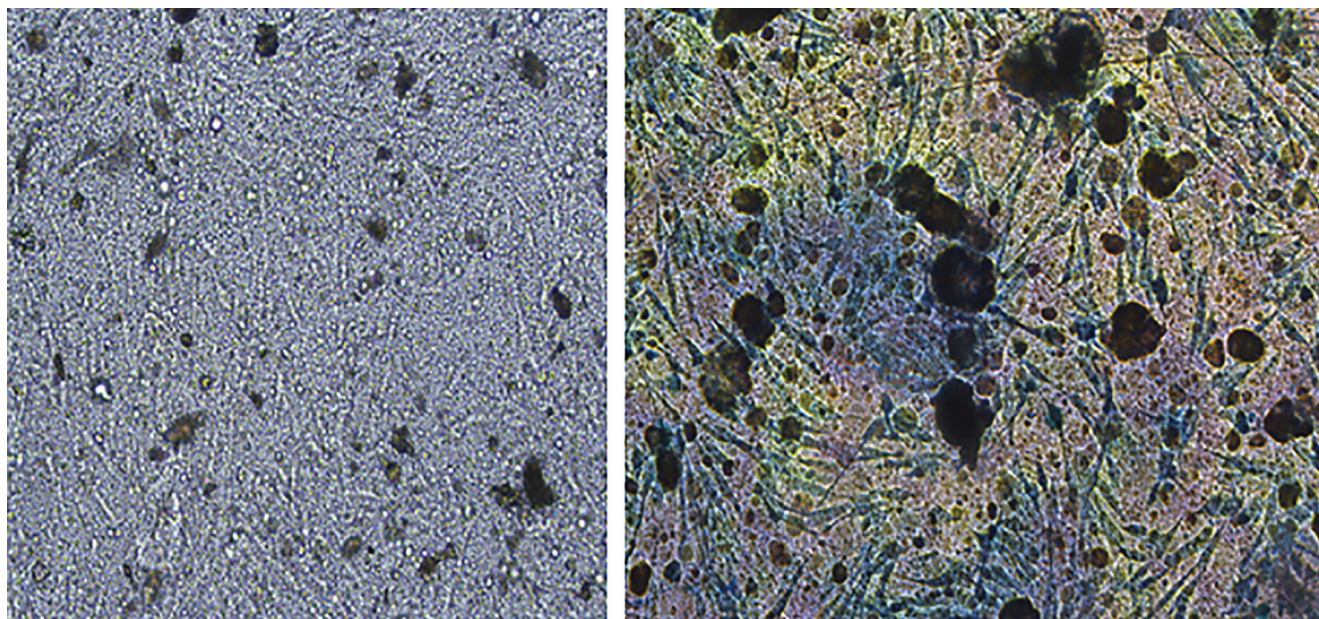


Рис. 5. Фибробласты на исследуемом коллагенсодержащем носителе, ув. 100: слева – нативный препарат, справа – окраска по Романовскому, 2-е сут культивирования. Видны включения деминерализованного костного матрикса

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подтверждено экспериментально, что физические характеристики разработанного материала соответствуют требованиям, предъявляемым к материалу для культивирования клеток. Кроме того показано, что материал не является токсичным для культуры дермальных фибробластов человека, что позволяет сделать вывод о его пригодности для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса и проведения экспериментальных исследований *in vivo*. Исходя из полученных результатов, представляется целесообразным дальнейшее совершенствование коллагенсодержащего комплекса и различных способов его применения для лечения ран кожи и мягких тканей, а также продолжение исследований, направленных на оценку его эффективности в эксперименте и клинике.

## 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования разработанных материалов были выполнены в Центре коллективного пользования «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» ННГУ им Н.И. Лобачевского г. Нижнего Новгорода. Авторы выражают глубокую признательность и благодарность директору Центра, д-ру хим. наук, профессору Е.В. Сулейманову за предоставленный доступ к оборудованию и возможность проведения соответствующих исследований и научному сотруднику Центра, канд. физ.-мат. наук А.В. Борякову за проведенные исследования. За поддержку и бесценные консультации при подготовке статьи авторы выражают благодарность П.Е. Анфимову.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев М.П. Коллагеновые нити, волокнистые и пленочные материалы. Санкт-Петербург: СПГУТД, 2004: 397.
2. Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase // *Wound Repair. Regen.* 2014; 22 (1): 14–22.
3. Han S.K., Yoon T.H., Lee D.G., Lee M.A., Kim W.K. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate

- wound healing in vitro // *Ann. Plast. Surg.* 2005; 55 (4): 414–419.
4. Liu P., Deng Z., Han S., Liu T., Wen N., Lu W., Geng X., Huang S., Jin Y. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds // *Artif. Organs.* 2008; 32 (12): 925–931. doi:10.1111/j.1525-1594.2008.00654.x
  5. Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.J., Coulomb B., Desmouliere A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. // *Pathologie Biologie.* 2014; 62 (2): 108–117. doi: 10.1016/j.patbio.2014.01.002. Epub 2014 Mar 21. Review. PMID: 24661975
  6. Анфимов П.Е., Краснова Н.С. Способ получения коллагена из биологического материала. Патент РФ 2322249. 20.04.2008.
  7. Денисов В.М., Бугров С.Н., Анфимов П.Е. Способ получения нейтрального коллагена из биологического материала. Патент РФ 2456810. 27.07.2012.
  8. Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н., Сидорова Т.И., Стручков А.А. Клеточно-тканевые комплексы для восстановления дефектов кожного покрова // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016; 4 (4): 703–706.
  9. Денисов В.М., Анфимов П.Е., Краснова Н.С., Куприянов В.А., Стручков А.А. Пленочное покрытие для ран. Патент РФ 2136318. 10.09.1999.
  10. Грязнухин Э.Г., Савельев В.И., Анисимова Л.О. Лечение ран под биологическим струпом из размельченной деминерализованной костной ткани // *Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов.* М., 1998: 60–62.
  11. Мовсарова З.М. Лечение ран с использованием размельченной деминерализованной костной ткани: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1998: 21 с.
  12. Greenholgh D. Role of growth factors in wound healing // *J. Trauma.* 1996; 41 (1): 159–167.
  13. Стручков А.А., Анфимов П.Е., Кулакова К.В., Бугров С.Н. Применение раневого покрытия «Биотекст» для местного лечения ожогов // *Вопросы травматологии и ортопедии.* 2012; 2: 16–17.
  14. Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Стручков А.А. Результаты применения разрабатываемых биологически активных материалов на основе коллагена для замещения тканевых дефектов в эксперименте // *Технологии живых систем.* 2013; 10 (8): 59–64.

Поступила в редакцию 05.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Кулакова Ксения Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотрудник группы консервации тканей, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, г. Нижний Новгород.

Алейник Диана Яковлевна, ст. науч. сотрудник, руководитель группы биотехнологий, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, г. Нижний Новгород.

Чарыкова Ирина Николаевна, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биотехнологий, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, г. Нижний Новгород.

(✉) Кулакова Ксения Владимировна, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

УДК 591.477.35:612.014.44:599.323.4

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-75–82

For citation: Kulakova K.V., Aleynik D.Ya., Charykova I.N. Joint use of developed collagen-containing complexes and cell cultures in creating new tissue equivalents. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (5): 75–82

## Joint use of developed collagen-containing complexes and cell cultures in creating new tissue equivalents

Kulakova K.V., Aleynik D.Ya., Charykova I.N.

Privolzhsky Federal Research Medical Centre

18, Verhne-Voljskaya Naberejnaya, Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation

### ABSTRACT

The purpose of the study is to assess the possibility of applying the integrated module as the basis of a cell-tissue equivalent for treatment of wounds of skin and soft tissues. In the frame of the set task the following problems were being solved: research of the spatial structure and architectonics of the surface of the developed

base collagen-containing materials and their biocompatibility with cell cultures.

**Materials and methods.** The study of a material which is a two-layer complex film, consisting of collagen and polysaccharide components was carried out. The collagen was separated from the dermis and was then impregnated with particulate demineralized bone matrix (DCM) according to the original methodology. For the purposes of the study the dehydrated material was created in the form of a film. Electron microscopic examination of surfaces was performed on scanning electron microscope JEOL JSM-IT300LV in high vacuum and at low values of probe current ( $< 0,1$  nA). Studies to assess the viability of the cells cultivated on films of collagen material (tested for cytotoxicity and the adhesive capacity) were performed in vitro using strains of diploid human fibroblasts 4–6 passage. The culture condition was visually assessed using an inverted Leica microscope DM IL (Carl Zeiss, Austria), equipped with a computerized program of control of culture growth (Leica IM 1000).

**Results.** The data obtained in the study of the surface structure of the developed complex module showed that it seems to be promising as a basic component of the cellular-tissue system with its large number of structural formations for fixation of the cells and a well-organized barrier layer capable of vapor - permeability. Experiments in vitro confirmed the absence of toxicity of the material being studied in relation to the culture of dermal human fibroblasts, suggesting the possibility of creation on its basis of cell-tissue complex and further experimental studies in vivo.

**Conclusion.** Thus it was experimentally confirmed that the physical characteristics of the developed integrated module satisfy the requirements for the materials for cultivation of cells. The absence of cytotoxicity on the model of a culture of dermal human fibroblasts allows to make a conclusion about a possibility of its use as the basis of cell-tissue equivalent. Preliminary results indicate the advisability of further experiments in vivo aimed at improving complex collagen-containing materials, the development of different ways of their application and clinical evaluation of the effectiveness in the treatment of wounds of various genesis.

**Key words:** collagen, regeneration, tissue engineering, cell culture, fibroblasts.

## REFERENCES

1. Vasiliev M.P. Kollagenovye niti, voloknistye i plenochnye materialy [Collagen filaments, fibrous and film materials]. SPGUTD Publ., 2010: 397 (in Russian).
2. Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase // *Wound Repair. Regen.* 2014; 22 (1): 14–22.
3. Han S.K., Yoon T.H., Lee D.G., Lee M.A., Kim W.K. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro // *Ann. Plast. Surg.* 2005; 55 (4): 414–419.
4. Liu P., Deng Z., Han S., Liu T., Wen N., Lu W., Geng X., Huang S., Jin Y. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds // *Artif. Organs.* 2008; 32 (12): 925–931. doi:10.1111/j.1525-1594.2008.00654.x
5. Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.J., Coulomb B., Desmouliere A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. // *Pathologie Biologie.* 2014; 62 (2): 108–117. doi: 10.1016/j.patbio.2014.01.002. Epub 2014 Mar 21. Review. PMID: 24661975
6. Anfimov P.E., Krasnova N.S. Sposob polucheniya kollagena iz biologicheskogo materiala [A method for producing collagen from biological material]. Patent RF – Russian patent 2322249, 2008 (in Russian).
7. Denisov V.M., Bugrov S.N., Anfimov P.E. Sposob polucheniya neitral'nogo kollagena iz biologicheskogo materiala [A method for producing collagen from neutral biological material]. Patent RF – Russian patent 2456810, 2012 (in Russian).
8. Kulakova K.V., Bugrov S.N., Aleynik D.Ya., Charykova I.N., Sidorova T.I., Struchkov A.A. Kletочно-тканевые комплексы для восстановления дефектов кожного покрова [Cellular tissue complexes to restore skin defects] // *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy – International Journal of Applied and Basic Research.* 2016; 4: 703–706 (in Russian).
9. Denisov V.M., Anfimov P.E., Krasnova N.S., Kupriyanov V.A., Struchkov A.A. Plyonochnoe pokrytie dlya ran [Pods Film coating for wounds]. Patent RF – Russian patent 2136318, 1999 (in Russian).
10. Gryaznuhin E.H.G., Savel'ev V.I., Anisimova L.O. Lechenie ran pod biologicheskim strupom iz razmel'chyonnoj demineralizovannoj kostnoj tkani [Wound healing under the scab of biological razmelchënnoy demineralized bone] // *Sovremennye podbody k razrabotke effektivnykh perevyazochnykh sredstv, shovnykh materialov i polimernykh implantatov – Modern approaches to the development of effective wound dressings, sutures and polymeric implants.* 1998: 60–62 (in Russian).
11. Movsarova Z.M. Lechenie ran s ispol'zovaniem razmel'chyonnoj demineralizovannoj kostnoj tkani

- [Treatment of wounds with crushed demineralized bone]. Medical Phd thesis abstract. SPb., 1998: 21 (in Russian).
12. Greenholgh D. Role of growth factors in wound healing // *J. Trauma*. 1996; 41 (1): 159–167 (in Russian).
13. Struchkov A.A., Anfimov P.E., Kulakova K.V., Bugrov S.N. Primenenie ranevogo pokrytiya «Biotekst» dlya mestnogo lecheniya ozhogov [The use of wound coverage “Biotekst” for the topical treatment of burns] // *Voprosy traumatologii i ortopedii – Questions of Traumatology and Orthopedics*. 2012; 2: 16–17 (in Russian).
14. Kulakova K.V., Bugrov S.N., Aleynik D.Ya., Struchkov A.A. Rezul'taty primeneniya razrabatyvaemykh biologicheski aktivnykh materialov na osnove kollagena dlya zameshcheniya tkanevykh defektov v ehksperimente [The results of application of developed bioactive materials based on collagen to fill tissue defects in experiment] // *Tekhnologii zhivyykh sistem – Living Systems Technologies*. 2013; 10 (8): 59–64 (in Russian).

Received September 05.2016

Accepted December 01.2016

**Kulakova Ksenia V.**, PhD, Researcher, Group of Conservation Tissue, Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

**Aleynik Diana Y.**, PhD, Senior Scientific Researcher, Chief of the Group of Biotechnology, Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Russian Federation, Nizhny Novgorod.

**Charykova Irina N.**, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Group of Biotechnology, Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

(✉) **Kulakova Ksenia V.**, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

УДК 616.89-072.8: 575.174.015.3(=161.1)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-83-96

Для цитирования: Марусин А.В., Корнетов А.Н., Сваровская М.Г., Вагайцева К.В., Павленюк Е.С., Степанов В.А. Ассоциация генов подверженности к алкоголизму, шизофрении и болезни Альцгеймера с психодиагностическими признаками в популяции русских. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 83–96

## Ассоциация генов подверженности к алкоголизму, шизофрении и болезни Альцгеймера с психодиагностическими признаками в популяции русских

Марусин А.В.<sup>1</sup>, Корнетов А.Н.<sup>2</sup>, Сваровская М.Г.<sup>1</sup>,  
Вагайцева К.В.<sup>1,3</sup>, Павленюк Е.С.<sup>2</sup>, Степанов В.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики (НИИМГ), Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)  
Россия, 634050, г. Томск, Набережная р. Ушайки, 10

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель** — выявить генетические факторы, связанные с личностными признаками, по панели 12 полиморфных маркеров, ассоциированных с деменцией при болезни Альцгеймера, шизофренией и алкоголизмом.

**Материал и методы.** Проанализирована взаимосвязь количественных признаков личности, темперамента и характера, определяемых по психодиагностическим методикам Кеттелла (16-факторный личностный опросник, 16PF), акцентуации характера и темперамента К. Леонгарда — Г. Шмишека (тШ), тестам тревожности Спилбергера — Ханина и интеллекта Айзенка (IQ), с полиморфными вариантами 12 генов, вовлеченных в развитие тяжелых психических расстройств — алкоголизм, шизофрению и болезнь Альцгеймера. Образцы ДНК от 150 студентов были прогенотипированы методом ПЦР-ПДРФ. Полученные данные обработаны непараметрическими методами статистики.

**Результаты.** Установлены неслучайные межаллельные ассоциации парных сочетаний полиморфных вариантов *GABRA2–PICALM*, *PICALM–ADCY3*, *CLU–CBX7* и *CLU–ADCY3*, вероятно, свидетельствующие об адаптивном отборе, влияющим на поддержание поведенческого гомеостаза в популяции. Обнаружен ряд статистически значимых ассоциаций генетической изменчивости: *CLU* с самодисциплиной (Q3, 16PF) и экзальтированностью (тШ), *PICALM* с напряженностью (Q4, 16PF) и неуравновешенностью (тШ), *DISC1* с подозрительностью (L, 16PF), экзальтированностью и циклотимией (тШ), *ZN-F804A* с неуравновешенностью (тШ), *SLC6A4* с интеллектуальностью (B, 16PF), *ADCY3* с экстраверсией и самостоятельностью (F2 и Q2, 16PF), *MIR9-2* с эмоциональной устойчивостью, беспечностью, смелостью в социальных контактах, экстраверсией (C, F, H, F2 по тесту 16PF), гипертимией и дистимией (тШ), с личной тревожностью по тесту Спилбергера — Ханина, *CBX7* с общительностью и подозрительностью (A, L, 16PF), *SLC6A4* с интеллектуальностью (B, 16PF), *SLC6A3* с IQ по тесту Айзенка. Для полиморфизма *rs13219354*, *GAB2* и *GABRA2* не выявлено взаимосвязи с признаками, характеризующими интеллект, темперамент и характер.

✉ Марусин Андрей Викторович, e-mail: andrey.marusin@medgenetics.ru

**Заключение.** Полученные результаты, вероятно, свидетельствуют об общей генетической компоненте психических и неврологических расстройств с вариабельностью когнитивных и личностных признаков.

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, подверженность, алкоголизм, шизофрения, болезнь Альцгеймера, количественные признаки, характер, темперамент, личность.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема наследуемых вариаций поведения как компоненты психической конституции индивида современна в генетике поведения и в психиатрии. В этой связи актуальным является изучение биологических и эволюционных аспектов формирования человеческой психики. Ранние исследования были сфокусированы на установлении относительного вклада совокупности генов в развитие личностных и психических особенностей. Несмотря на то что эти работы выявили веские доказательства значительного влияния генов и среды на формирование здоровой личности, а также психических и поведенческих расстройств, исследование наследуемости поведения является чрезвычайно сложным и ограничивается дискуссионностью в объяснении причинно-следственных механизмов. Современное изучение этого явления ориентировано на соотносительный вклад ковариации диагнозов психических и поведенческих расстройств, что позволяет анализировать их этиологические взаимосвязи с учетом преморбидной личностной структуры. Эти разработки, вероятно, приведут к существенным изменениям представлений о природе взаимосвязи между генами и средой [1].

Наследуемость личностных особенностей варьирует и составляет 40–60% [2]. Очевидно, что психические признаки каким-либо образом взаимосвязаны с предрасположенностью к формированию таких психических расстройств, как деменция при болезни Альцгеймера (БА), алкоголизм и шизофрения. В настоящей работе сделана попытка оценить ассоциацию 12 полиморфных вариантов генов, участвующих в паттерне подверженности к трем вышеупомянутым заболеваниям с личностными особенностями.

Большинство выбранных локусов, по опубликованным источникам, демонстрирует ассоциации с хроническими нейродегенеративными заболеваниями. Литературные данные об исследованных полиморфных вариантах представлены в табл. 1. Для гена *CBX7* ранее не было показано связи с тяжелыми психическими расстройствами. Тем не менее, так как продукт этого гена участвует в поддержании транскрипционно-репрессивного состояния генов (см. табл. 1), он был включен в работу. Гипотетически полиморфные варианты гена *CBX7* могут ассоциировать с подверженностью к тяжелым поведенческим расстройствам.

Т а б л и ц а 1

| Описание полиморфных вариантов, включенных в исследование |                          |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| №                                                         | Ген                      | Белок                                                   | Функция                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Некоторые данные об ассоциациях                                                              |
| 1                                                         | <i>GABRA2</i> (4p12)     | А-рецептор альфа-2-гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК)   | ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в мозге млекопитающих, действует на ГАМК-альфа рецепторы, которые являются каналами ионов хлора, управляемыми лигандами. Опосредует ингибирование в нейронах путем связывания с ГАМК/бензодиазепиновым рецептором и интегральным открытием каналов ионов хлора | Алкогольная зависимость, злоупотребление лекарствами, курение, употребление марихуаны [3, 4] |
| 2                                                         | <i>PICALM</i> (11q14)    | Фосфатидил-инозитол связывающий клатрин сборочный белок | Использует клатрин и белковый комплекс адаптер 2-го типа (AP2) на клеточных мембранах для сборки клатрин-везикул. Участвует в AP2-зависимом опосредованном клатрином (внутриклеточный белок, основной компонент оболочки окаймленных пузырьков) эндоцитозе, при нервно-мышечном соединении                      | БА [5]                                                                                       |
| 3                                                         | <i>CLU/APOJ</i> (8p21.1) | Ингибитор комплемента цитолиза (аполипопротеин J)       | Является предшественником кластерина, функции белка до сих пор не ясны. Известно, что транскрипционные варианты кодируют различные изоформы белка, вовлеченные в апоптоз, прогрессию клеточных опухолей, нейродегенеративные заболевания                                                                        | БА [6]                                                                                       |
| 4                                                         | <i>ZNF804A</i> (2q32.1)  | Белок цинковых пальцев 804A                             | Функции белка не ясны. Наличие классического Cys2His2 цинк-пальцевого домена позволяет предположить, что белок, кодируемый геном <i>ZNF804A</i> , является фактором транскрипции – регулирует экспрессию генов                                                                                                  | Шизофрения [7]                                                                               |

О к о н ч а н и е т а б л. 1

| №  | Ген                                                       | Белок                                                                        | Функция                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Некоторые данные об ассоциациях                                                                                                                                                                             |
|----|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | <i>CBX7</i> (22q13.1)                                     | Хромобоксгомолог 7-го белка                                                  | Участвует в поддержании транскрипционно-репрессивного состояния генов. Модифицирует хроматин, наследуемо изменяя его, по способности к экспрессии. Регулятор клеточного цикла                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Участвует в канцерогенезе [8]                                                                                                                                                                               |
| 6  | <i>DISC1</i> (1q42.2)                                     | 1-й белок нарушается при шизофрении                                          | Белок вовлечен во многие процессы нейрогенеза у эмбрионов и взрослых. Участвует в росте нейритов (аксонов) и развитии коры головного мозга при участии других генов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Шизофрения, биполярное расстройство, глубокая депрессия [9–11]                                                                                                                                              |
| 7  | <i>GAB2</i> (11q14.1)                                     | 2-й белок, ассоциированный со 2-м связывающим белком рецептора фактора роста | Член GRB2-ассоциированных связывающих белков (GAB) – адаптерный белок, основной активатор фосфатидил-инозитол-3-киназы. Воздействует на определенные рецепторы, включающие цитокины, антигены, гормоны, клеточный матрикс и рецепторы факторов роста, регулируя многочисленные сигнальные пути, регулирует дифференцировку остеокластов посредством передачи сигналов TNFRSF11A/RANK, а также вовлечен в дифференцировку клеток и гематопоз                                                                                                                                                                                                                                | БА [12]                                                                                                                                                                                                     |
| 8  | rs13219354 ~30 тыс. п.н. выше гена <i>PRSS16</i> (6p22.1) | Тимус-специфичная сериновая протеаза                                         | Полиморфизм rs13219354 локализован в межгенной области рядом с геном <i>PRSS16</i> . Ген находится в большом кластере генов гистонов, рядом с регионом главного комплекса гистосовместимости (МНС) 1-го класса                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Шизофрения, аутоиммунные заболевания, инсулин-зависимый сахарный диабет [13–15]                                                                                                                             |
| 9  | <i>ADCY3</i> (2p23.3)                                     | Аденилатциклаза 3-го типа                                                    | Аденилатциклазы (AC) представляют собой группу ферментов (10 форм), которые превращают аденозин-5'-трифосфат (АТФ) в 3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) и пирофосфат. Регулируются посттрансляционной модификацией, фосфорилированием, G-белками, форсколином, пирофосфатом, кальцием и кальмодулином. Благодаря функции в биосинтезе цАМФ, принимает участие в передаче каскада сигналов, вызванных рецепторами обоняния. Требуется для восприятия пахучих веществ, обеспечения нормальной подвижности сперматозоидов и мужской фертильности. Играет определенную роль в регуляции уровня инсулина и накоплении жира в организме в ответ на диету с высоким содержанием жира | Алкогольная зависимость, склонность к ожирению и диабету 2-го типа, глубокая депрессия [16–18]                                                                                                              |
| 10 | <i>MIR9-2</i> (5q14.3)                                    | МикроРНК 9-2                                                                 | Кодирует микроРНК (miRNA 20–24 nt), участвуют в посттранскрипционной регуляции генной экспрессии у многоклеточных организмов на уровне стабилизации и трансляции матричных РНК                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Лимфобластная лейкемия, шизофрения [19, 20]                                                                                                                                                                 |
| 11 | <i>SLC6A4</i> или <i>5-HTT</i> (17q11.2)                  | 4-й член 6-го семейства растворимых переносчиков (переносчик серотонина)     | Кодирует встроенный в мембрану белок, транспортирующий нейромедиатор серотонин (5-НТ) из синаптической щели в пресинаптический нейрон, тем самым прекращает его действие и позволяет использовать 5-НТ повторно с помощью натрий-зависимого механизма. Этот белок является мишенью психомоторных стимуляторов, таких как амфетамины и кокаин, а также член семейства нейромедиаторов симпортеров натрия. Полиморфизм длины tandemных повторов (VNTR) в промоторной области этого гена (5-НТ-TLPR) влияет на скорость обратного захвата серотонина                                                                                                                          | Алкоголизм, глубокая депрессия, аутизм, неврозы, агрессивное поведение у детей [21–25]                                                                                                                      |
| 12 | <i>SLC6A3</i> или <i>DAT1</i> (5p15.33)                   | 3-й член 6-го семейства растворимых переносчиков (переносчик дофамина)       | Ген кодирует переносчик дофамина, который является членом семейства Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> -зависимых переносчиков нейротрансмиттеров. 3'-нетранслируемый регион содержит tandemные повторы длиной 40 п.н., которые относятся к семейству VNTR (полиморфизм длины tandemных повторов). Они могут быть представлены в количестве 3–11 копий                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Алкоголизм, идиопатическая эпилепсия, синдром дефицита внимания и гиперактивности, зависимость от алкоголя и кокаина, подверженность к болезни Паркинсона, протективность к никотиновой зависимости [26–31] |

П р и м е ч а н и е. Во втором столбце в скобках приведена хромосомная локализация гена. Данные о названиях и функции генов взяты из открытой электронной базы URL=<http://www.genecards.org>.

Исследование личностных характеристик проводилось с использованием четырех психодиагностических опросников, оценивающих индивидуально-психологические качества, характер, тревожность и интеллект.

Целью исследования являлось выявление генетических факторов, связанных с личностными признаками, по панели 12 полиморфных маркеров, ассоциированных с деменцией при болезни Альцгеймера, шизофренией и алкоголизмом.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Образцы биологического материала (крови) были получены от студентов 4-го курса Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ, г. Томск). Всего в исследовании принял участие 161 человек (122 женщины и 39 мужчин) в возрасте 20–29 лет. Более 85% выборки составили русские, представители остальных национальностей (буряты, башкиры, татары, якуты, украинцы, белорусы, хакасы, алтайцы) присутствовали в единичных случаях. Все участники подписали информированное согласие. ДНК выделена из периферической венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом [32]. Участники обследованы при помощи психодиагностических инструментов: «Шестнадцатифакторного личностного опросника» (16PF) [33, 34], «Характерологического опросника Х. Шмишека» [35], опросника Ч.Д. Спилберга, адаптированного Л. Ханиным [36] и «Теста интеллекта Г. Айзенка (Теста IQ)».

Опросник (16PF) является одним из самых распространенных опросников для оценки индивидуально-психологических качеств как у нас в стране, так и за рубежом. «Характерологический опросник К. Леонгарда – Х. Шмишека» используют для выявления типа акцентуации, то есть определенного направления характера. «Тест интеллекта Г. Айзенка (Тест IQ)» определяет коэффициент интеллекта (IQ). Тест самооценки человеком уровня своей тревожности в данный момент (ситуативная (реактивная) тревожность) и личностной тревожности (как устойчивой характеристики человека) разработан Ч.Д. Спилбергом (США) и адаптирован Ю.Л. Ханиным.

Обработка первичных значений тестов была проведена специалистами-психологами на факультете клинической психологии, психотерапии и социальной работы СибГМУ.

**Генотипирование.** Структура праймеров, номенклатура аллелей, методы детекции полиморфных маркеров представлены в табл. 2. Генотипирование SNP проводили методами ПЦР-ПДРФ.

Т а б л и ц а 2

| Структура праймеров, методы генотипирования, номенклатура аллелей локусов, включенных в исследование |                     |                                                                                                                        |                                         |                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Ген                                                                                                  | Полиморфный вариант | Последовательность праймеров (5'→3')                                                                                   | Метод детекции и температура отжига, °C | Номенклатура аллелей (размер фрагментов, п.н.)                         |
| <i>DISC1</i>                                                                                         | rs3737597           | AGAGGGCCACGATCACCT<br>TGTGCACCTGTAGGAACGTG                                                                             | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>XcmI</i> ), 57         | Предковый *C/+ <i>XcmI</i> (443 + 210),<br>*T/- <i>XcmI</i> (653)      |
| <i>GAB2</i>                                                                                          | rs10793294          | GATGTGTGAATTTGGGACTAGACT<br>TCTTAACCCGGTCACTGCTT                                                                       | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>BstF5 I</i> ), 57      | *A/+ <i>BstF5 I</i> (304 + 79),<br>предковый *C/- <i>BstF5 I</i> (383) |
| <i>GABRA2</i>                                                                                        | rs279845            | TGCCATGTTTGTACAGGTT<br>CCAAGTTTGTAGTAGGCATGAA                                                                          | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>Hinf I</i> ), 57       | *T/- <i>Hinf I</i> (574),<br>предковый *A/+ <i>Hinf I</i> (402 + 72)   |
| <i>PICALM</i>                                                                                        | rs3851179           | CTCCTTCAACAGCTGCTCCT<br>TGCTACCCATGTCATCCTCA                                                                           | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>Ssp I</i> ), 57        | предковый *G/- <i>Ssp I</i> (480),<br>*A/+ <i>Ssp I</i> (392 + 88)     |
| <i>CLU</i>                                                                                           | rs11136000          | CTTTGTAATGATGTACCATCTACCC<br>AGGCTGCAGACTCCCTGAAT                                                                      | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>Acs I</i> ), 57        | *C/- <i>Acs I</i> (645),<br>предковый *T/+ <i>Acs I</i> (539 + 106)    |
| <i>SLC6A4</i>                                                                                        | HTTLPR              | CCCTCCTGGAAAGGACACTT<br>GTAGGGTGCAAGGAGAATGC                                                                           | ПЦР/VNTR,<br>60                         | предковый *L (571), *S (528)                                           |
| <i>ZNF804A</i>                                                                                       | rs1344706           | CATTCAAGTTCTGTAACCTTTGA<br>TGCAGGCACATGAGTAGTGA                                                                        | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>BstKTI</i> ), 57       | *G/- <i>BstKTI</i> (263),<br>предковый *T/+ <i>BstKTI</i> (141 + 62)   |
| <i>CBX7</i>                                                                                          | rs710190            | GGAGTTCAGCTCTCCCTGAG<br>ATGTTTTGGCCCATGACTTT                                                                           | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>PspN4 I</i> ), 58      | Предковый *C/+ <i>PspN4 I</i> (186 + 79),<br>*T/- <i>PspN4 I</i> (265) |
| <i>MIR9-2</i>                                                                                        | rs2304608           | f1: TCTTGAGAGGGGTTGTTGCAG<br>r4: TTGCCTGCTAGCTCTAAGTCCTCA<br>f2: TGTAGACTTGGGCAGTTCCTTTGG<br>r3: TTTGAGAGGGGAGGTGCCTCA | ПЦР, 65 (5 ц.), 63<br>(30 ц.)           | «Внешний» фрагмент (347)<br>*G (180),<br>предковый *T (210)            |
| Межгенная<br>область около<br><i>PRSS16</i>                                                          | rs13219354          | AAGGGACATCGTCTGGAGA<br>ATCCCTTTCAAGTCCGGTT                                                                             | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>Fat I</i> ), 57        | *C/- <i>Fat I</i> (227),<br>предковый *T/+ <i>Fat I</i> (114+113)      |
| <i>ADCY3</i>                                                                                         | rs17799872          | AGGTTGTCCTTGTGTTGGATCCCTCAA<br>TAGGTGTAGGAGCCCTGGTCCCAA                                                                | ПЦР/ПДРФ<br>( <i>AluI</i> ), 57         | *A/- <i>Alu I</i> (174),<br>предковый *G/+ <i>Alu I</i> (25 + 149)     |

| Ген           | Полиморфный вариант | Последовательность праймеров (5'→3')             | Метод детекции и температура отжига, °C | Номенклатура аллелей (размер фрагментов, п.н.)                                            |
|---------------|---------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>SLC6A3</i> | 40 bp VNTR          | GTTGTAGGGAACGGCCTGAG<br>CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG | ПЦР/VNTR,<br>62                         | Предковый *3 (207),<br>производные аллели<br>*7, *8, *9, *10, *11 и *12 (567)<br>повторов |

П р и м е ч а н и е. Для полиморфизма *MIR9-2* проводилась аллель-специфичная ПЦР. Полуожирным и подчеркиванием выделены нуклеотиды, специфичные для разных аллелей (праймеры f1, f4 амплифицируют «внешний» фрагмент (контроль амплификации); с помощью праймера, специфичного аллелю G (f2), образуется фрагмент размером 180 пар нуклеотидов (п.н.), а с помощью праймера, специфичного аллелю T (f3), образуется фрагмент размером 210 п.н.), предковый аллель определен в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, США) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

Праймеры и эндонуклеазы рестрикции поставлены ООО «СибЭнзим-Нск» (г. Новосибирск). Структура праймеров и условия ПЦР подобраны в лаборатории эволюционной геномики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (руководитель д-р биол. наук, профессор Е.И. Рогаев).

**Статистические методы.** Соответствие распределения генотипов равновесию Харди – Вайнберга (РХВ), наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготность проводили общепринятыми методами популяционной биометрии [37]. Для анализа связи изученных полиморфных вариантов с количественными признаками использован непараметрический критерий Манна – Уитни (U) и ранговый тест Краскела – Уоллиса (H). Принят 5%-й уровень статистической значимости  $p$ . Все расчеты выполнены в программе Statistica 5.0. Значения признаков приведены в виде медианы  $Me$  и квартилей распределения  $Q_1$ – $Q_4$ .

**Структура исследования.** Анализ полученных данных проводили по следующей схеме:

- описание генетической изменчивости исследуемой группы (проверка распределения генотипов на соответствие равновесию РХВ, гетерозиготности и гаметического неравновесия между изучаемыми полиморфными маркерами);
- анализ ассоциаций генетического полиморфизма с психическими признаками.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе межполовых отличий по изученным количественным признакам были выявлены статистически значимые отличия по: факторам В (интеллектуальность;  $p = 0,016$ ), С (эмоциональная устойчивость;  $p = 0,0005$ ), Е (доминантность;  $p = 0,002$ ), G (моральная нормативность;  $p = 0,036$ ) опросника 16PF и эмотивной акцентуации характера опросника Х. Шмишека ( $p = 4 \times 10^{-6}$ ). При этом значения признаков в среднем были выше в подгруппе женщин по сравнению с мужчинами. Неожданной явилась повышенная доминантность (фактор Е, примерно на 1 балл) у девушек и наличие различий по фактору интеллектуальности (В) опросника 16PF, тогда как по тесту IQ статистически значимых половых отличий не обнаружено ( $p = 0,783$ ).

Различия по полу, близкие к статистически значимым ( $5 < p < 10$ )%, наблюдались по факторам А (общительность;  $p = 0,063$ ), F1 (тревожность;  $p = 0,087$ ), F3 (эмоциональная лабильность;  $p = 0,059$ ), F4 (доминантность;  $p = 0,057$ ) опросника 16PF, дистимной и экзальтированной акцентуациям опросника Х. Шмишека.

Частоты и численности генотипов, соответствие их распределения равновесию РХВ и ожидаемая гетерозиготность представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

| Частоты и численности генотипов (%), соответствие их распределения равновесию Харди – Вайнберга и показатели генетической изменчивости изученных полиморфизмов |             |            |            |       |       |          |                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|------------|-------|-------|----------|--------------------|-----|
| Ген (полиморфизм)                                                                                                                                              | Генотип, %  |            |            | f (1) | Hexp  | $\chi^2$ | $p$                | n   |
|                                                                                                                                                                | 11          | 12         | 22         |       |       |          |                    |     |
| <i>GABRA2</i> (T/A)                                                                                                                                            | 55 (39,01)  | 60 (42,55) | 26 (42,27) | 60,28 | 47,78 | 1,75     | 0,184              | 141 |
| <i>PICALM</i> (G/A)                                                                                                                                            | 74 (48,68)  | 62 (40,78) | 16 (10,54) | 69,08 | 42,72 | 0,31     | 0,578              | 152 |
| <i>CLU</i> (C/T)                                                                                                                                               | 65 (42,76)  | 72 (47,37) | 15 (9,87)  | 66,45 | 44,59 | 0,59     | 0,442              | 152 |
| <i>ZNF804A</i> (C/T)                                                                                                                                           | 78 (50,98)  | 58 (37,91) | 17 (11,11) | 69,93 | 42,05 | 1,49     | 0,222              | 153 |
| <i>CBX7</i> (T/C)                                                                                                                                              | 54 (35,29)  | 72 (47,06) | 27 (17,65) | 58,82 | 48,44 | 0,12     | 0,729              | 153 |
| <i>DISC1</i> (C/T)                                                                                                                                             | 143 (95,33) | 7 (4,67)   | 0 (0,00)   | 97,67 | 4,56  | 0,09     | 0,764              | 150 |
| <i>GAB2</i> (A/C)                                                                                                                                              | 80 (54,05)  | 55 (37,16) | 13 (8,79)  | 72,64 | 39,75 | 0,63     | 0,427              | 148 |
| <i>rs13219354</i> (T/C)                                                                                                                                        | 95 (65,07)  | 34 (23,29) | 17 (11,64) | 76,71 | 35,73 | 17,7     | $3 \times 10^{-5}$ | 146 |

О к о н ч а н и е т а б л . 3

| Ген (полиморфизм)     | Генотип, %  |            |            | f (1) | Hexp  | $\chi^2$ | p     | n   |
|-----------------------|-------------|------------|------------|-------|-------|----------|-------|-----|
|                       | 11          | 12         | 22         |       |       |          |       |     |
| <i>ADCY3</i> (G/A)    | 134 (88,16) | 17 (11,18) | 1 (0,66)   | 93,75 | 11,72 | 0,32     | 0,572 | 152 |
| <i>MIR9-2</i> (G/T)   | 145 (97,32) | 4 (2,68)   | 0 (0,00)   | 98,66 | 3,65  | 0,03     | 0,863 | 149 |
| <i>SLC6A4</i> (L/S)   | 56 (36,84)  | 69 (45,39) | 27 (17,77) | 59,54 | 48,18 | 0,51     | 0,475 | 152 |
| <i>SLC6A3</i> (10/9)* | 35 (64,81)  | 16 (29,63) | 3 (5,56)   | 82,69 | 32,44 | 0,41     | 0,522 | 54  |

\* в изученной выборке выявлены аллели только с 9 и 10 повторами.

П р и м е ч а н и е. f (1) – частота мажорного аллеля; Hexp – ожидаемая гетерозиготность; 1, 2 – мажорный и минорный аллели в генотипах;  $\chi^2$  – критерий хи-квадрат соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди – Вайнберга; n – объем выборки (здесь и в табл. 4, 5).

Отклонение от РХВ за счет недостатка гетерозигот выявлено только для полиморфизма rs13219354, расположенного в 30 тыс. пар нуклеотидов выше гена тимус-специфичной сериновой протеазы (*PRSS16*). Возможно, это объясняется случайными причинами, возникающими при формировании выборки либо отбором против гетерозигот.

Гаметическое неравновесие (неслучайная ассоциация аллелей) выявлена для четырех парных

сочетаний полиморфных маркеров: *GABRA2-PI-CALM*, *PICALM-ADCY3*, *CLU-CBX7* и *CLU-ADCY3*. Результаты анализа представлены в табл. 4. Для сочетания пары *PICALM-ADCY3* показана отрицательная корреляция между локусами, то есть мажорные и минорные аллели «отталкиваются» друг от друга и сочетания пар альтернативных аллелей (1\_2 и 2\_1) встречаются чаще, чем ожидается при их случайной комбинации.

Т а б л и ц а 4

| Гаметическое неравновесие полиморфизмов <i>GABRA2-PICALM</i> , <i>PICALM-ADCY3</i> , <i>CLU-CBX7</i> и <i>CLU-ADCY3</i> |                      |          |       |         |     |             |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|-------|---------|-----|-------------|-------|-------|-------|
| Ген                                                                                                                     | D, $M \pm m$         | $\chi^2$ | p     | p       | n   | Гаплотип, % |       |       |       |
|                                                                                                                         |                      |          |       |         |     | 1_1         | 1_2   | 2_1   | 2_2   |
| <i>GABRA2 - PICALM</i>                                                                                                  | +0,0386 $\pm$ 0,0194 | 4,07     | 0,044 | +0,1705 | 140 | 45,22       | 14,78 | 23,71 | 16,29 |
| <i>PICALM - ADCY3</i>                                                                                                   | -0,0193 $\pm$ 0,0062 | 4,53     | 0,033 | -0,1728 | 152 | 62,83       | 6,25  | 30,92 | 0,00  |
| <i>CLU - CBX7</i>                                                                                                       | +0,0414 $\pm$ 0,0190 | 4,81     | 0,028 | +0,1779 | 152 | 43,04       | 23,40 | 15,51 | 18,04 |
| <i>CLU - ADCY3</i>                                                                                                      | +0,0213 $\pm$ 0,0111 | 5,29     | 0,021 | +0,1865 | 152 | 64,43       | 2,02  | 29,32 | 4,23  |

П р и м е ч а н и е. D – мера гаметического неравновесия; p – достигнутый уровень значимости отличия D от нуля; p – коэффициент корреляции между локусами по частотам аллелей; 1, 2 – мажорный и минорный аллели в гаплотипах.

Для остальных трех пар сочетаний полиморфных вариантов наблюдается положительная межлокусная корреляция. Низкие значения коэффициента корреляции между локусами по частотам аллелей, возможно, отражают невысокое действие естественного отбора, направленного на поддержание такой гаметической интеграции. Вероятно, многообразие функций генов *GABRA2*, *PICALM*, *ADCY3*, *CLU* (см. табл. 1) обуславливает адаптивный отбор по этим маркерам за счет изменения частот гаплотипов, что позволяет выявить статистически значимые значения меры гаметического неравновесия.

Очевидно, что индивидуальные особенности сложных психических реакций формируются в течение всей жизни индивида, в непрерывном взаимодействии генотипа и внешней среды. Генотипическая обусловленность черт личности имеет общую природу с генетической подверженностью к ряду хронических нейродегенеративных заболеваний и аддиктивных расстройств, что про-

явилось в неслучайной ассоциации генотипов четырех пар генов подверженности к вышеупомянутым поведенческим расстройствам в изученной выборке.

О возможности общей природы генетического континуума подверженности к расстройствам личности и наследованию психической конституции, вероятно, свидетельствуют близкие значения коэффициентов наследуемости (40–50%) [2, 38]. Многочисленными исследованиями также показана ассоциация отдельных генов как с нейродегенеративными заболеваниями, так и с психическими признаками (параметрами личности) [21–31, 39, 40].

Результаты анализа связи 12 изученных полиморфных вариантов с количественными признаками, характеризующими личность, представлены в табл. 5. Как видно из таблицы, ген *PICALM* ассоциирован с внутренней напряженностью (Q4, 16PF) и неуравновешенностью по тесту X. Шмишека. Так как ассоциация гена *PICALM* со шкалой Q4 теста Кеттелла близка к статистически значи-

мой ( $p = 0,054$ ), проанализированы генотипы GG + GA против генотипа AA. Выявлена внутренняя расслабленность носителей генотипа AA (меньшие значения шкалы) по сравнению с остальными генотипами ( $H = 5,82$ ;  $p = 0,016$ ). С неуровненностью также ассоциирует полиморфный вариант в гене *ZNF804A*. При этом гомозиготные генотипы менее распространенных аллелей (AA и TT) обнаруживают в среднем меньшие значения признака. Ранее была показана ассоциация полиморфных вариантов генов *PICALM* и *ZNF804A* с

БА [5] и шизофренией [7]. Настоящее исследование в какой-то мере подтверждает эти ранее выявленные ассоциации. Известно, что нарушения высших корковых функций, особенно при постепенном начале деменции при болезни Альцгеймера, сопровождаются состоянием напряжения. Для шизофрении характерны качественные изменения поведения и эмоционально-волевые нарушения, что в психодиагностических методиках, направленных на оценку личности, отражается в виде проявлений неуровненности.

Т а б л и ц а 5

| Взаимосвязь изученных локусов с количественными признаками, характеризующими темперамент, характер, личность и интеллект |                         |                                          |                        |                   |                    |       |       |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|-------|-------|-----|
| №                                                                                                                        | Ген                     | Признак                                  | Генотип, Me; Q1-Q4 (n) |                   |                    | H (U) | p     | n   |
|                                                                                                                          |                         |                                          | 11                     | 12                | 22                 |       |       |     |
| 1                                                                                                                        | <i>GABRA2</i> (T/A)     | Нет                                      | –                      | –                 | –                  | –     | –     | –   |
| 2                                                                                                                        | <i>PICALM</i> (G/A)     | 16PF Q4 – напряженность                  | 6; 5–7 (69)            | 6; 5–7 (59)       | 4; 3–6 (16)        | 5,83  | 0,054 | 144 |
|                                                                                                                          |                         | тIII – неуровненность                    | 12; 6–12 (73)          | 12; 9–15 (61)     | 7,5; 4,5–10,5 (16) | 8,82  | 0,012 | 150 |
| 3                                                                                                                        | <i>CLU</i> (C/T)        | 16PF Q3 – самодисциплина                 | 6; 4–8 (61)            | 6; 4–7 (69)       | 7,5; 6–9 (14)      | 8,11  | 0,017 | 144 |
|                                                                                                                          |                         | тIII – экзальтированность                | 12; 12–18 (65)         | 18; 12–18 (70)    | 18; 12–18(15)      | 7,43  | 0,024 | 150 |
| 4                                                                                                                        | <i>ZNF804A</i> (C/T)    | тIII – неуровненность                    | 12; 8–15 (77)          | 12; 9–15 (57)     | 9; 6–9 (17)        | 9,08  | 0,011 | 151 |
| 5                                                                                                                        | <i>CBX7</i> (T/C)       | 16PF A – общительность                   | 5,5; 4–7 (50)          | 6; 4–7 (69)       | 6,5; 5–8 (26)      | 5,83  | 0,054 | 145 |
|                                                                                                                          |                         | 16PF L – подозрительность                | 7; 6–8 (50)            | 8; 6–9 (69)       | 8; 8–9 (26)        | 6,77  | 0,034 | 145 |
| 6                                                                                                                        | <i>DISC1</i> (C/T)      | 16PF L – подозрительность                | 8; 6–9 (135)           | 6; 5–8 (7)        | –                  | 1,87  | 0,065 | 142 |
|                                                                                                                          |                         | тIII – циклотимия                        | 15; 12–21 (141)        | 12; 9–15 (7)      | –                  | 2,08  | 0,038 | 148 |
|                                                                                                                          |                         | тIII – экзальтированность                | 18; 12–18 (141)        | 12; 6–12 (7)      | –                  | 10,60 | 0,001 | 148 |
| 7                                                                                                                        | <i>GAB2</i> (A/C)       | Нет                                      | –                      | –                 | –                  | –     | –     | –   |
| 8                                                                                                                        | <i>rs13219354</i> (T/C) | Нет                                      | –                      | –                 | –                  | –     | –     | –   |
| 9                                                                                                                        | <i>ADCY3</i> (G/A)      | 16PF Q2 – самостоятельность              | 6; 5–7 (126)           | 5; 4–6 (18)       | –                  | 1,97  | 0,049 | 144 |
|                                                                                                                          |                         | 16PF F2 – экстраверсия                   | 5; 3,3–7 (126)         | 6; 5–8 (18)       | –                  | –1,86 | 0,06  | 144 |
| 10                                                                                                                       | <i>MIR9-2</i> (G/T)     | 16PF C – эмоциональная устойчивость      | 6; 5–7 (137)           | 2,3; 1,5–3,3 (4)  | –                  | 3,00  | 0,003 | 141 |
|                                                                                                                          |                         | 16PF F – беспечность                     | 5; 3–7 (137)           | 1,5; 1–3,5 (4)    | –                  | 2,31  | 0,021 | 141 |
|                                                                                                                          |                         | 16PF H – смелость в социальных контактах | 6; 4–7 (137)           | 2,5; 1,5–4,5 (4)  | –                  | 2,24  | 0,025 | 141 |
|                                                                                                                          |                         | 16PF F2 – экстраверсия                   | 5,1; 3,9–7 (137)       | 2; 1–3,5 (4)      | –                  | 2,32  | 0,020 | 141 |
|                                                                                                                          |                         | тIII – гипертимия                        | 18; 12–21 (143)        | 4,5; 1,5–10,5 (4) | –                  | 2,43  | 0,015 | 141 |
|                                                                                                                          |                         | тIII – дистимия                          | 9; 6–12 (143)          | 19,5; 13,5–21 (4) | –                  | –2,39 | 0,017 | 147 |
|                                                                                                                          |                         | тC-X – личная тревожность                | 42; 36–48 (138)        | 62; 46,5–68,5 (4) | –                  | –2,05 | 0,040 | 142 |
| 11                                                                                                                       | <i>SLC6A4</i> (L/S)     | 16PF B – интеллектуальность              | 7; 5–8 (55)            | 7; 6–9 (66)       | 5; 4–8 (23)        | 6,53  | 0,038 | 144 |
| 12                                                                                                                       | <i>SLC6A3</i> (10/9)    | IQ                                       | 109; 104–121 (28)      | 105; 100–110 (13) | –                  | –1,32 | 0,187 | 41  |

П р и м е ч а н и е. Так как для полиморфизма в генах *ADCY3* и *SLC6A3* генотипы минорных аллелей (22) встречались с низкой частотой (0,6 и 5,6%), проанализированы были генотипы (11) против (12 + 22). H (U) – значения критериев рангового теста Краскела – Уоллиса или Манна – Уитни в случае сравнения двух групп генотипов, приведены медианные значения признаков (Me), верхний (Q1) и нижний (Q4) квартили распределения, n – количество индивидов в генотипических подгруппах.

Для исследованных генов *GABRA2*, *GAB2* и маркера rs13219354 не было показано взаимосвязи ни с одним количественным признаком психических черт личности. Ранее на выборке европеоидов также выявлено, что распространенные полиморфные варианты четырех генов рецепторов ГАБА, включая *GABRA2*, не влияют на подверженность к ряду психических расстройств, в частности, к глубокой депрессии, тревожным и другим невротическим расстройствам [41].

Выявлены статистически значимые ассоциации гена аполипопротеина J (*CLU*) с самодисциплиной (Q3, 16PF) и экзальтированностью по опроснику Х. Шмишека. Гомозиготные носители менее распространенных аллелей (ТТ) обладают в среднем более высоким самоконтролем, тогда как гетерозиготы (СТ) имеют больший диапазон эмоциональных состояний. Sapkota S. с соавт. (2016) показали ассоциацию этого полиморфного варианта гена *CLU* с повышенным уровнем некоторых черт личности (а именно со способностью к переживанию и экстраверсии) при низкой производительности декларативной (семантической и эпизодической) памяти у здоровых пожилых людей [42]. Также установлена ассоциация гена *CLU/APOJ* с риском развития болезни Альцгеймера [5].

Гомозиготные носители генотипа СС гена *CBX7* проявляют повышенную открытость и общительность (А, 16PF). Так, для шкалы А (замкнутость – общительность) при анализе генотипа СС в сравнении с группой объединенных генотипов ТТ + СТ ассоциация становится статистически значимой ( $H = 5,82$ ;  $p = 0,016$ ). В литературных источниках не обнаружено работ по ассоциации гена *CBX7* с личностными признаками.

При сравнении гомозигот GG против альтернативных гомозигот и гетерозигот (AA + GA) гена *ADCY3* выявлена ассоциация с более высоким средним значением фактора Q2 (самостоятельность, 16PF) и сниженная экстраверсия (F2, 16PF). Связь полиморфного варианта гена *ADCY3* с пониженной экстраверсией в нормальной популяции подтверждает результаты широкогеномного исследования (GWAS), обнаружившего ассоциацию этого гена с глубокой депрессией [18].

Следует отметить большое количество ассоциаций, полученных в данном исследовании, для полиморфных вариантов гена *MIR9-2* (см. табл. 5). Это, вероятно, обусловлено многообразием биологических функций продуктов гена (см. табл. 1), а также невысоким уровнем генетической изменчивости маркера. Частота редкого аллеля составила менее 2%, а гомозиготы по нему не обна-

ружены. Тем не менее выявленные ассоциации с факторами С (эмоциональная устойчивость), F (беспечность), Н (смелость в социальных контактах), F2 (экстраверсия) по опроснику 16PF, акцентуациями характера: гипертимный и дистимный, личной тревожностью по тесту Спилбергера – Ханина могут носить неслучайный характер. В недавней работе Hauberg M.E. с соавт. (2016) при мета-анализе 83 550 индивидов из 52 широкогеномных исследований шизофрении обнаружили высоко статистически значимую ( $p = 7,1 \times 10^{-8}$ ) связь гена микроРНК *MIR9-2* с этим заболеванием [20].

В настоящем исследовании стоит указать, что гетерозиготные носители минорного аллеля *MIR9-2* обладают сниженными средними значениями всех четырех факторов по опроснику 16PF, низкой активностью и предприимчивостью, пониженным настроением и склонностью к депрессии (акцентуации личности гипертимная и дистимная противоположны) по опроснику Х. Шмишека и высокой личной тревожностью по тесту Спилбергера – Ханина. Возможно, полученные результаты не имеют стохастической природы, а закономерно вытекают из вклада гена *MIR9-2* в риск развития шизофрении.

Для гена *DISC1* показаны ассоциации с шизофренией, биполярным расстройством и глубокой депрессией [9–11]. Несмотря на невысокую частоту редкого аллеля ( $< 3\%$ ), обнаруженная связь генетической изменчивости *DISC1* с подозрительностью (L, 16PF), циклотимией и экзальтированностью по опроснику Х. Шмишека подтверждает ранее выявленные ассоциации с личностными расстройствами. Уровень статистической значимости 5% полиморфного варианта гена *DISC1* с подозрительностью (L, 16PF) не был преодолен ( $p = 0,065$ ).

Примечательным представляется факт связи полиморфизма VNTR в генах переносчиков серотонина (*SLC6A4*) и дофамина (*SLC6A3*) с интеллектуальными способностями человека. Несмотря на низкий достигнутый уровень значимости ( $p = 0,187$ ) ассоциации гена переносчика дофамина *SLC6A3* с интеллектуальными способностями (IQ), выявленной непараметрическим методом Манна – Уитни, что, вероятно, обусловлено низким объемом выборки, методом однофакторного дисперсионного анализа проанализирована взаимосвязь этих параметров, так как многочисленными исследованиями показано нормальное распределения признака IQ в популяциях. Обнаружена статистически значимая ассоциация генотипа 10/10 с более высокими значениями те-

ста IQ по сравнению с генотипами 9/10 + 9/9. Средние значения и стандартные ошибки теста составили  $110,3 \pm 2,4$  и  $99,5 \pm 5,7$ , соответственно ( $F = 4,32$ ;  $p = 0,044$ ). Таким образом, носители коротких аллелей обладают меньшими показателями интеллектуальных способностей. Ранее для коротких аллелей была показана сниженная экспрессия этих генов и ассоциации с глубокой депрессией, аутизмом, неврозами, агрессивным поведением у детей, алкоголизмом, идиопатической эпилепсией, синдромом дефицита внимания и гиперактивности, зависимостью от алкоголя и кокаина, подверженностью к болезни Паркинсона, протективностью никотиновой зависимости [21–31, 43–47].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования был проведен анализ взаимосвязи количественных признаков, формализованных в результате оценки личности, темперамента и характера, с 12 полиморфными вариантами 12 генов, вовлеченными в развитие алкоголизма, шизофрении и деменции при болезни Альцгеймера. Установлены неслучайные межаллельные ассоциации парных сочетаний полиморфных вариантов *GABRA2-PICALM*, *PICALM-ADCY3*, *CLU-CBX7* и *CLU-ADCY3*, вероятно свидетельствующие об адаптивном отборе, влияющим на поддержание поведенческого гомеостаза в популяции. Обнаружен ряд статистически значимых и близких к таковым ассоциаций генетической изменчивости генов *GAB2*, *CLU*, *PICALM*, *DISC1*, *rs13219354*, *ZNF804A*, *GABRA2*, *SLC6A4*, *ADCY3*, *MIR9-2*, *CBX7*, *SLC6A4* и *SLC6A3* с признаками, характеризующими интеллект, темперамент и характер. Данные об индивидуальной генотипической изменчивости 12 изученных полиморфных маркеров могут быть востребованы при лечении тяжелых психических расстройств. Полученные результаты свидетельствуют об общей генетической компоненте психических и неврологических расстройств с вариабельностью когнитивных и личностных признаков.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00020).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Livesley W.J., Jang K.L. The behavioral genetics of personality disorder // *Annu Rev. Clin. Psychol.* 2008; 4: 247–274.
2. Bouchard T.J.Jr., Loehlin J.C. Genes, evolution, and personality // *Behav. Genet.* 2001; May, 31 (3): 243–273.
3. Lind P.A., Macgregor S., Agrawal A. et al. The role of *GABRA2* in alcohol dependence, smoking, and illicit drug use in an Australian population sample // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2008; Oct., 32 (10): 1721–1731. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00768.x. Epub 2008 Aug 22.
4. Philibert R.A., Gunter T.D., Beach S.R. et al. Role of *GABRA2* on risk for alcohol, nicotine, and cannabis dependence in the Iowa Adoption Studies // *Psychiatr. Genet.* 2009; Apr., 19 (2): 91–98. doi: 10.1097/YPG.0b013e3283208026.
5. Lee J.H., Cheng R., Barral S. et al. Identification of novel loci for Alzheimer disease and replication of *CLU*, *PICALM*, and *BIN1* in Caribbean Hispanic individuals // *Arch. Neurol.* 2011 Mar., 68 (3): 320–328. doi: 10.1001/archneurol.2010.292. Epub 2010 Nov 8.
6. Голенкина С.А., Гольцов А.Ю., Кузнецова И.А. и др. Полиморфизм гена кластерина (*CLU/APOJ*) при болезни Альцгеймера и в норме в российских популяциях // *Молекулярная биология.* 2010; 44 (4): 620–626.
7. Donohoe G., Rose E., Frodl T. et al. *ZNF804A* risk allele is associated with relatively intact gray matter volume in patients with schizophrenia // *Neuroimage.* 2011; Feb. 1; 54 (3): 2132–2137. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.09.089. Epub 2010 Oct 8.
8. URL=<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CBX7ID-43845ch22q13.html>
9. Leliveld S.R., Bader V., Hendriks P. et al. Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease // *J. Neurosci.* 2008; Apr. 9, 28 (15): 3839–3845. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5389-07.2008.
10. Maeda K., Nwulia E., Chang J. et al. Differential expression of disrupted-in-schizophrenia (*DISC1*) in bipolar disorder // *Biol. Psychiatry.* 2006; Nov 1, 60 (9): 929–935.
11. Sawamura N., Sawamura-Yamamoto T., Ozeki Y. et al. A form of *DISC1* enriched in nucleus: altered subcellular distribution in orbitofrontal cortex in psychosis and substance/alcohol abuse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; Jan. 25, 102 (4): 1187–1192.
12. Ikram M.A., Liu F., Oostra B.A. et al. The *GAB2* gene and the risk of Alzheimer's disease: replication and meta-analysis // *Biol. Psychiatry.* 2009; Jun. 1, 65 (11): 995–999. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.014. Epub 2008 Dec 31.
13. Cheunsuk S., Hsu T., Gershwin M.E., Bowlus C.L. Analysis of the IDDM candidate gene *Prss16* in NOD and NON mice // *Dev. Immunol.* 2002; Dec., 9 (4): 183–186.
14. Lie B.A., Akselsen H.E., Bowlus C.L. et al. Polymorphisms in the gene encoding thymus-specific serine protease

- ase in the extended HLA complex: a potential candidate gene for autoimmune and HLA-associated diseases // *Genes. Immun.* 2002; Aug., 3 (5): 306–312.
15. Shi J., Levinson D.F., Duan J. et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia // *Nature*. 2009; Aug., 6, 460 (7256): 753–757. doi: 10.1038/nature08192. Epub 2009 Jul 1.
16. Edenberg H.J., Koller D.L., Xuei X. et al. Genome-wide association study of alcohol dependence implicates a region on chromosome 11 // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010; May, 34 (5): 840–852. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01156.x. Epub 2010 Mar 1.
17. Nordman S., Abulaiti A., Hilding A. Genetic variation of the adenylyl cyclase 3 (AC3) locus and its influence on type 2 diabetes and obesity susceptibility in Swedish men // *Int. J. Obes. (Lond)*. 2008; Mar., 32 (3): 407–412.
18. Wray N.R., Pergadia M.L., Blackwood D.H. et al. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned // *Mol. Psychiatry*. 2012; Jan., 17 (1): 36–48. doi: 10.1038/mp.2010.109. Epub 2010 Nov 2.
19. Rodriguez-Otero P., Roman-Gomez J., Vilas-Zornoza A. et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family // *Br. J. Haematol.* 2011; Oct., 155 (1): 73–83. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08812.x. Epub 2011 Aug 2.
20. Hauberg M.E., Roussos P., Grove J., Borglum A.D., Mattheisen M.; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Analyzing the Role of MicroRNAs in Schizophrenia in the Context of Common Genetic Risk Variants // *JAMA Psychiatry*. 2016; Apr. 1, 73 (4): 369–377. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.3018.
21. Bligh-Glover W., Kolli T.N., Shapiro-Kulnane L. et al. The serotonin transporter in the midbrain of suicide victims with major depression // *Biol. Psychiatry*. 2000; Jun., 15, 47 (12): 1015–1024.
22. Gonda X., Fountoulakis K.N., Juhasz G. et al. Association of the s allele of the 5-HTTLPR with neuroticism-related traits and temperaments in a psychiatrically healthy population // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2009; Mar., 259 (2): 106–113. doi: 10.1007/s00406-008-0842-7. Epub 2008 Sep 19.
23. Haberstick B.C., Smolen A., Hewitt J.K. Family-based association test of the 5HTTLPR and aggressive behavior in a general population sample of children // *Biol. Psychiatry*. 2006; May 1, 59 (9): 836–843.
24. Hammoumi S., Payen A., Favre J.D. et al. Does the short variant of the serotonin transporter linked polymorphic region constitute a marker of alcohol dependence? // *Alcohol*. 1999; Feb., 17 (2): 107–112.
25. Persico A.M., Militeri R., Bravaccio C. et al. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples // *Am. J. Med. Genet.* 2000; Feb., 96 (1): 123–127.
26. Dougherty D.D., Bonab A.A., Spencer T.J. et al. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder // *Lancet*. 1999; Dec., 354 (9196): 2132–2133.
27. Lerman C., Shields P.G., Wileyto E.P. et al. Effects of dopamine transporter and receptor polymorphisms on smoking cessation in a bupropion clinical trial // *Health Psychol.* 2003; Sep., 22 (5): 541–548.
28. Lohoff F.W., Bloch P.J., Hodge R. et al. Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence // *Neurosci. Lett.* 2010; Apr., 473 (2): 87–91. doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.021. Epub 2010 Feb 17.
29. Sander T., Berlin W., Ostapowicz A. et al. Variation of the genes encoding the human glutamate EAAT2, serotonin and dopamine transporters and Susceptibility to idiopathic generalized epilepsy // *Epilepsy Res.* 2000; Aug., 41 (1): 75–81.
30. Van der Zwaluw C.S., Engels R.C., Buitelaar J. et al. Polymorphisms in the dopamine transporter gene (SLC6A3/DAT1) and alcohol dependence in humans: a systematic review // *Pharmacogenomics*. 2009; May, 10 (5): 853–866. doi: 10.2217/pgs.09.24.
31. Sossi V., de la Fuente-Fernandez R., Schulzer M. et al. Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study // *Ann. Neurol.* 2007; Nov., 62 (5): 468–474.
32. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984: 480.
33. Капустина А.Н. Многофакторная личностная методика Р. Кеттелла. СПб.: Речь, 2004: 104.
34. Cattell R.B., Eber H.W., Tatsuoka M.M. Handbook for the sixteen personality factor questionnaire (16PF). Illinois, 1970: 700.
35. Кортнева Ю. В. Диагностика актуальной проблемы. Методика Леонгарда–Шмишека. М.: Институт общегуманитарных исследований, 2004: 240.
36. Батаршев А.В. Базовые психологические свойства и самоопределение личности: практическое руководство по психологической диагностике. СПб.: Речь, 2005: 44–49.
37. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991: 270.
38. Torgersen S. Behavioral genetics of personality // *Curr. Psychiatry Rep.* 2005. Mar. 7 (1): 51–56.
39. Степанов В.А., Бочарова А.В., Марусин А.В., Жукова Н.Г., Алифиров В.М., Жукова И.А. Репликативный анализ ассоциаций генетических маркеров когнитивных признаков с болезнью Альцгеймера в российской популяции // *Молекулярная биология*. 2014. 48 (6): 952–962.
40. Степанов В.А., Бочарова А.В., Садуакасова К.З., Марусин А.В., Конева Л.А., Вагайцева К.В., Святова Г.С. Репликативное исследование подверженности шизоф-

- рении с ранним началом у казахов // *Генетика*. 2015. 51 (2): 227–235.
41. Pham X., Sun C., Chen X. et al. Association study between GABA receptor genes and anxiety spectrum disorders // *Depress. Anxiety*. 2009; 26 (11): 998–1003. doi: 10.1002/da.20628.
  42. Sapkota S., Wiebe S.A., Small B.J., Dixon R.A. Apolipoprotein E and Clusterin can magnify effects of personality vulnerability on declarative memory performance in non-demented older adults // *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. 2016; May, 31 (5): 502–509. doi: 10.1002/gps.4355. Epub 2015 Sep 7.
  43. Марусин А.В., Максимова Н.Р., Матвеева Н.П. и др. Ассоциация полиморфизма генов переносчика дофамина *DAT1 (SLC6A3)* и этанол-метаболизирующих ферментов *ADH1B* и *CYP2E1* с риском формирования алкогольной зависимости в якутской популяции // *Якутский медицинский журнал*. 2009; 2: 148–150.
  44. Golimbet V.E., Alfimova M.V., Shcherbatykh T.V., Rogayev E.I. Gene insertion and deletion polymorphism in the serotonin transporter gene and personality traits measured by MMPI // *Генетика*. 2003; Apr., 39 (4): 534–539.
  45. Hu X., Oroszi G., Chun J. et al. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005; Jan., 29 (1): 8–16.
  46. Lesch K.P., Bengel D., Heils A. et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region // *Science*. 1996; Nov., 274 (5292): 1527–1531.
  47. VanNess S.H., Owens M.J., Kilts C.D. The variable number of tandem repeats element in *DAT1* regulates in vitro dopamine transporter density // *BMC Genet.* 2005; 6: 55. doi: 10.1186/1471-2156-6-55. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/55> (accessed 29 April 2016).

Поступила в редакцию 06.05.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Марусин Андрей Викторович**, канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории эволюционной генетики, НИИМГ, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

**Корнетов Александр Николаевич**, д-р мед. наук, зав. кафедрой клинической психологии и психотерапии, декан факультета поведенческой медицины и менеджмента, СибГМУ, г. Томск.

**Сваровская Мария Геннадьевна**, канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории эволюционной генетики, НИИМГ, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

**Вагайцева Ксения Валерьевна**, канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории эволюционной генетики, НИИМГ, ТНИМЦ РАН; науч. сотрудник лаборатории онтогенетики человека, НИ ТГУ, г. Томск.

**Павленюк Екатерина Степановна**, студентка 6-го курса кафедры клинической психологии, психотерапии и социальной работы, СибГМУ, г. Томск.

**Степанов Вадим Анатольевич**, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией эволюционной генетики, НИИМГ, ТНИМЦ РАН; зав. лабораторией онтогенетики человека, НИ ТГУ, г. Томск.

(✉) **Марусин Андрей Викторович**, e-mail: [andrey.marusin@medgenetics.ru](mailto:andrey.marusin@medgenetics.ru)

УДК 616.89-072.8: 575.174.015.3(=161.1)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-83–96

For citation: Marusin A.V., Kornetov A.N., Swarovskaya M.G., Vagaitseva K.V. Pavlenyuk E.S., Stepanov V.A. Genetic predisposition to alcoholism, schizophrenia and Alzheimer's disease with psychodiagnostic characteristics in russian population. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 83–96

## Genetic predisposition to alcoholism, schizophrenia and Alzheimer's disease with psychodiagnostic characteristics in russian population

**Marusin A.V.<sup>1</sup>, Kornetov A.N.<sup>2</sup>, Swarovskaya M.G.<sup>1</sup>, Vagaitseva K.V.<sup>1,3</sup>, Pavlenyuk E.S.<sup>2</sup>, Stepanov V.A.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> *The Research Institute for Medical Genetics, National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Sciences (RAS)  
10, Nab. Ushaiiki, Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation*

<sup>3</sup> *National Research Tomsk State University  
36, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation*

## ABSTRACT

**The purpose of this paper** is to identify genetic factors connected with personal features using the panel of 12 polymorphic markers associated with the risk of developing dementia in patients with Alzheimer's disease, schizophrenia and alcoholism.

**Materials and methods.** The correlation among quantitative traits of personality, temperament and character determined with Cattell's (the Sixteen personality factor questionnaire (16PF)), Leonhard-Schmieschek's, Spielberger-Khanin's, and Eysenck's (IQ) tests were analyzed with polymorphic variants of 12 genes involved in the development of severe mental disorders such as alcoholism, schizophrenia and Alzheimer's disease. DNA samples of 150 students were genotyped using PCR-RFLP method. The data were processed by nonparametric statistical methods.

**Results.** Interallelic nonrandom associations in paired combinations of *GABRA2-PICALM*, *PICALM-ADCY3*, *CLU-CBX7* and *CLU-ADCY3* polymorphisms were detected. This may indicate the adaptive selection influencing the maintenance of behavioral homeostasis in population. A number of statistically significant associations of genetic variation were found: *CLU* with perfectionism(Q3) of 16PF and the exaltation of the Leonhard's tests, *PICALM* with tension (Q4) of 16PF and the imbalance of Leonhard's tests, *DISC1* with vigilance(L) of 16PF, and exaltation, cyclothymia of Leonhard's tests, *ZNF804A* with imbalance by Leonhard's test, *SLC6A4* with reasoning(B) of 16PF test, *ADCY3* with self-reliance(Q2) and extraversion(F2) of 16PF test, *MIR9-2* emotional stability(C), liveliness(F), social boldness(H), extraversion(F2) of 16PF, and dysthymia, hyperthymia of Leonhard's tests, with the personal anxiety of Spielberger-Khanin's test, *CBX7* with vigilance(L), warmth(A) of 16PF test, *SLC6A3* with IQ.

**Conclusion.** These findings support the idea of overlapping genetic component in common mental and neurological disorders and variability of human cognitive and personality traits.

**Key words:** genetic polymorphism, susceptibility, alcoholism, schizophrenia, Alzheimer's disease, quantitative traits, character, temperament, personality.

## REFERENCES

1. Livesley W.J., Jang K.L. The behavioral genetics of personality disorder // *Annu Rev. Clin. Psychol.* 2008; 4: 247–274.
2. Bouchard T.J.Jr., Loehlin J.C. Genes, evolution, and personality // *Behav. Genet.* 2001; May, 31 (3): 243–273.
3. Lind P.A., Macgregor S., Agrawal A. et al. The role of GABRA2 in alcohol dependence, smoking, and illicit drug use in an Australian population sample // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2008; Oct., 32 (10): 1721–1731. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00768.x. Epub 2008 Aug 22.
4. Philibert R.A., Gunter T.D., Beach S.R. et al. Role of GABRA2 on risk for alcohol, nicotine, and cannabis dependence in the Iowa Adoption Studies // *Psychiatr. Genet.* 2009; Apr., 19 (2): 91–98. doi: 10.1097/YPG.0b013e3283208026.
5. Lee J.H., Cheng R., Barral S. et al. Identification of novel loci for Alzheimer disease and replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic individuals // *Arch. Neurol.* 2011 Mar., 68 (3): 320–328. doi: 10.1001/archneurol.2010.292. Epub 2010 Nov 8.
6. Golenkina S.A., Gol'cov A.Yu., Kuznecova I.L. i dr. Polimorfizm gena klasterina (CLU/APOJ) pri bolezni Al'cgejmara i v norme v rossijskikh populyacijah [Analysis of clusterin gene (CLU/APOJ) polymorphism in Alzheimer's disease patients and in normal cohorts from Russian populations] // *Molekulyarnaya Biologiya – Molecular Biology*, 2010; 44 (4): 620–626 (in Russian).
7. Donohoe G., Rose E., Frodl T. et al. ZNF804A risk allele is associated with relatively intact gray matter volume in patients with schizophrenia // *Neuroimage*. 2011; Feb. 1; 54 (3): 2132–2137. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.09.089. Epub 2010 Oct 8.
8. URL=<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CBX7ID-43845ch22q13.html>
9. Leliveld S.R., Bader V., Hendriks P. et al. Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease // *J. Neurosci.* 2008; Apr. 9, 28 (15): 3839–3845. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5389-07.2008.
10. Maeda K., Nwulia E., Chang J. et al. Differential expression of disrupted-in-schizophrenia (DISC1) in bipolar disorder // *Biol. Psychiatry*. 2006; Nov. 1, 60 (9): 929–935.
11. Sawamura N., Sawamura-Yamamoto T., Ozeki Y. et al. A form of DISC1 enriched in nucleus: altered subcellular distribution in orbitofrontal cortex in psychosis and substance/alcohol abuse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; Jan. 25, 102 (4): 1187–1192.
12. Ikram M.A., Liu F., Oostra B.A. et al. The GAB2 gene and the risk of Alzheimer's disease: replication and meta-analysis // *Biol. Psychiatry*. 2009; Jun. 1, 65 (11):

- 995–999. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.014. Epub 2008 Dec 31.
13. Cheunsuk S., Hsu T., Gershwin M.E., Bowlus C.L. Analysis of the IDDM candidate gene Prss16 in NOD and NON mice // *Dev. Immunol.* 2002; Dec., 9 (4): 183–186.
  14. Lie B.A., Akselsen H.E., Bowlus C.L. et al. Polymorphisms in the gene encoding thymus-specific serine protease in the extended HLA complex: a potential candidate gene for autoimmune and HLA-associated diseases // *Genes. Immun.* 2002; Aug., 3 (5): 306–312.
  15. Shi J., Levinson D.F., Duan J. et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia // *Nature.* 2009; Aug., 6, 460 (7256): 753–757. doi: 10.1038/nature08192. Epub 2009 Jul 1.
  16. Edenberg H.J., Koller D.L., Xuei X. et al. Genome-wide association study of alcohol dependence implicates a region on chromosome 11 // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010; May, 34 (5): 840–852. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01156.x. Epub 2010 Mar 1.
  17. Nordman S., Abulaiti A., Hilding A. Genetic variation of the adenylyl cyclase 3 (AC3) locus and its influence on type 2 diabetes and obesity susceptibility in Swedish men // *Int. J. Obes. (Lond).* 2008; Mar., 32 (3): 407–412.
  18. Wray N.R., Pergadia M.L., Blackwood D.H. et al. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned // *Mol. Psychiatry.* 2012; Jan., 17 (1): 36–48. doi: 10.1038/mp.2010.109. Epub 2010 Nov 2.
  19. Rodriguez-Otero P., Roman-Gomez J., Vilas-Zornoza A. et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family // *Br. J. Haematol.* 2011; Oct., 155 (1): 73–83. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08812.x. Epub 2011 Aug 2.
  20. Hauberg M.E., Roussos P., Grove J., Borglum A.D., Mattheisen M.; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Analyzing the Role of MicroRNAs in Schizophrenia in the Context of Common Genetic Risk Variants // *JAMA Psychiatry.* 2016; Apr. 1, 73 (4): 369–377. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.3018.
  21. Bligh-Glover W., Kolli T.N., Shapiro-Kulane L. et al. The serotonin transporter in the midbrain of suicide victims with major depression // *Biol. Psychiatry.* 2000; Jun. 15, 47 (12): 1015–1024.
  22. Gonda X., Fountoulakis K.N., Juhasz G. et al. Association of the s allele of the 5-HTTLPR with neuroticism-related traits and temperaments in a psychiatrically healthy population // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2009; Mar., 259 (2): 106–113. doi: 10.1007/s00406-008-0842-7. Epub 2008 Sep 19.
  23. Haberstick B.C., Smolen A., Hewitt J.K. Family-based association test of the 5HTTLPR and aggressive behavior in a general population sample of children // *Biol. Psychiatry.* 2006; May 1, 59 (9): 836–843.
  24. Hammoumi S., Payen A., Favre J.D. et al. Does the short variant of the serotonin transporter linked polymorphic region constitute a marker of alcohol dependence? // *Alcohol.* 1999; Feb., 17 (2): 107–112.
  25. Persico A.M., Militeri R., Bravaccio C. et al. Lack of association between serotonin transporter gene promoter variants and autistic disorder in two ethnically distinct samples // *Am. J. Med. Genet.* 2000; Feb., 96 (1): 123–127.
  26. Dougherty D.D., Bonab A.A., Spencer T.J. et al. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder // *Lancet.* 1999; Dec., 354 (9196): 2132–2133.
  27. Lerman C., Shields P.G., Wileyto E.P. et al. Effects of dopamine transporter and receptor polymorphisms on smoking cessation in a bupropion clinical trial // *Health Psychol.* 2003; Sep., 22 (5): 541–548.
  28. Lohoff F.W., Bloch P.J., Hodge R. et al. Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence // *Neurosci. Lett.* 2010; Apr., 473 (2): 87–91. doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.021. Epub 2010 Feb 17.
  29. Sander T., Berlin W., Ostapowicz A. et al. Variation of the genes encoding the human glutamate EAAT2, serotonin and dopamine transporters and Susceptibility to idiopathic generalized epilepsy // *Epilepsy Res.* 2000; Aug., 41 (1): 75–81.
  30. Van der Zwaluw C.S., Engels R.C., Buitelaar J. et al. Polymorphisms in the dopamine transporter gene (SLC6A3/DAT1) and alcohol dependence in humans: a systematic review // *Pharmacogenomics.* 2009; May, 10 (5): 853–866. doi: 10.2217/pgs.09.24.
  31. Sossi V., de la Fuente-Fernandez R., Schulzer M. et al. Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study // *Ann. Neurol.* 2007; Nov., 62 (5): 468–474.
  32. Maniatis T., Fritch E.E., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 545 (Russ ed. Maniatis T., Fritch E., Sambrook J. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie. Moscow: Mir Publ., 1984: 480) (in Russian).
  33. Kapustina A.N. Mnogofaktornaya lichnostnaya metodika R. Kettella [Multifactor personal technique R. Cattell]. St. Petersburg: Rech' Publ., 2004: 104 (in Russian).
  34. Cattell R.B., Eber H.W., Tatsuoaka M.M. Handbook for the sixteen personality factor questionnaire (16PF). Illinois, 1970: 700.
  35. Kortneva Yu. V. Diagnostika aktual'noj problemy. Metodika Leongarda-SHmisheka [Diagnosis of the actual problem. Methods Leonhard-Shmisheka]. Moscow: Institut obshchegumanitarnykh issledovaniy Publ., 2004: 240 (in Russian).
  36. Batarshev A.V. Bazovye psihologicheskie svoystva i samoopredelenie lichnosti: Prakticheskoe rukovodstvo po psihologicheskoy diagnostike [Basic psychological characteristics and self-identity: A Practical Guide to psycholog-

- ical diagnostics] St. Petersburg: Rech' Publ., 2005: 44–49 (in Russian).
37. Zhivotovskij L.A. Populyacionnaya biometriya [Population biometrics]. Moscow: Nauka Publ., 1991: 270 (in Russian).
38. Torgersen S. Behavioral genetics of personality // *Curr. Psychiatry Rep.* 2005. Mar. 7 (1): 51–56.
39. Stepanov V.A., Bocharova A.V., Marusin A.V., Zhukova N.G., Alifirova V.M., Zhukova I.A. Replikativnyj analiz asociacij genicheskikh markerov kognitivnykh priznakov s boleznu Al'cgejmera v rossijskoj populjacii [Replicative association analysis of genetic markers of cognitive traits with Alzheimer's disease in a Russian population] // *Molekuljarnaja biologija – Molecular Biology*. 2014; 48 (6): 835–844. URL: <http://link.springer.com/article/10.1134/S0026893314060168> (accessed 4 May 2016). (in Russian).
40. Stepanov V.A., Bocharova A.V., Saduakassova K.Z., Marusin A.V., Koneva L.A., Vagaitseva K.V., Svyatova G.S. Replikativnoe issledovanie podverzhennosti shizofrenii s rannim nachalom u kazahov [Replicative study of susceptibility to childhood-onset schizophrenia in kazakhs] // *Genetika – Russian Journal of Genetics*. 2015; 51 (2): 227–235. URL: <http://link.springer.com/article/10.1134/S1022795415020143> (accessed 4 May 2016) (in Russian).
41. Pham X., Sun C., Chen X. et al. Association study between GABA receptor genes and anxiety spectrum disorders // *Depress. Anxiety*. 2009; 26 (11): 998–1003. doi: 10.1002/da.20628.
42. Sapkota S., Wiebe S.A., Small B.J., Dixon R.A. Apolipoprotein E and Clusterin can magnify effects of personality vulnerability on declarative memory performance in non-demented older adults // *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. 2016; May, 31 (5): 502–509. doi: 10.1002/gps.4355. Epub 2015 Sep 7.
43. Marusin A.V., Maksimova N.R., Matveeva N.P. i dr. Associaciya polimorfizma genov perenoschika dofamina DAT1 (SLC6A3) i ehtanol-metaboliziruyushchih fermentov ADH1B i CYP2E1 s riskom formirovaniya alkohol'noj zavisimosti v yakutskoj populyacii [Dopamine transporter DAT1 (SLC6A3) and alcohol metabolizing enzymes ADH1B, CYP2E1 gene polymorphism: association with alcohol dependence in Yakut population] // *Yakutskij medicinskij zhurnal – Yakut medical journal*. 2009; 2: 148–150. URL: <http://ymj.ykt.ru/files/YMJ-2-2009.pdf> (accessed 29 April 2016) (in Russian).
44. Golimbet V.E., Alfimova M.V., Shcherbatykh T.V., Rogaev E.I. Gene insertion and deletion polymorphism in the serotonin transporter gene and personality traits measured by MMPI // *Genetika*. 2003; Apr., 39 (4): 534–539.
45. Hu X., Oroszi G., Chun J. et al. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005; Jan., 29 (1): 8–16.
46. Lesch K.P., Bengel D., Heils A. et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region // *Science*. 1996; Nov., 274 (5292): 1527–1531.
47. VanNess S.H., Owens M.J., Kilts C.D. The variable number of tandem repeats element in *DAT1* regulates in vitro dopamine transporter density // *BMC Genet.* 2005; 6: 55. doi: 10.1186/1471-2156-6-55. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/55> (accessed 29 April 2016).

Received May 06.2016

Accepted December 01.2016

**Marusin Anrey V.**, PhD, Scientific Researcher of Laboratory for Evolutionary Genetics, Research Institute for Medical Genetics, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Kornetov Alexander N.**, MD, Academic Dean of the Faculty of Behavioral Medicine and Management, Head of Department of Clinical Psychology and Psychotherapy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Swarovskaja Maria G.**, PhD, Scientific Researcher of Laboratory for Evolutionary Genetics, Research Institute for Medical Genetics, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Vagaiceva Kseniya V.**, PhD, Scientific Researcher of Laboratory for Evolutionary Genetics, Research Institute for Medical Genetics, TNRMC RAS, Scientific Researcher of Laboratory for Human Onthogenetics, NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

**Pavlenyk Ekaterina S.**, Student of Department of Clinical Psychology, Psychotherapy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Stepanov Vadim A.**, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory for Evolutionary Genetics, Research Institute for Medical Genetics, TNRMC RAS; Head of Laboratory for Human Onthogenetics, NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Marusin Anrey V.**, e-mail: [andrey.marusin@medgenetics.ru](mailto:andrey.marusin@medgenetics.ru)

УДК 591.477.35:612.014.44:599.323.4

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-97–104

Для цитирования: Мустафина Л.Р., Журавлева А.Д., Логвинов С.В., Карпова М.Р., Ласукова Т.В., Суханова Г.А., Ильинских Н.Н. Морфология экзоорбитальных слезных желез беспородных белых крыс при высокоинтенсивном световом воздействии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 97–104

## Морфология экзоорбитальных слезных желез беспородных белых крыс при высокоинтенсивном световом воздействии

Мустафина Л.Р.<sup>1</sup>, Журавлева А.Д.<sup>1</sup>, Логвинов С.В.<sup>1</sup>, Карпова М.Р.<sup>1</sup>,  
Ласукова Т.В.<sup>2</sup>, Суханова Г.А.<sup>1</sup>, Ильинских Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Томский государственный педагогический университет (ТГПУ)  
Россия, 634061, г. Томск, ул. Киевская, 60А

### РЕЗЮМЕ

**Цель:** изучить морфологические изменения экзоорбитальных слезных желез при экспериментальном воздействии на орган зрения высокоинтенсивного света.

**Материал и методы.** Белых беспородных крыс-самцов ( $n = 40$ ) подвергали непрерывному воздействию света интенсивностью 3 500 лк в течение 1 сут, 7, 14 и 30 сут, контрольная группа ( $n = 10$ ) содержалась в условиях естественного освещения (20 лк) в течение 1–30 сут. Экзоорбитальные слезные железы фиксировали в формалине, заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи окулярной вставки Автандилова подсчитывали удельные объемы выводных протоков, эпителия, стромы и сосудов экзоорбитальной слезной железы, определяли эпителио-стромальное соотношение. Анализ данных осуществляли методами описательной статистики с вычислением медианы ( $Me$ ) и интерквартильного интервала ( $Q_1-Q_3$ ). Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

**Результаты.** Через 1 сут в ответ на высокоинтенсивное световое воздействие возникало рефлекторное усиление синтетической функции экзоорбитальной слезной железы. На 7-е сут появлялись первые признаки нарушения функционирования с развитием гидропической дистрофии в лакримацитах. К 14-м сут развивались фиброзные изменения, в железистой паренхиме появлялись участки гардеризации. На 30-е сут наблюдался пикноз ядер отдельных лакримацитов, накопление липофусцина в цитоплазме.

**Заключение.** Полученные данные позволяют в динамике оценить реактивные компенсаторно-приспособительные реакции слезной железы на высокоинтенсивное световое воздействие от момента начала их развития до появления первых признаков декомпенсации.

**Ключевые слова:** экзоорбитальная слезная железа, высокоинтенсивное световое воздействие.

### ВВЕДЕНИЕ

Экзоорбитальная слезная железа у белых крыс располагается вне глазницы, чуть ниже уха и соединяется с поверхностью глазного яблока одним длинным выводным протоком [1]. Желе-

за окружена собственной соединительнотканной капсулой, имеет альвеолярно-трубчатое строение: ацинусы состоят из лакримацитов, которые синтезируют и выделяют белки, воду и электролиты, участвующие в формировании слезной жидкости. Слеза является неотъемлемым компонентом органа зрения, обеспечивая увлажнение передней

✉ Мустафина Лилия Рамильевна, e-mail: mustafinalr@rambler.ru

поверхности глазного яблока и прозрачность роговицы, защиту от инфекции, а также способствует заживлению ран при повреждениях [2].

К нарушениям функционирования слезных желез могут приводить различные факторы, воздействующие на орган зрения, в том числе и те, с которыми мы сталкиваемся в повседневной жизни, например ультрафиолетовое излучение, электромагнитное излучение от видеомониторов компьютеров, а также яркий свет от искусственных источников освещения. Перечисленные факторы приводят к активации чувствительных нервных окончаний роговицы и конъюнктивы с последующим рефлекторным усилением секреции слезных желез [3, 4]. В случае нарушения синтеза или выделения слезной жидкости развиваются сухость и жжение глаз, воспалительные изменения, снижается острота зрения, что является проявлением синдрома «сухого» глаза. Стоит заметить, что люди, чья профессиональная деятельность затрагивает работу с источниками интенсивного излучения, находятся в повышенной зоне риска по развитию повреждений слезного аппарата. Поэтому исследование, направленное на изучение характера и степени повреждений при работе с источниками интенсивного светового воздействия, может положить основу для разработки мер индивидуальной защиты.

Целью данного исследования явилось изучение морфологических изменений экзоорбитальных слезных желез при экспериментальном воздействии на орган зрения высокоинтенсивного света.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования являлись экзоорбитальные слезные железы белых беспородных крыс-самцов в возрасте 3 мес. Животных подвергали непрерывному воздействию света интенсивностью 3 500 лк в течение 1 сут ( $n = 10$ ), 7 сут ( $n = 10$ ), 14 сут ( $n = 10$ ) и 30 сут ( $n = 10$ ). Контрольную группу ( $n = 10$ ) содержали в условиях естественного освещения (интенсивность освещения 20 лк в течение 12 ч). Животных выводили из эксперимента одновременно в различные сроки для учета возможных временных изменений. Полученные объекты фиксировали в 12%-м растворе нейтрального формалина и по общепринятой методике заливали в парафин. Срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи окулярной вставки Автандилова на 50 точек подсчитывали удельные объемы (%) выводных протоков, эпителия, стромы и сосудов экзоорбитальной слезной железы, определяли эпителио-стромальное соотношение (ЭСС). Подсчет,

просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на световом микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия), при увеличении окуляра 10, объектива 40, 90. Статистическую обработку данных проводили при помощи компьютерной программы Statistica 6.0. Анализ полученных данных осуществляли методами описательной статистики с вычислением медианы ( $Me$ ) и интерквартильного интервала ( $Q_1-Q_3$ ). Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия между показателями сравниваемых групп считали значимыми при  $p < 0,05$ , при  $p = 0,055-0,060$  высказывались о тенденции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сут светового воздействия в экзоорбитальных слезных железах отмечался умеренный отек внутри- и междольковой стромы. Венозные сосуды характеризовались неравномерно выраженным полнокровием с явлениями лейкостаза. Лакримациты содержали одно, реже два ядра, в которых четко визуализировались ядрышки. Некоторые ядра имели неправильную форму с неравномерно конденсированным в них хроматином. Цитоплазма лакримацитов окрашивалась слабобазофильно, выглядела мелкозернистой. Просветы большинства внутридольковых выводных протоков были заполнены секретом.

Через 7 сут высокоинтенсивного светового воздействия сохранялся периваскулярный и перидуктулярный отек стромы. В расширенных и полнокровных сосудах наблюдалось прикраевое стояние лейкоцитов. Ядра большинства железистых клеток были увеличены, с неравномерно конденсированным хроматином, в цитоплазме части лакримацитов отмечались явления вакуольной дистрофии (рис. 1). В выводных протоках содержалось небольшое или умеренное количество секрета.

На 14-е сут наблюдалось разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани во внутри- и междольковой строме, а также периваскулярно (рис. 2). Сосуды характеризовались умеренным венозным полнокровием. Ядра большинства секреторных клеток различались по форме и размеру, встречались двуядерные клетки, а также клетки с полиплоидными ядрами. В цитоплазме лакримацитов наблюдалось прогрессирование вакуольной дистрофии. Отмечалось расширение междольковых выводных протоков с небольшим количеством секрета в их просветах.

Местами среди концевых отделов экзоорбитальной слезной железы появлялись участки гардеризации (рис. 3).

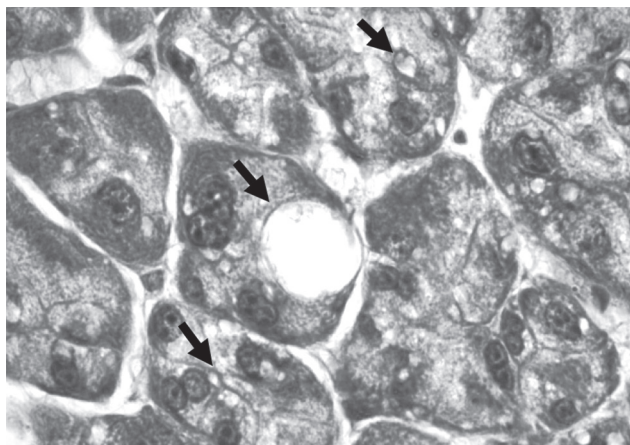


Рис. 1. Явления вакуольной дистрофии лакримацитов (указаны стрелками) в экзоорбитальной слезной железе через 7 сут после интенсивного светового воздействия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 900

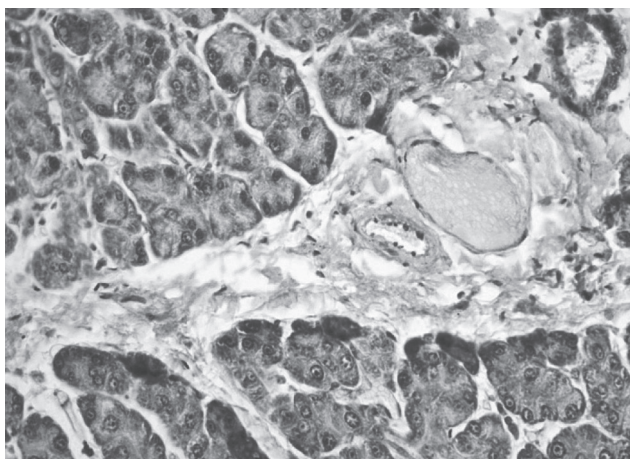


Рис. 2. Разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани в междольковой строме экзоорбитальной слезной железы через 14 сут после интенсивного светового воздействия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

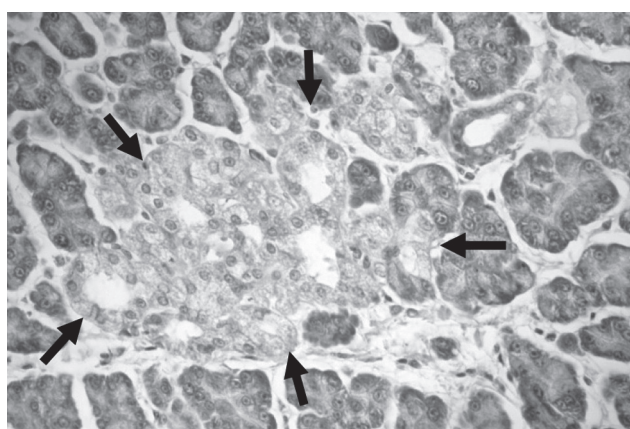


Рис. 3. Участки гардеризации (указаны стрелками) в строме экзоорбитальной слезной железы через 14 сут после интенсивного светового воздействия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

На 30-е сут светового воздействия в строме железы наблюдалось значительное разрастание соединительной ткани. В сосудах отмечалось умеренно выраженное полнокровие. В отличие от предыдущих сроков эксперимента в железистых клетках появлялось все больше крупных полиплоидных ядер, наряду с которыми встречались клетки с кариопикнозом. В цитоплазме визуализировались вакуоли разных размеров, которые нередко заполняли всю цитоплазму, вызывая деформацию и смещение ядра на периферию клетки. В отдельных лакримацитах встречались гранулы липофусцина (рис. 4). Во внутри- и междольковых выводных протоках содержались следы секрета.

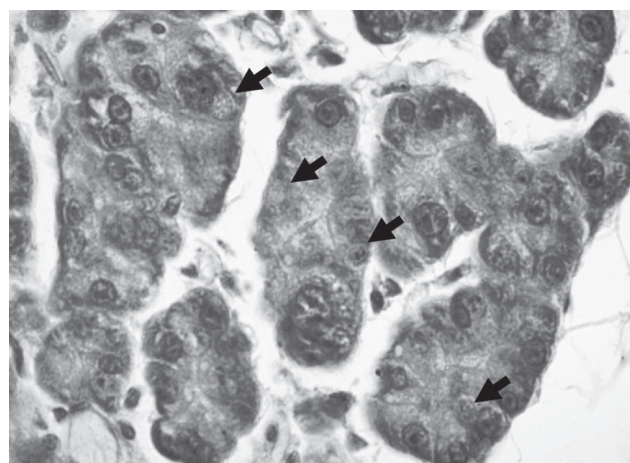


Рис. 4. Накопление липофусцина (указано стрелками) в цитоплазме лакримацитов экзоорбитальной слезной железы через 30 сут после интенсивного светового воздействия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 900

При анализе структурных компонентов экзоорбитальной слезной железы было установлено, что в 1–7-е сут интенсивного светового воздействия статистически значимо увеличивались удельные объемы эпителия (таблица). При этом удельные объемы стромы в те же периоды воздействия, напротив, достоверно уменьшались.

В более поздние сроки светового воздействия наблюдалось уменьшение удельных объемов эпителия желез, при этом к 14-м сут показатели достигали контрольных значений, а к 30-м сут значимо снижались по сравнению с группой контроля. Удельные объемы стромы с увеличением срока эксперимента нарастали и к 30-м сут превышали показатели контрольной группы более, чем в 1,5 раза.

Анализ уровня ЭСС показал его тенденцию к увеличению в 1-е (7,8) и 7-е (6,8) сут и уменьшению к 14-м (2,8) и 30-м (1,8) сут воздействия по сравнению с показателем в группе контрольных животных (3,8).

Т а б л и ц а

| Удельный объем структурных компонентов слезной железы при высокоинтенсивном световом воздействии, $Me (Q_1-Q_3)$ , % |                                          |                                         |                                       |                                        |                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Структура                                                                                                            | Контроль<br>( $n = 10$ )                 | Продолжительность светового воздействия |                                       |                                        |                                        |
|                                                                                                                      |                                          | 1 сут<br>( $n = 10$ )                   | 7 сут<br>( $n = 10$ )                 | 14 сут<br>( $n = 10$ )                 | 30 сут<br>( $n = 10$ )                 |
| Эпителий концевых отделов                                                                                            | 57,8 <sup>1,7</sup><br>(49,6–63,1)       | 65,7 <sup>*14,30</sup><br>(59,1–72,8)   | 63,3 <sup>*14,30</sup><br>(52,8–72,8) | 57,0 <sup>1,7,30</sup><br>(49,9–65,4)  | 49,2 <sup>1,7,14</sup><br>(42,2–54,9)  |
| Строма                                                                                                               | 17,1 <sup>1,7,14,30</sup><br>(11,4–26,0) | 8,4 <sup>*14,30</sup><br>(4,2–14,0)     | 9,2 <sup>*14,30</sup><br>(5,6–21,1)   | 19,7 <sup>*1,7,30</sup><br>(14,0–28,1) | 28,1 <sup>*1,7,14</sup><br>(19,7–30,9) |
| Сосуды                                                                                                               | 2,8<br>(1,4–4,9)                         | 2,8<br>(1,4–4,2)                        | 2,8<br>(1,4–4,2)                      | 2,8<br>(1,4–4,2)                       | 2,8<br>(1,4–4,2)                       |
| Выводные протоки                                                                                                     | 2,8<br>(1,4–4,2)                         | 2,8<br>(1,4–4,2)                        | 2,8<br>(1,4–2,8)                      | 2,4<br>(1,4–2,8)                       | 1,4<br>(1,4–1,4)                       |

\* статистически значимые различия с контрольной группой; <sup>1,7,14,30</sup> статистически значимые различия с группами с воздействием света в течение 1 сут, 7, 14, 30 сут соответственно.

Статистически значимых различий в удельных объемах сосудов и выводных протоков во все сроки эксперимента не отмечалось.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в настоящем исследовании результаты продемонстрировали универсальные реактивные изменения, развивающиеся в экзоорбитальных слезных железах в ответ на интенсивное световое воздействие. Признаки острого венозного застоя и отека явлений, выявленные в ранние сроки воздействия (1–7-е сут) в строме железы, являются неспецифической реакцией органа на внешнее повреждение. Так, аналогичные реактивные изменения слезных желез были показаны в эксперименте при изучении влияния на орган зрения ультрафиолетовых лучей, микроволн, ионизирующей радиации [4–6].

Выявленные гемодинамические изменения, сопровождавшиеся развитием местной гипоксии тканей, явились мощным стимулятором коллагенообразования, что на 14–30-е сут светового воздействия привело к развитию в строме железы фиброзных изменений. Ряд исследователей сообщали о подобных нарушениях функционирования желез в отдаленные сроки (от 30 сут и более) после однократного ионизирующего воздействия [7, 8]. Морфологически установленные признаки нарушения процессов регенерации и выраженный фиброз со временем приводили к значительной атрофии или гибели ацинарных клеток.

Реактивные изменения лакримацитов были связаны с необходимостью усиленной, рефлекторно обусловленной выработки слезной жидкости в ответ на слепящее воздействие яркого света [3]. Таким образом, интенсивные внутриклеточные синтетические процессы нашли свое отражение в увеличении удельных объемов эпителия и

ЭСС на 1–7-е сут воздействия. Полученные результаты совпадают с данными других исследователей, изучавших действие различных факторов на орган зрения и слезные железы.

В эксперименте, проведенном для выяснения влияния излучения видеомониторов на выработку слезной жидкости, отмечено увеличение объема лакримацитов за счет накопления секреторных гранул в их цитоплазме [9]. При однократном облучении экспериментальных животных в дозе 15 Гр наблюдались изменения со стороны ядер лакримацитов и скопление секреторных гранул в их цитоплазме, однако выделение гранул было затруднено, что клинически сопровождалось проявлениями синдрома «сухого» глаза [10].

Вероятно, вакуолизация цитоплазмы лакримацитов, наблюдаемая с 7-х и прогрессирующая к 30-м сут эксперимента, обусловлена длительным функциональным перенапряжением слезной железы в ответ на непрерывное воздействие света. Подтверждением высказанного предположения могут служить данные других исследователей. Так, ультрамикроскопическое исследование слезных желез при экспериментально воспроизведенном синдроме «сухого» глаза позволило установить изменения метаболизма в слезной железе, в том числе усиление гликолитической деятельности, появление аутофагосом, интрацитоплазматической вакуолизации и нарушение крист митохондрий [11]. При экспериментальном трехкратном ультрафиолетовом облучении отмечалось повышение активности НАД- и НАДФ-тетразолий редуктаз, увеличение концентрации РНК, основного и общего белка в цитоплазме лакримацитов в сочетании с угнетением активности щелочной фосфатазы – фермента, участвующего в регуляции проницаемости клеточных мембран [4, 5]. Возможно, с нарушением проницаемости

мембран клетки связано затруднение выхода секреторных гранул из ацинарных клеток.

Повышенная функциональная нагрузка на слезные железы в 1–7-е сут эксперимента стала причиной полиплоидизации лакримацитов, а в более поздние сроки (14–30-е сут) привела к истощению и дегенерации железистых клеток, что морфологически проявлялось появлением пикноморфно измененных ядер. Подобная гистологическая картина наблюдалась в экзоорбитальных слезных железах белых крыс при ультрафиолетовом и микроволновом воздействиях, при ионизирующем облучении [3–5]. Полиплоидизация ядер лакримацитов у крыс является особенностью соматического роста до 3 мес постнатального развития, у взрослых же особей полиплоидные ядра могут появляться при истощении метаболических возможностей клетки и служить способом репаративной регенерации [12].

Обнаруженные в цитоплазме лакримацитов на 30-е сут светового воздействия гранулы липофусцина являются отражением преждевременного старения клеток, что предполагает пониженный уровень клеточной секреторной активности [13]. Так, при ультраструктурном исследовании влияния старения на структуру слезной железы крыс-альбиносов наблюдалось снижение электронно-плотных секреторных везикул, набухание митохондрий и накопление включений липофусцина в цитоплазме ацинарных клеток [14]. Липофусцин является общепринятым биомаркером старения и состоит из гетерогенной группы комплексных аутофлуоресцирующих агрегатов, образованных из продуктов окисления липидов, белков и ионов металлов [13]. Он постепенно накапливается в лизосомах постмитотических клеток путем деградации или экзоцитоза. По мнению некоторых авторов, накопление липофусцина в клетках ускоряется при повышении свободных радикалов в условиях окислительного стресса [15]. В данном случае ускоренное старение лакримацитов с накоплением липофусциновых гранул в их цитоплазме, вероятно, было спровоцировано высокоинтенсивным световым воздействием.

Появление на 14-е сут воздействия среди концевых отделов экзоорбитальной слезной железы участков железы Гардера, известное как феномен гардеризации, может быть связано как с процессами старения, так и с метаплазией, инициированной высокоинтенсивным световым воздействием. В пользу первого утверждения свидетельствует исследование Ferrara D. и соавт., которые наблюдали появление липидных очагов в экзоорбиталь-

ных слезных железах 3-месячных самок и самцов крыс; при этом к 6-месячному возрасту у самцов явления гардеризации нарастали, а у самок исчезали [16]. На стимуляцию метапластического процесса указывают данные других исследователей, которые отмечали появление очагов гардеризации при стимуляции опухолевого роста DL-этионином в 67% случаев, тогда как в контрольной группе подобные явления были отмечены лишь у 9% животных [17]. Гардеризация была описана также в экзоорбитальных железах крыс при воздействии ионизирующей радиации, ультрафиолета и микроволн [4–6]. Очевидно, что высокоинтенсивное световое воздействие является фактором, способствующим появлению и (или) усилению гардеризации экзоорбитальной слезной железы у беспородных белых крыс.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, высокоинтенсивное световое воздействие в 1-е сут приводит к рефлекторному усилению синтетической функции экзоорбитальной слезной железы, о чем свидетельствует увеличение объема железистой ткани и наличие секрета в просветах выводных протоков. Через 7 сут в лакримацитах появляются первые признаки нарушения функционирования: усиление секреции приводит к развитию гидропической дистрофии. К 14-м сут в строме развиваются фиброзные изменения, среди концевых отделов экзоорбитальной железы появляются участки гардеризации. На 30-е сут непрерывное воздействие светом приводит к пикнозу ядер отдельных лакримацитов, накоплению липофусцина в цитоплазме.

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют в динамике оценить реактивные компенсаторно-приспособительные реакции слезной железы на высокоинтенсивное световое воздействие от момента начала их развития до появления первых признаков декомпенсации.

## 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

Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с Международными

рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985). Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 3653 от 28.04.2014 г.).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Venable J., Grafflin A. Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat // *J. Mammalogy*. 1940; 21 (1): 66–71.
2. Conrady C.D., Joos Z.P., Patel B.C.K. Review: The lacrimal gland and its role in dry eye // *Journal of Ophthalmology*. 2016; 7542929. DOI 10.1155/2016/7542929.
3. Rocha E.M., Alves M., Rios J.D., Dartt D.A. The aging lacrimal gland: changes in structure and function // *The Ocular Surface*. 2008; 6 (4): 162–174.
4. Рыжов А.И., Логвинов С.В., Ягницына А.А. Морфология слезного аппарата белых крыс при воздействии ультрафиолетовых лучей. Томск, 1984. 8 с. Рукопись предоставлена Томским мед. ин-том. Деп. в ВИНТИ 14.06.1984. № 4422-84 Деп.
5. Логвинов С.В. Морфология слезного аппарата белой крысы при воздействии микроволн. Томск, 1984. 9 с. Рукопись предоставлена Томским мед. ин-том. Деп. в ВИНТИ 15.03.1984. № 1455-84 Деп.
6. Логвинов С.В. Морфология слезной экзоорбитальной железы после дробного воздействия рентгеновыми лучами // *Вопр. теорет. и клинич. медицины*. Томский мед. институт. 1984; 10: 78–81.
7. Li J., Shan Z., Ou G. et al. Structural and functional characteristics of irradiation damage to parotid glands in the miniature pig // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2005; 62: 1510–1516.
8. Muhvic-Urek M., Bralic M., Curic S. et al. Imbalance between apoptosis and proliferation causes late radiation damage of salivary gland in mouse // *Physiol. Res.* 2006; 55: 89–95.
9. Nakamura S., Kinoshita S., Yokoi N. et al. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. Chakravarti S., ed. PLoS ONE. 2010; 5 (6): e11119.
10. Hakim S.G., Schroder C., Geerling G. et al. Early and late immunohistochemical and ultrastructural changes associated with functional impairment of the lacrimal gland following external beam radiation // *International Journal of Experimental Pathology*. 2006; 87 (1): 65–71.
11. Seo Y., Ji Y.W., Lee S.M. et al. Activation of HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ) prevents dry eye-induced acinar cell death in the lacrimal gland // *Cell Death & Disease*. 2014; 5(6): e1309.
12. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981: 260.
13. Rhos J.D., Horikawa Y., Chen L.-L. et al. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response // *Experimental eye research*. 2005; 80 (4): 477–491. DOI 10.1016/j.exer.2004.10.012.
14. El-Fadaly A.B., El-Shaarawy E.A.A., Rizk A.A. et al. Age-related alterations in the lacrimal gland of adult albino rat: A light and electron microscopic study // *Ann. Anat.* 2014; 196 (5): 336–351. DOI 10.1016/j.aanat.2014.06.005.
15. Porta E.A. Dietary factors in lipofuscinogenesis and ceroidogenesis. // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2002; 34: 319–327.
16. Benson W.R. Acceleration of aging changes in the exorbital lacrimal gland of the female rat // *The American Journal of Pathology*. 1964; 45 (4): 587–597.
17. Ferrara D., Monteforte R., Baccari G. et al. Androgen and estrogen receptors expression in the rat exorbital lacrimal gland in relation to “harderianization” // *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*. 2004; 301 (4): 297–306.

Поступила в редакцию 02.06.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Мустафина Лилия Рамильевна, д-р мед. наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, СибГМУ, г. Томск.

Журавлева Анна Дэвидовна, студентка 5-го курса, СибГМУ, г. Томск.

Логвинов Сергей Валентинович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, СибГМУ, г. Томск.

Карпова Мария Ростиславовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, СибГМУ, г. Томск.

Ласукова Татьяна Викторовна, д-р биол. наук, профессор медико-биологических дисциплин, ТГПУ, г. Томск.

Суханова Галина Алексеевна, д-р биол. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии, СибГМУ, г. Томск.

Ильинских Николай Николаевич, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Мустафина Лилия Рамильевна, mustafinalr@rambler.ru

УДК 591.477.35:612.014.44:599.323.4

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-97–104

For citation: Mustafina L.R., Zhuravleva A.D., Logvinov S.V., Karpova M.R., Lasukova T.V., Sukhanova G.A., Ilinskich N.N. Morphology of exorbital lacrimal glands of not purebred white rats at high-intensity light influence. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 97–104

## Morphology of exorbital lacrimal glands of not purebred white rats at high-intensity light influence

Mustafina L.R.<sup>1</sup>, Zhuravleva A.D.<sup>1</sup>, Logvinov S.V.<sup>1</sup>, Karpova M.R.<sup>1</sup>,  
Lasukova T.V.<sup>2</sup>, Sukhanova G.A.<sup>1</sup>, Ilinskich N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Tomsk State Pedagogical University  
60a, Kievskaya Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

### ABSTRACT

**Purpose:** this study morphological changes the exorbital lacrimal glands at experimental impact on an organ of vision of high-intensity light.

**Material and methods.** White not purebred rats males ( $n = 40$ ) were subjected to continuous influence of light intensity by 3500 lx within 1, 7, 14 and 30 days, the control group ( $n = 10$ ) contained in conditions of natural lighting (20 lx). Exorbital lacrimal glands fixed in formalin, embedded in paraffin wax, stained hematoxylin-eosine. By means of an ocular insert of Avtandilov counted specific volumes of output channels, an epithelium, stroma and vessels of exorbital lacrimal glands, defined an epitelio/stroma ratio. The analysis of data was carried out by methods of descriptive statistics with calculation of a median ( $Me$ ) and interquartile range ( $Q_1-Q_3$ ). For an assessment of distinctions used nonparametric criterion of Mann – Whitney.

**Results.** In 1 days in response to high-intensity light influence there is a reflex strengthening of synthetic function of exorbital lacrimal glands. For the 7th days the first signs of violation of functioning with development of hydropic dystrophy in the lacrimocytes appear. By 14th days fibrous changes develop, in a glandular parenchyma harderization sites appear. For the 30th days the nuclear pycnosis of separate lacrimacit, accumulation of a lipofuscin in cytoplasm is observed.

**Conclusion.** The obtained data allow to estimate in dynamics compensatory and adaptive reactions of lacrimal gland in response to high-intensity light influence from the moment of the beginning of their development before emergence of the first signs of a decompensation.

**Key words:** exorbital lacrimal glands, high-intensity light influence.

### REFERENCES

1. Venable J., Grafflin A. Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat // *J. Mammalogy*. 1940; 21 (1): 66–71.
2. Conrady C.D., Joos Z.P., Patel B.C.K. Review: The lacrimal gland and its role in dry eye // *Journal of Ophthalmology*. 2016; 7542929. DOI 10.1155/2016/7542929.
3. Rocha E.M., Alves M., Rios J.D., Dartt D.A. The aging lacrimal gland: changes in structure and function // *The Ocular Surface*. 2008; 6 (4): 162–174.
4. Ryzhov A.I., Logvinov S.V., Yagnitsyna A.A. Morfologiya sleznogo apparata belykh kryss pri vozdeystvii ultrafioletovykh luchey. Tomsk. 1984. 8 s. Rukopis predostav-
5. Logvinov S.V. Morfologiya sleznogo apparata beloy kryssy pri vozdeystvii mikrovoln. Tomsk. 1984. 9 s. Rukopis predostavlena Tomskim med. in-tom. Dep. v VINITI 15.03.1984. № 1455-84 Dep. (in Russian).
6. Logvinov S.V. Morfologiya sleznoy ekzorbitalnoy zhelezy posle drobnogo vozdeystviya rentgenovymi luchami // *Vopr.teoret.i klinich.meditiny*. Tomskiy med.institut. 1984; 10: 78–81 (in Russian).
7. Li J., Shan Z., Ou G. et al. Structural and functional characteristics of irradiation damage to parotid glands in the miniature pig // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2005; 62: 1510–1516.

8. Muhvic-Urek M., Bralic M., Curic S. et al. Imbalance between apoptosis and proliferation causes late radiation damage of salivary gland in mouse // *Physiol. Res.* 2006; 55: 89–95.
9. Nakamura S., Kinoshita S., Yokoi N. et al. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. Chakravarti S., ed. *PLoS ONE*. 2010; 5 (6): e11119.
10. Hakim S.G., Schroder C., Geerling G. et al. Early and late immunohistochemical and ultrastructural changes associated with functional impairment of the lachrymal gland following external beam radiation // *International Journal of Experimental Pathology*. 2006; 87 (1): 65–71.
11. Seo Y., Ji Y.W., Lee S.M. et al. Activation of HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ) prevents dry eye-induced acinar cell death in the lacrimal gland // *Cell Death & Disease*. 2014; 5(6): e1309.
12. Brodskiy V.Ya., Uryvayeva I.V. Kletochная poliploidiya. Proliferatsiya i differentsirovka. M.: Nauka, 1981: 260 (in Russian).
13. Rhos J.D., Horikawa Y., Chen L.-L. et al. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response // *Experimental eye research*. 2005; 80 (4): 477–491. DOI 10.1016/j.exer.2004.10.012.
14. El-Fadaly A.B., El-Shaarawy E.A.A., Rizk A.A. et al. Age-related alterations in the lacrimal gland of adult albino rat: A light and electron microscopic study // *Ann. Anat.* 2014; 196 (5): 336–351. DOI 10.1016/j.aanat.2014.06.005.
15. Porta E.A. Dietary factors in lipofuscinogenesis and ceroidogenesis. // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2002; 34: 319–327.
16. Benson W.R. Acceleration of aging changes in the exorbital lacrimal gland of the female rat // *The American Journal of Pathology*. 1964; 45 (4): 587–597.
17. Ferrara D., Monteforte R., Baccari G. et al. Androgen and estrogen receptors expression in the rat exorbital lacrimal gland in relation to “harderianization” // *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*. 2004; 301 (4): 297–306.

Received June 02.2016

Accepted December 01.2016

**Mustafina Lilia R.**, DM, Professor of Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhuravleva Anna D.**, 5-year Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Logvinov Sergey V.**, DM, Professor, Head of Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Karpova Mariya R.**, MD, Professor, Head of Department Microbiology and Virology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Lasukova Tatjana V.**, DBSc, Professor, Department of Biomedical Sciences, Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russian Federation.

**Sukhanova Galina A.**, DBSc, Professor, Biochemistry and Molecular Biology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Ilinskich Nikolai N.**, DBSc, Professor, Head of Department Biology and Genetics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Mustafina Lilia R.**, e-mail: mustafinalr@rambler.ru

УДК 577.352.4:576.32

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-105–112

Для цитирования: Орлов С.Н., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Рыдченко В.С., Бирулина Ю.Г., Байков А.Н., Васильев В.Н., Суханова Г.А., Федорова Т.С., Ласукова Т.В. Роль калиевой проводимости мембраны в механизмах действия внеклеточного АТФ на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 105–112

## Роль калиевой проводимости мембраны в механизмах действия внеклеточного АТФ на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток

Орлов С.Н.<sup>1,2</sup>, Смаглий Л.В.<sup>1</sup>, Гусакова С.В.<sup>1</sup>, Рыдченко В.С.<sup>1</sup>, Бирулина Ю.Г.<sup>1</sup>, Байков А.Н.<sup>1</sup>, Васильев В.Н.<sup>1</sup>, Суханова Г.А.<sup>1</sup>, Федорова Т.С.<sup>1</sup>, Ласукова Т.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1

<sup>3</sup> Томский государственный педагогический университет (ТГПУ)  
Россия, 634061, г. Томск, ул. Киевская, 60а

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – исследовать влияние внеклеточного аденозин-5'-трифосфата (АТФ), являющегося активатором пуриnergических рецепторов, на сократительную активность кольцевых сегментов аорты крысы, предсокращенных активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрином, а также оценить вклад отдельных компонентов калиевой проводимости мембраны в механизмы действия АТФ.

**Материал и методы.** Исследование сократительной активности гладкомышечных клеток проводили методом механографии на сегментах грудного отдела аорты крысы как с интактным эндотелием, так и деэндотелизованных. АТФ (1–1000 мкМ) оказывал дозозависимое релаксирующее действие на предсокращенные фенилэфрином сегменты с интактным эндотелием и леэндотелизованные. Чтобы оценить вклад калиевых каналов в механизмы действия АТФ, использовали неселективный блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (10 мМ), блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламид и блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-аминопиридин.

**Результаты.** Использование указанных блокаторов показало, что действие АТФ на сегменты с интактным эндотелием зависит от АТФ-чувствительных калиевых каналов, а на деэндотелизованные сегменты – от АТФ-чувствительных и потенциал-зависимых калиевых каналов.

**Ключевые слова:** АТФ, гладкомышечные клетки, калиевые каналы.

### ВВЕДЕНИЕ

В 1972 г. Burnstock ввел понятие пуриnergической сигнализации [1], в которой в качестве внеклеточных сигнальных молекул выступали внеклеточные пурины (прежде всего аденозин-5'-трифосфат (АТФ), аденозин и пиримидин).

✉ Смаглий Людмила Вячеславовна, e-mail: lud.smagly@yandex.ru

Эти соединения высвобождаются из клеток посредством диффузии через мембранные гемиканалы, активации мембранных транспортеров, везикулярного экзоцитоза [2–5], либо из гибнущих клеток, что также является ранним индикатором их повреждения [3, 6]. Среди пуриnergических рецепторов выделяют метаботропные рецепторы аденозина P1 и нуклеотидные рецепторы P2,

которые подразделяются на подклассы P2Y (метаболические) и P2X (ионотропные) [2, 7–11]. Как P2X, так и рецепторы P2Y активируются действием АТФ. АТФ-зависимые механизмы трансдукции сигнала выявлены практически во всех типах клеток и тканях [12].

Известно, что пуриnergическая сигнальная система играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса. Механизмы такой регуляции варьируют в зависимости от типа кровеносного сосуда, его физиологической роли и вида животного организма [8, 13, 14].

Показано, что констрикторное действие АТФ обусловлено активацией P2X1-рецепторов мембран гладкомышечных клеток (ГМК) и усилением входящих натриевых и кальциевых токов [15, 16]. С другой стороны, при действии на рецепторы мембран эндотелиальных клеток P2Y1 и P2Y2 АТФ способствует повышению внутриклеточной концентрации кальция ( $Ca^{2+}$ ) с последующей активацией эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и усилением синтеза NO, который, в свою очередь, влияет на расслабление подлежащих ГМК [17, 18]. Расслабление сосудистых ГМК (СГМК) тесно связано с выходящими калиевыми токами. Предположительно, эти токи могут играть важную роль в АТФ-индуцированном расслаблении СГМК.

В связи с этой целью работы являлось изучение роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия внеклеточного АТФ на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили изолированные гладкомышечные сегменты грудного отдела аорты самцов крыс линии Wistar весом 180–250 г. Грудную часть аорты помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, удаляли жировую и соединительную ткань и выделяли кольцевые сегменты шириной 2–3 мм. Использовались сегменты с сохраненным эндотелием и деэндотелизированные. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 мин непосредственно перед выполнением эксперимента.

Измерение механического напряжения (МН) сосудистых гладкомышечных клеток проводилось с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (Германия). Для этого кольцевые сегменты аорты крысы фиксировали в рабочей камере объемом 10 мл и растягивали нагрузкой 500 мг. Камеру заполняли

физиологическим раствором Кребса и термостатировали при 37 °C в течение 50 мин при pH = 7,4. Сокращения индуцировали гиперкалиевым раствором, который готовили путем эквимольного замещения 30 мМ NaCl на KCl, а также активатором  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрином (ФЭ) в концентрации 10 мкМ. Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса или ФЭ, которые принимали за 100%.

Анализ полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows. Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова – Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии. Для оценки достоверности влияния АТФ на величину МН сегментов аорты крысы использовали Т-критерий Уилкоксона для зависимых выборок. Для сравнения величин МН сегментов при действии используемых концентраций АТФ в различных условиях (наличие и отсутствие блокатора калиевых каналов, деэндотелизированные сегменты и сегменты с интактным эндотелием) использовали U-критерий Манна – Уитни для независимых выборок. Фактические данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ( $Q_1$ – $Q_3$ ). Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Сократительные ответы сосудистых гладких мышц инициируются многими физиологически активными веществами. В данной работе для изучения роли АТФ в регуляции сократительной активности СГМК в качестве предсокращающего агента использовали агонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов ФЭ, действующий через активацию протеинкиназы С. Известно, что рецепторы к АТФ располагаются как на мембране гладкомышечных клеток, так и на мембране эндотелиальных клеток. Поэтому проводили сравнение действия АТФ на сегменты аорты крысы с интактным эндотелием и деэндотелизированные.

### Влияние АТФ на сократительную активность сегментов аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином

На фоне ФЭ-индуцированного сокращения сегментов аорты крысы с интактным эндотелием добавление АТФ в концентрациях 1–1000 мкМ приводило к дозозависимому снижению МН

сосудов как с интактным эндотелием, так и де-эндотелизированных (рис.). В обоих случаях достоверное снижение величины МН относительно величины исходного сокращения наблюдалось при действии АТФ в концентрациях 10–1000 мкМ

( $p < 0,05$ ). При этом у деэндотелизированных сегментов величина расслабления при действии АТФ в концентрациях 50–1000 мкМ была достоверно выше по сравнению с сегментами с интактным эндотелием ( $p < 0,05$ ).

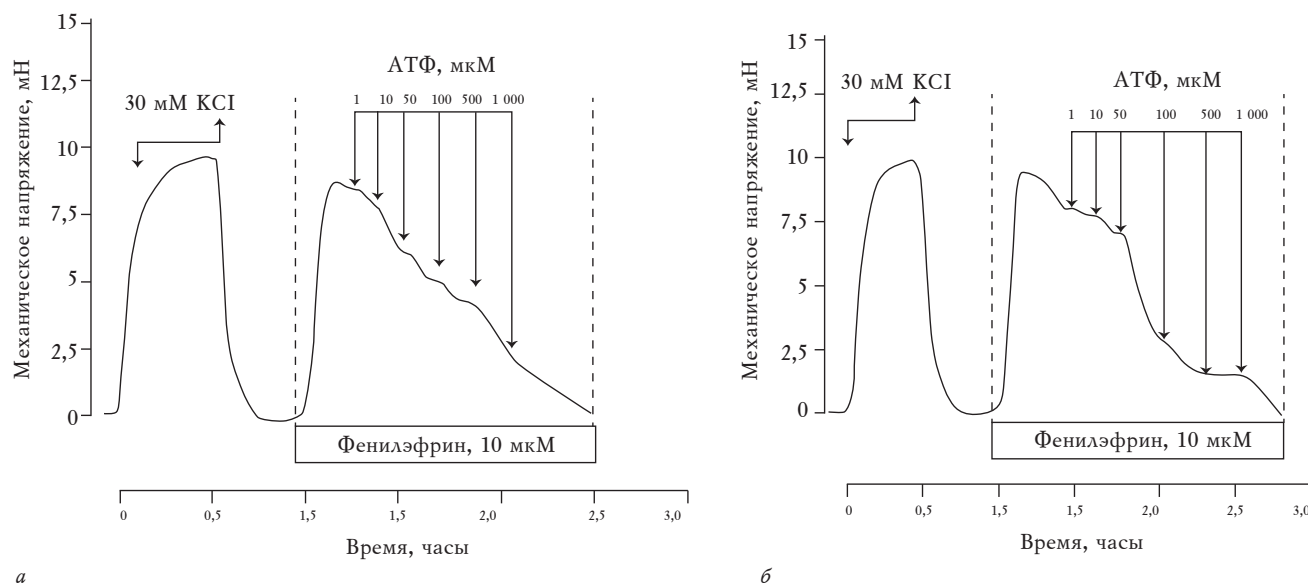


Рисунок. Влияние АТФ (1–1000 мкМ) на предсокращенные фенилэфрином (10 мкМ) сегменты аорты крысы: а – с интактным эндотелием; б – деэндотелизированные. Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

### Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия АТФ на сократительную активность сегментов аорты крысы

Для исследования роли калиевой проводимости мембраны в механизмах сосудорасслабляющего действия АТФ использовали блокатор кальций-активируемых ( $K^+_{Ca2+}$ -каналов) и потенциал-зависимых ( $K^+_v$ -каналов) каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 10 мМ, блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламид (ГБ) в концентрации 10 мкМ и блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-аминопиридин (4-АП) в концентрации 1 мМ.

Добавление блокатора потенциал-зависимых и кальций-активируемых калиевых каналов ТЭА (10 мМ) на фоне сокращения гладкомышечных сегментов с интактным и удаленным эндотелием приводило к увеличению МН на 30%. В обоих случаях ТЭА устранял релаксирующее действие 1–100 мкМ АТФ. Напротив, наблюдалось увеличение МН сегментов. В то же время величина релаксирующего действия 500–1000 мкМ АТФ достоверно снижалась (табл. 1, 2).

Блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламид в концентрации 10 мкМ увеличивал механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты крыс на 10,2 (3,8; –2,4)%. Добавление ГБ (10 мкМ) приводило к снижению степени расслабления сегментов с интактным эндотелием на всем диапазоне концентраций АТФ (см. табл. 1). При действии глибенкламида на деэндотелизированные сегменты наблюдалось незначительное снижение величины расслабления в ответ на АТФ (1–50 мкМ), тогда как АТФ в концентрациях выше 100 мкМ вызывал статистически значимое увеличение МН сегментов (см. табл. 2).

Блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-АП (1 мМ) приводил к увеличению МН сегментов аорты крысы, предсокращенных ФЭ, на 31,4 (2,5; –10,3)% от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. На фоне действия 4-АП на сегменты с интактным эндотелием релаксирующий эффект всех действующих концентраций АТФ увеличивался (см. табл. 1). Противоположный эффект получен на деэндотелизированных сегментах, предсокращенных ФЭ. На фоне действия 4-АП наблюдалось достоверное снижение величины расслабления в ответ на действие АТФ (10–1000 мкМ) (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 1

| Влияние блокаторов калиевых каналов на механическое напряжение кольцевых сегментов аорты крысы с интактным эндотелием, предсокращенных фенилэфрином, $Me (Q_1-Q_2)$ |                         |                         |                         |                         |                       |                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| Группа                                                                                                                                                              | Концентрация АТФ, мкМ   |                         |                         |                         |                       |                      |
|                                                                                                                                                                     | 1                       | 10                      | 50                      | 100                     | 500                   | 1000                 |
| Без блокаторов (контроль)                                                                                                                                           | 91,1<br>(81,9–93,9)     | 71,6<br>(49,3–85,0)     | 50,8<br>(48,5–54,5)     | 41,9<br>(39,2–45,8)     | 32,6<br>(25,2–35,5)   | 17,3<br>(2,0–16,0)   |
| + ТЭА (10 мМ)                                                                                                                                                       | 105,2*<br>(102,1–111,7) | 110,5*<br>(104,5–118,1) | 121,4*<br>(112,7–134,2) | 138,7*<br>(119,6–145,5) | 91,2*<br>(89,8–101,0) | 37,2*<br>(31,3–44,7) |
| + ГБ (10 мкМ)                                                                                                                                                       | 96,8<br>(87,7–98,2)     | 87,8<br>(81,6–96,5)     | 62,9*<br>(55,7–65,4)    | 59,6*<br>(55,7–62,0)    | 46,6*<br>(32,0–49,5)  | 44,3<br>(41,7–47,6)  |
| + 4-АП (1 мМ)                                                                                                                                                       | 85,9<br>(80,4–92,3)     | 70,9<br>(60,4–73,1)     | 35,8*<br>(31,1–40,4)    | 12,1*<br>(3,0–14,0)     | 0*                    | 0*                   |

\* различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), количество образцов  $n = 8$ .

Т а б л и ц а 2

| Влияние блокаторов калиевых каналов на механическое напряжение деэндотелизированных кольцевых сегментов аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином, $Me (Q_1-Q_2)$ |                        |                        |                         |                         |                         |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Группа                                                                                                                                                            | Концентрация АТФ, мкМ  |                        |                         |                         |                         |                         |
|                                                                                                                                                                   | 1                      | 10                     | 50                      | 100                     | 500                     | 1000                    |
| Без блокаторов (контроль)                                                                                                                                         | 96,1<br>(88,4–98,2)    | 87,9<br>(86,3–89,7)    | 29,9<br>(23,8–46,3)     | 17,4<br>(15,9–22,0)     | 16,5<br>(13,8–19,3)     | 13,3<br>(11,5–17,9)     |
| + ТЭА (10 мМ)                                                                                                                                                     | 100,4<br>(100,0–100,7) | 103,1*<br>(95,4–108,0) | 109,5*<br>(104,3–112,8) | 107,7*<br>(98,0–112,8)  | 80,5*<br>(76,6–85,2)    | 28,9*<br>(25,6–30,0)    |
| + ГБ (10 мкМ)                                                                                                                                                     | 96,9<br>(94,5–98,0)    | 95,5*<br>(94,2–96,4)   | 94,9*<br>(91,8–96,4)    | 146,9*<br>(144,6–149,2) | 117,9*<br>(111,6–127,7) | 104,8*<br>(101,6–108,5) |
| + 4-АП (1 мМ)                                                                                                                                                     | 97,2<br>(96,9–97,9)    | 95,5*<br>(93,7–97,0)   | 98,8*<br>(96,1–101,3)   | 105,9*<br>(103,3–110,9) | 81,1*<br>(71,9–89,6)    | 29,0*<br>(25,6–33,4)    |

\* различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), количество образцов  $n = 8$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

Пуринергическая сигнальная система играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов. Пуринергические рецепторы повсеместно экспрессированы на мембранах гладкомышечных и эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, что дает основание считать их патологическим субстратом развития сосудистых заболеваний [19]. Внеклеточный АТФ, действуя на P2X- и P2Y-рецепторы кровеносных сосудов, может как стимулировать, так и ингибировать сократительную активность СГМК. При этом сосудистые эффекты АТФ зависят от ряда условий, среди которых можно выделить условие целостности и достаточности функции эндотелия, а также механическое напряжение, при котором действует АТФ.

Согласно полученным данным, эффекты АТФ на ФЭ-индуцированное сокращение характеризовались дозозависимым снижением МН аорты крысы, при этом удаление эндотелия увеличивало величину расслабления. Действуя на пуринергические рецепторы эндотелиальных клеток, АТФ активирует входящие кальциевые токи, стимулирует эндотелиальную NO-синтазу и синтез NO. NO диффундирует в ГМК, где активирует

растворимую гуанилатциклазу, увеличивает синтез циклический ГМФ (цГМФ). Следует отметить, что eNOS представлена не только в эндотелиальных клетках, но и в ГМК [20]. В исследованиях, проведенных ранее разными авторами, было показано, что цГМФ участвует в активации и потенциал-зависимых, АТФ-чувствительных и кальций-активируемых калиевых каналов. Следовательно, цГМФ, увеличивая выходящий калиевый ток, способствует расслаблению ГМК [21–23].

Расслабление СГМК тесно связано с выходящими калиевыми токами. Исследование роли калиевой проводимости мембраны показало, что в сегментах, предсокращенных гиперкалиевым раствором, действие АТФ зависело только от потенциал-зависимых калиевых каналов. В сегментах, предсокращенных ФЭ, релаксирующий эффект АТФ снижался при действии глибенкламида и ТЭА. В сегментах с интактным эндотелием, в отличие от деэндотелизированных, блокирование потенциал-зависимых калиевых каналов 4-АП не снижало расслабляющего действия АТФ. Учитывая эти данные, а также тот факт, что ТЭА примерно в равной степени блокирует кальций-активируемые (большой и промежуточной проводимости) и потенциал-зависимые

калиевые каналы [24], можно предположить участие кальций-активируемых калиевых каналов в механизмах действия АТФ. Данное предположение подтверждается также работами других авторов [25]. Изменение действия АТФ с расслабляющего на сократительное в условиях блокирования калиевой проводимости мембраны может быть связано с угнетением активности eNOS. Показано, что в продукции оксида азота эндотелиальными клетками задействованы кальций-активируемые калиевые каналы малой и промежуточной проводимости [26]. Так как решающую роль при активации этих каналов играет выходящий калиевый ток, можно предположить, что активация других калиевых каналов будет способствовать аналогичному эффекту. С другой стороны, релаксирующее действие АТФ в деэндотелизированных сегментах, в отличие от сегментов с интактным эндотелием, зависело от активности потенциал-зависимых калиевых каналов. Возможно, потенциал-зависимые калиевые токи при действии АТФ на пуриnergические рецепторы эндотелиальных клеток играют меньшую роль в сравнении с другими типами калиевых каналов так, что их блокирование не сказывается на АТФ-индуцированном расслаблении сосудистого препарата.

Другой причиной проявления сократительного эффекта АТФ при ингибировании калиевых каналов может быть преобладающее влияние  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой сигнальной системы в ГМК, которая также активируется при действии АТФ через активацию синтеза инозитол-3-фосфата и последующего выхода ионов кальция из внутриклеточных депо [14, 27].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в результате проделанной работы данные указывают на то, что АТФ, действуя на пуриnergические рецепторы мембраны гладкомышечных и (или) эндотелиальных клеток, оказывает релаксирующее действие, более выраженное в деэндотелизированных сегментах. При этом действие АТФ на сегменты с интактным эндотелием зависит от АТФ-чувствительных калиевых каналов, а на деэндотелизированные сегменты — от АТФ-чувствительных и потенциал-зависимых калиевых каналов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-34-00262\16.

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Для экспериментов использовались животные самцы крыс линии Wistar весом 180–250 г, которых умерщвляли методом цервикальной дислокации в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Сибирского государственного медицинского университета (закключение № 3550 от 23 декабря 2013 г.).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Burnstock G. Purinergic nerves // *Pharmacological reviews*. 1972; 24 (3): 509–581.
2. Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.-M., Barnard E.A., Boyer J.L., Kennedy C., Knight G.E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy // *Pharmacological reviews*. 2006; 58(3): 281–341. DOI:10.1124/pr.58.3.3
3. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission // *Physiological reviews*. 2007; 87 (2): 659–797. DOI: 10.1152/physrev.00043.200
4. North R.A., Verkhatsky A. Purinergic transmission in the central nervous system // *Pflügers Archiv*. 2006; 452 (5): 479–485. DOI: 10.1007/s00424-006-0060-y
5. Pankratov Y., Lalo U., Verkhatsky A., North R.A. Vesicular release of ATP at central synapses // *Pflügers Archiv*. 2006; 452 (5): 589–597. DOI: 10.1007/s00424-006-0061-x
6. Burnstock G. Unresolved issues and controversies in purinergic signaling // *The Journal of physiology*. 2008; 586 (14): 3307–3312. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.155903
7. Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhatsky A., Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview // *Trends in neurosciences*. 2009; 32 (1): 19–29. DOI: 10.1016/j.tins.2008.10.001
8. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007; 64 (12): 1471–1483. DOI: 10.1007/s00018-007-6497-0
9. Burnstock G., Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P 2-purinoreceptor? // *General Pharmacology: The Vascular System*. 1985; 16 (5): 433–440.
10. Burnstock G. Purinergic receptors // *Journal of theoretical biology*. 1976; 62 (2): 491–503. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706429

11. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacological reviews*. 1998; 50 (3): 413–492.
12. Baroja-Mazo A., Barbera-Cremades M., Pelegri P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2013; 1828 (1): 79–93. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.01.002
13. Burnstock G. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium // *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*. 1990; 8 (7): S95–106.
14. Burnstock G., Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease // *Pharmacological reviews*. 2014; 66 (1): 102–192. DOI: 10.1124/pr.113.008029
15. Aoki K., Zubkov A.Y., Parent A.D., Zhang J.H. Mechanism of ATP-induced  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization in rat basilar smooth muscle cells // *Stroke*. 2000; 31 (6): 1377–1385. DOI: 10.1161/01.STR.31.6.1377
16. Koltsova S.V., Maximov G.V., Kotelevtsev S.V., Lavoie J.L., Tremblay J., Grygorczyk R., Hamet P., Orlov S.N. Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  cotransport-dependent signaling // *Purinergic Signaling*. 2009; 5: 343–349. DOI: 10.1007/s11302-009-9160-4
17. da Silva C.G., Specht A., Wegiel B., Ferran C., Kaczmarek E. Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells // *Circulation*. 2009; 119 (6): 871–879. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.764571
18. Raqeeb A., Sheng J., Ao N., Braun A.P. Purinergic P2Y2 receptors mediate rapid  $Ca^{2+}$  mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells // *Cell calcium*. 2011; 49 (4): 240–248. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.02.008
19. Schuchardt M., Tolle M., van der Giet M. P2Y purinoceptors as potential emerging therapeutic target in vascular disease // *Current pharmaceutical design*. 2012; 18 (37): 6169–6180. DOI: 10.2174/138161212803582504
20. Buchwalow I.B., Podzuweit T., Bocker W., Samoilova V.E., Thomas S., Wellner M., Baba H.A., Robenek H., Schneck-enburger J., Lerch M.M. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase // *The FASEB journal*. 2002; 16 (6): 500–508. DOI: 10.1096/fj.01-0842com
21. Alioua A. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive  $K^+$  channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo // *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273 (49): 32950–32956.
22. Han J., Kim N., Kim E., Ho W.-K., Earm Y.E. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes // *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (25): 22140–22147. DOI: 10.1074/jbc.M010103200
23. Robertson B.E., Schubert R., Hescheler J., Nelson M.T. cGMP-dependent protein kinase activates  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cerebral artery smooth muscle cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993; 265 (1): 299–303.
24. Sheng J. Z., Braun A.P. Small-and intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007; 293 (1): 458–467. DOI: 10.1152/ajpcell.00036.2007
25. Strøbaek D., Christophersen P., Dissing S., Olesen S.P. ATP activates  $K^+$  and  $Cl^-$  channels via purinoceptor-mediated release of  $Ca^{2+}$  in human coronary artery smooth muscle // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996; 271 (5): 1463–1471.
26. Félétou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? // *British journal of pharmacology*. 2009; 156 (4): 545–562. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x
27. Govindan S., Taylor E.J.A., Taylor C.W.  $Ca^{2+}$  signalling by P2Y receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells // *British journal of pharmacology*. 2010; 160 (8): 1953–1962. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00763.x

Поступила в редакцию 25.08.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Орлов Сергей Николаевич**, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник, СибГМУ, г. Томск; профессор биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

**Смаглий Людмила Вячеславовна**, канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

**Гусакова Светлана Валерьевна**, д-р мед. наук, зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

**Рыдченко Виктория Сергеевна**, аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

**Бирулина Юлия Георгиевна**, ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

**Байков Александр Николаевич**, д-р мед. наук, зав. ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

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

**Суханова Галина Алексеевна**, д-р биол. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии, СибГМУ, г. Томск.

**Федорова Татьяна Сергеевна**, д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии, СибГМУ, г. Томск.

**Ласукова Татьяна Викторовна**, д-р биол. наук, профессор кафедры медико-биологических дисциплин, ТГПУ, г. Томск.

(✉) Смаглий Людмила Вячеславовна, e-mail: lud.smagly@yandex.ru

УДК 577.352.4:576.32

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-105–112

For citation: Orlov S.N., Smagliy L.V., Gusakova S.V., Rydchenko V.S., Birulina Yu.G., Baikov A.N., Vasiliyev V.N., Sukhanova G.A., Fedorova T.S., Lasukova T.V. Role of potassium conductance in mechanisms of extracellular ATP action on smooth muscle cells contractile activity. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 105–112

## Role of potassium conductance in mechanisms of extracellular ATP impact on the contractive activity of vascular smooth muscle cells

Orlov S.N.<sup>1,2</sup>, Smagliy L.V.<sup>1,2</sup>, Gusakova S.V.<sup>1</sup>, Rydchenko V.S.<sup>1</sup>, Birulina Yu.G.<sup>1</sup>, Baikov A.N.<sup>1</sup>, Vasiliyev V.N.<sup>1</sup>, Sukhanova G.A.<sup>1</sup>, Fedorova T.S.<sup>1</sup>, Lasukova T.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University

1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>3</sup> Tomsk State Pedagogical University

60a, Kievskaya Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

### ABSTRACT

The **purpose** of this work is to study the influence of extracellular ATP (adenosine-3-phosphate), which is an activator of purinergic receptors, on contractive activity of rat aortic ring segments precontracted by  $\alpha 1$ -adrenoreceptors activation with phenylephrine and evaluate the impact of potassium channels of plasma membrane on mechanisms of ATP activity.

**Material and methods.** Contractive activity of vascular smooth muscle cells was studied using the method of Organ Bath Myography applied to the thoracic aorta segments in male Wistar rats both with intact and removed endothelium. ATP (1–1000 mM) produced a dose-dependent relaxing effect on intact and endothelium-denuded segments precontracted with phenylephrine. To assess the impact of potassium channels on mechanisms of ATP activity we used tetraethylammonium (10 mM), a nonselective potassium-channel blocker, glibenclamide (10 mM), the blocker of ATP-sensitive potassium channels and 4-aminopyridine, a blocker of voltage-gated potassium channels.

**Conclusion.** Our study has shown that the impact of ATP on segments with intact endothelium depends on the ATP-sensitive potassium channels whereas the impact of ATP on endothelium-denuded aortic segments depends on both ATP-sensitive and voltage-gated potassium channels.

**Key words:** ATP, potassium channels, smooth muscle cells.

Received August 25.2016

Accepted December 01.2016

Orlov Sergei N., DBSc, Professor, Research Officer, Siberian State Medical University, Tomsk; Professor of Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

Smagliy Ludmila V., PhD, Associate Professor, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Gusakova Svetlana V., MD, the Chief of Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Rydchenko Victoria S., Postgraduate Student, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Birulina Julia G.**, Assistant Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Baikov Aleksandr N.**, MD, Head of Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Vasiliyev Vladimir N.**, DBSc, Professor, Department of Physical Culture and Health, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Sukhanova Galina A.**, DBSc, Professor, Biochemistry and Molecular Biology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Fedorova Tatyana S.**, MD, Professor, Biochemistry and Molecular Biology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Lasukova Tatyana V.**, DBSc, Professor, Department of Biomedical Sciences, Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Smagly Ludmila V.**, e-mail: lud.smagly@yandex.ru

УДК 616.34-008.87-092:616.858:616.8]-07

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-113-125

Для цитирования: Петров В.А., Алифирова В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Алтухов И.А., Кострюкова Е.С., Титова М.А., Миронова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Перевозчикова Т.В., Файт Е.А., Сазонов А.Э. Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 113–125

## Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях

Петров В.А.<sup>1</sup>, Алифирова В.М.<sup>1</sup>, Салтыкова И.В.<sup>1</sup>, Жукова И.А.<sup>1</sup>, Жукова Н.Г.<sup>1</sup>, Дорофеева Ю.Б.<sup>1</sup>, Тяхт А.В.<sup>2</sup>, Алтухов И.А.<sup>2,3</sup>, Кострюкова Е.С.<sup>2</sup>, Титова М.А.<sup>1</sup>, Миронова Ю.С.<sup>1</sup>, Ижболдина О.П.<sup>1</sup>, Никитина М.А.<sup>1</sup>, Перевозчикова Т.В.<sup>1</sup>, Файт Е.А.<sup>1</sup>, Сазонов А.Э.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства  
Россия, 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет)  
Россия, 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время большой интерес представляет роль микробиоты в патогенезе различных болезней, а также ее диагностический и терапевтический потенциал. Болезнь Паркинсона – нейродегенеративное заболевание, для которого было показано изменение состава кишечной микробиоты в сравнении со здоровым контролем.

**Цель данного исследования** – сравнительная характеристика кишечной микробиоты лиц с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями, включая идиопатическую семейную дистонию, эссенциальный тремор, рассеянный склероз, множественную системную атрофию для определения микробиотического ландшафта, характерного именно для болезни Паркинсона.

**Материал и методы.** В исследование были включены 93 пациента с диагнозом болезни Паркинсона и 33 пациента с иными неврологическими заболеваниями. Для каждого пациента проведено физикальное обследование и собраны образцы фекалий. Определение состава микробиоты проводилось секвенированием бактериальных генов 16S рРНК с последующим биоинформатическим и статистическим анализом.

**Результаты.** При сравнительном анализе состава микробиоты были найдены значимые различия. Микробиота кишечника лиц с болезнью Паркинсона характеризовалась увеличением содержания бактерий видов *Desulfovibrio piger*, *Lactobacillus mucosae*, *Yokenella regensburgei*, *Alistipes indistinctus*, *Oscillospira capillosus*, *Clostridium boltea*, *Soleaferrea massiliensis*, *Butyrivibrio fibrisolens*, *Dorea massiliensis*, *Vectisella vadensis*. У лиц с другими неврологическими заболеваниями преобладали бактерии родов *Blautia*, *Intestinibacter*, *Coprococcus* и видов *Anoxybacterium fissicatena*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemmiger formicilis*, *Papillibacter cinnamivorans*, *Roseburia faecis*, *Lachnoclostridium indolis*, *Clostridium populeti*,

*Clostridium tertium*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium cylindroides*, *Clostridium clariflavum*, *Eubacterium eligens*, *Coprococcus eutactus*, *Intestinibacter bartlettii*.

**Выводы.** Микробиота кишечника при болезни Паркинсона отличается по таксономическому разнообразию и бактериальному составу от микробиоты пациентов с другими неврологическими заболеваниями, в том числе нейровоспалительными и нейродегенеративными.

**Ключевые слова:** кишечная микробиота, болезнь Паркинсона, неврологические заболевания, рассеянный склероз, секвенирование 16S рРНК.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой интерес представляет роль симбиотических микроорганизмов, населяющих кишечник человека, в этиологии и патогенезе различных болезней. Микробиота является сложноорганизованной динамической системой, активно вовлеченной в различные физиологические процессы, протекающие в организме. Она участвует в пищеварении, стимуляции и поддержании на должном функциональном уровне иммунной системы, синтезе витаминов, медиаторов и биологически активных веществ, таких как ацетат и бутират, а также в защите макроорганизма от колонизации несвойственной ему микрофлорой [1]. Согласно концепции «ось – кишечник – мозг», микробиота также способна вмешиваться в работу нервной системы как на локальном уровне, так и на системном, вплоть до влияния на когнитивные функции человека [2, 3]. Актуальным направлением является исследование микробиоты человека при заболеваниях нервной системы, в частности при нейродегенеративной патологии [4]. Болезнь Паркинсона является одним из самых частых нейродегенеративных заболеваний, уступая по распространенности лишь болезни Альцгеймера [5], и представляет собой значительную медико-социальную и экономическую проблему [6]. Благодаря развитым компенсаторным механизмам головного мозга, данное заболевание характеризуется длительным периодом бессимптомного течения, в результате чего к моменту клинического дебюта и началу лечения погибают до 90% дофаминергических нейронов, что в большинстве случаев оставляет возможность проведения лишь заместительной терапии. Учитывая это, большое значение приобретает поиск возможных патогенетических механизмов, лежащих в основе болезни Паркинсона, и биомаркеров, позволяющих проводить ее раннюю диагностику.

Ранее было показано, что кишечная микробиота пациентов с болезнью Паркинсона отличается

от микробиоты здоровых доноров по таксономическому составу. Отмечено, что изменение композиции микробиоты потенциально может быть использовано для диагностики [7, 8]. Однако на настоящий момент не известно, специфичны ли данные изменения для болезни Паркинсона, или же схожие нарушения в составе микробиоты наблюдаются и при других неврологических заболеваниях. Поиск микробиотического ландшафта, характерного именно для болезни Паркинсона, позволит уточнить как диагностический потенциал микробиоты, так и получить новую информацию о патогенезе данного заболевания.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 93 пациента с подтвержденным клиническим диагнозом болезни Паркинсона и 33 пациента с иными неврологическими заболеваниями. В группу иной неврологической патологии вошли: пять пациентов с диагнозом «идиопатическая семейная дистония», 10 пациентов с диагнозом «эссенциальный тремор», 15 пациентов с диагнозом «рассеянный склероз» и по одному пациенту с диагнозами «множественная системная атрофия», «деменция с тельцами Леви» и «острый рассеянный энцефаломиелит». Для каждого пациента проведено физикальное и неврологическое обследование, собран анамнез жизни и получен биоматериал – образцы кала.

Выделение ДНК проводилось в соответствии с описанной методикой [9]. Подготовка библиотек и ампликонное секвенирование маркерного переменного участка V3–V4 бактериальных генов 16S рРНК проводилось на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно стандартному протоколу производителя.

Фильтрация прочтений по качеству и их таксономическая классификация проведены с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 [10]. Для более точного определения таксономической принадлежности прочтений применялся подход, включающий в себя использование

двух таксономических баз данных. На первом этапе командой `pick_rep_set.py` осуществлялся подбор референсного набора операционных таксономических единиц (ОТЕ) бактерий на основании сравнения полученных прочтений генов 16S рРНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [11]. На втором этапе командой `assign_taxonomy.py` с использованием алгоритма RDP проводилось определение таксономической принадлежности данных ОТЕ на основе специализированной базы данных кишечной микробиоты человека HITdb, которая содержит информацию о связи ОТЕ с ближайшими культивируемыми видами [12]. Такой подход позволил осуществить как более точную таксономическую классификацию микробиоты, так и сохранил возможность предсказания функциональной активности метабеномов больных.

Оценка  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия проводилась с использованием программного обеспечения QIIME. Для оценки  $\alpha$ -разнообразия (таксономического богатства сообществ кишечных бактерий) проводилось прореживание образцов до уровня образца с минимальным числом прочтений (3 400 прочтений/образец) с последующим подсчетом таксономических индексов разнообразия `chao1`, `Shannon`, `PD whole tree` и `observed OTUs` в исследуемых группах и сравнением индексов с использованием непараметрического  $t$ -теста Уэлча. Результат представлен в виде среднего значения  $M$  и стандартного отклонения  $m$ . Оценка  $\beta$ -разнообразия (меры попарных различий между сообществами кишечных бактерий) проводилась с использованием анализа главных координат (PCoA) при расчете метрики `weighted Unifrac` и нормализации данных с использованием алгоритма `CSS` [13]. Для определения достоверности попарного различия сообществ по составу микробиоты и вклада исследуемых заболеваний в данное различие использовался непараметрический дисперсионный анализ (функция `Adonis` пакета `vegan` языка R) и MRPP (Multi-response permutation procedure, процедура перестановки с анализом множественного отклика) с оценкой достоверности при 9 999 перестановках.

Для определения различий в таксономической композиции микробиоты микроорганизмы с низкой представленностью, присутствовавшие менее чем в 20 образцах, исключались, после чего проводилась нормализация данных с использованием алгоритма `CSS`. Затем полученные ОТЕ агрегировали на уровне родов и видов. Те ОТЕ, для которых в качестве видового наименования в базе HITdb было приведено название ближайше-

го культивируемого вида, считались бактериями данного вида. Определение статистических различий в представленности бактериальных таксонов и ОТЕ проводилось с использованием алгоритма `glm` пакета `stats` и алгоритма `fitZig` пакета `metagenomeSeq` языка R при учете влияния возраста на состав кишечной микробиоты. Для учета влияния возраста на состав флоры к статистическим моделям `glm` и `fitZig` наряду с переменной «статус по заболеванию» добавлялась ковариата «возраст». Различия в представленности бактерий считались достоверными и не зависящими от возраста пациента, если ковариата «возраст» не включалась статистически достоверно в модель для данной бактерии ( $p \geq 0,05$ ). При достоверном включении в модель переменной «статус по заболеванию» для данной бактерии ( $p < 0,05$ ). Поправка на множественные сравнения проводилась по методу Бенджамини – Хохберга, различия считались достоверными при значении  $p < 0,05$  после применения поправки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Медиана возраста пациентов с болезнью Паркинсона, включенных в исследование, составила 69 [64; 76] лет, лиц с иной неврологической патологией – 58 [38; 66] лет. Ввиду статистически достоверных различий в возрасте между группами больных ( $W = 2407$ ;  $p < 0,001$ ) проведена оценка вклада возраста в вариабельность микробиоты при помощи непараметрического дисперсионного анализа при 9 999 перестановках. Отмечено, что возраст вносит вклад в вариабельность состава кишечной флоры ( $R^2 = 0,02$ ;  $p = 0,01$ ), поэтому при проведении статистических расчетов учитывалось влияние возраста.

Общее количество классифицированных ОТЕ составило 6 688 441, среднее значение прочтений на образец  $53\,083 \pm 26\,364$  (минимальное 3 420 и максимальное 162 191 прочтений/образец) до применения фильтрации низко представленных ОТЕ бактерий. Преобладающие рода микроорганизмов (в сумме 90% от состава метабенома) указаны на рис. 1. Наиболее часто встречающимися родами в микробиоте кишечника при болезни Паркинсона являются *Faecalibacterium* ( $8,09 \pm 4,32\%$ ), *Eubacterium* ( $7,28 \pm 1,79\%$ ), *Bacteroides* ( $6,75 \pm 3,27\%$ ), *Clostridium* ( $6,72 \pm 2,80\%$ ), *Blautia* ( $6,33 \pm 3,82\%$ ) и *Oscillibacter* ( $6,15 \pm 2,85\%$ ). У лиц с диагнозом «идиопатическая семейная дистония» наиболее распространены рода *Faecalibacterium* ( $12,68 \pm 3,34\%$ ), *Blautia* ( $7,49 \pm 3,62\%$ ), *Eubacterium* ( $7,06 \pm 1,34\%$ ), *Bacteroides* ( $6,21 \pm 2,25\%$ ) и *Prevotella* ( $5,96 \pm 3,20\%$ ). Микробиота

пациентов с эссенциальным тремором характеризуется большим количеством бактерий родов *Faecalibacterium* ( $10,20 \pm 6,60\%$ ), *Blautia* ( $9,94 \pm 4,89\%$ ), *Clostridium* ( $8,29 \pm 1,66\%$ ), *Eubacterium* ( $7,94 \pm 1,61\%$ ) и *Bacteroides* ( $5,83 \pm 2,58\%$ ). При рассеянном склерозе отмечается наиболее выраженная представленность *Faecalibacterium* ( $12,21 \pm 2,37\%$ ), *Blautia* ( $11,99 \pm 2,97\%$ ), *Clostridium* ( $7,59 \pm 1,62\%$ ) и *Eubacterium* ( $7,56 \pm 0,70\%$ ).

При оценке  $\alpha$ -разнообразия микробиоты кишечника при болезни Паркинсона в сравнении с лицами с другими неврологическими заболеваниями выявлены статистически достоверные

различия в таксономическом богатстве сообществ. По результатам оценки метрики  $\alpha$ -разнообразия PD whole tree, учитывающей не только число различных ОТЕ, но и их таксономическое положение, установлено, что таксономическое разнообразие кишечной микробиоты в группе с другими неврологическими заболеваниями ниже в сравнении с группой пациентов с болезнью Паркинсона ( $29,61 \pm 2,80$  и  $31,32 \pm 4,23$  соответственно;  $p = 0,03$ , рис. 2) при отсутствии статистически значимых различий по таксономическому разнообразию, рассчитанному с использованием других индексов (табл. 1).

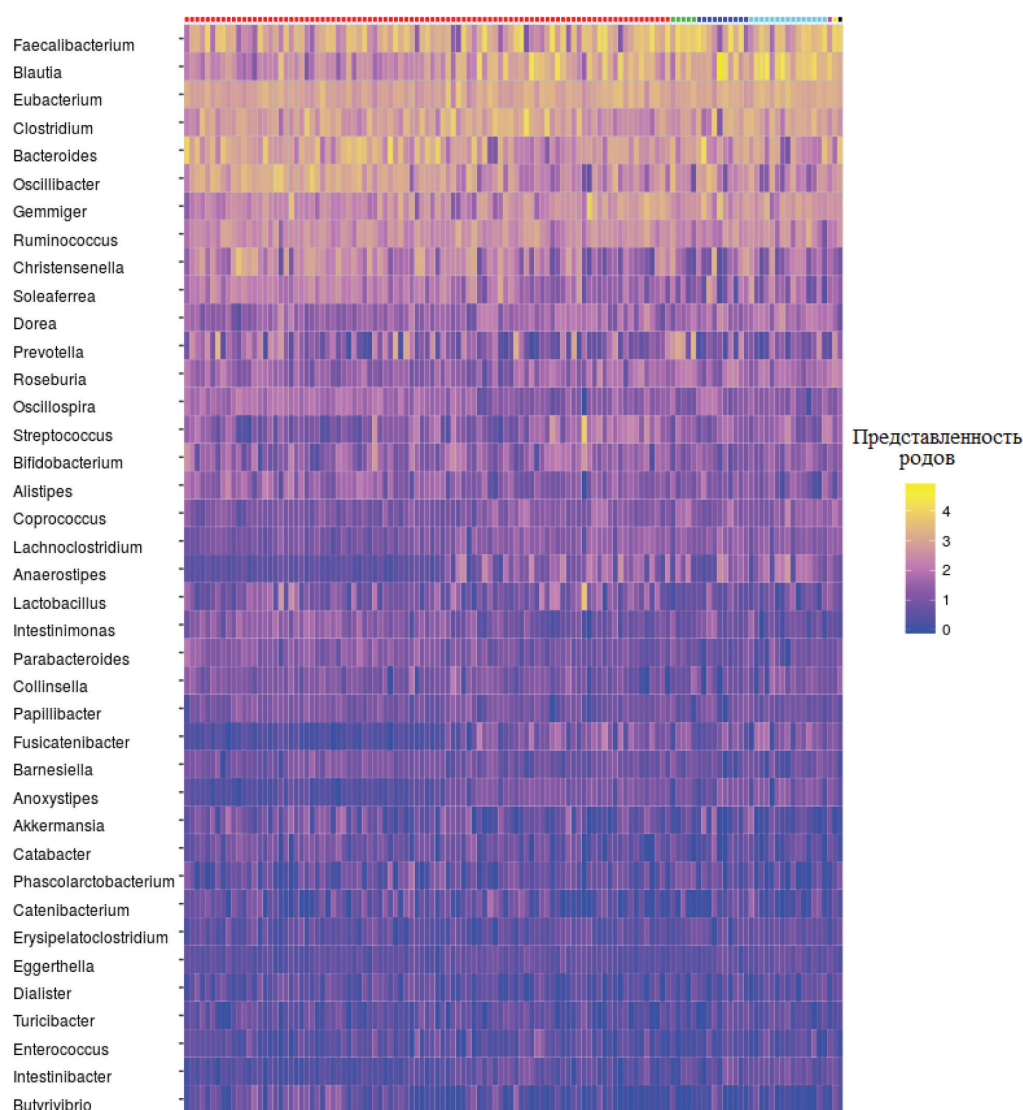


Рис. 1. Тепловая карта представленности бактериальных родов в микробиоте кишечника лиц с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями. Приведены бактериальные рода, составляющие 90% от состава микробиоты. Синий цвет соответствует низкой представленности рода, желтый цвет – высокой. Красными квадратами в верхней части карты обозначены пациенты с болезнью Паркинсона, зелеными – лица с диагнозом «идиопатическая семейная дистония», синими – пациенты с диагнозом «эссенциальный тремор», голубыми – лица с диагнозом «рассеянный склероз», малиновым – пациент с диагнозом «множественная системная атрофия», желтым – пациент с диагнозом «острый рассеянный энцефаломиелит», черным – пациент с деменцией с тельцами Леви. Данные приведены в логарифмированном по основанию второму виде

Таблица 1

| Значение индексов $\alpha$ -разнообразия микробиоты кишечника лиц с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями |                    |                                    |            |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------|----------|
| Таксономический индекс                                                                                                           | Болезнь Паркинсона | Другие неврологические заболевания | t-критерий | <i>p</i> |
| Chao1                                                                                                                            | 798,65 ± 127,53    | 824,30 ± 81,03                     | 1,07       | 0,27     |
| PD whole tree                                                                                                                    | 31,32 ± 4,23       | 29,61 ± 2,80                       | 2,15       | 0,03     |
| Observed OTUs                                                                                                                    | 386,54 ± 36,17     | 386,87 ± 55,50                     | -0,03      | 0,97     |
| Индекс Шеннона                                                                                                                   | 6,18 ± 0,37        | 6,18 ± 0,53                        | -0,82      | 0,44     |
| Индекс Симпсона                                                                                                                  | 0,96 ± 0,03        | 0,96 ± 0,02                        | -0,01      | 1        |

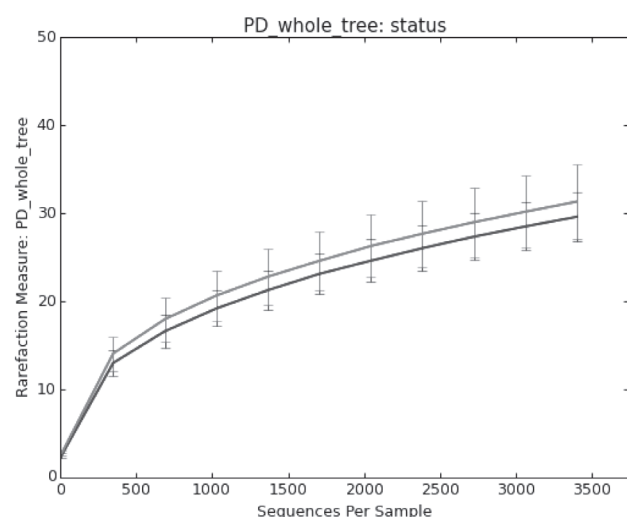
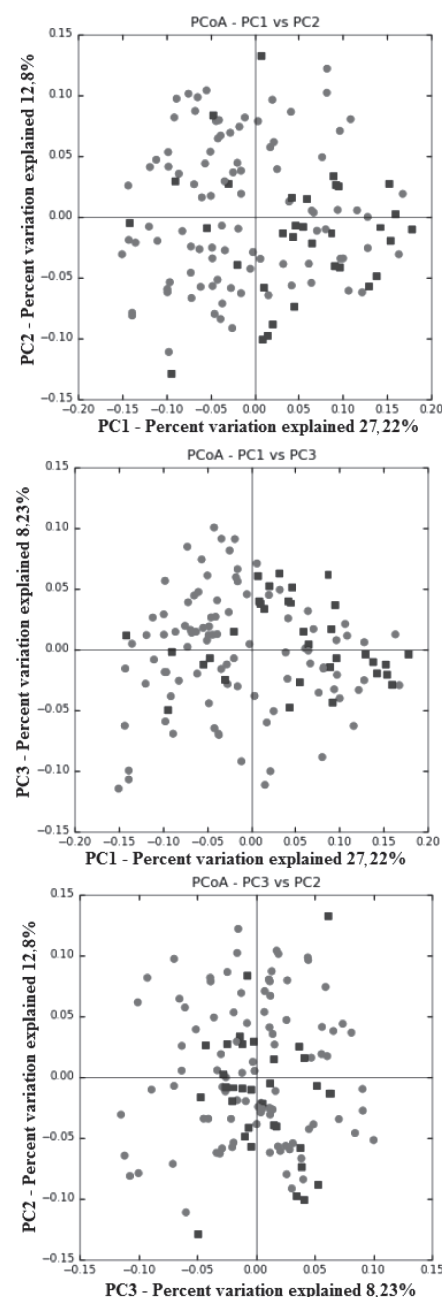


Рис. 2. Кривые  $\alpha$ -разнообразия, рассчитанного по индексу PD whole tree, для микробиоты кишечника лиц с болезнью Паркинсона (красный цвет) и другими неврологическими заболеваниями (синий цвет). «Усы» на графике обозначают величину стандартного отклонения. Значения  $\alpha$ -разнообразия рассчитаны на 10 точках при различной глубине прореживания

В ходе оценки  $\beta$ -разнообразия, проведенной методом MRPP и непараметрическим дисперсионным анализом, установлены попарные различия в составе микробиоты между образцами пациентов с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями, однако вклад заболевания в состав микробиоты оказался не слишком большим (Adonis:  $R^2 = 0,04$ ,  $p = 0,001$ ; MRPP:  $\Delta 0,212$  и  $0,197$  соответственно,  $A = 0,020$ ,  $p = 0,001$ ) (рис. 3).

При оценке представленности бактериальных таксонов на уровне рода обнаружено снижение содержания бактерий *Blautia* ( $p = 0,034$ ), *Intestinibacter* ( $p = 0,009$ ) и *Coproccoccus* ( $p = 0,006$ ) в микробиоте кишечника пациентов с болезнью Паркинсона (рис. 4). На уровне видов наблюдалась схожая тенденция – снижение представленности бактерий *Intestinibacter bartlettii* ( $p = 0,020$ ) у лиц с болезнью Паркинсона по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.



Adonis:  $R^2 = 0,04$ ,  $p = 0,001$ ; MRPP:  $A = 0,020$ ,  $p = 0,001$

Рис. 3. Графики главных координат микробиоты кишечника лиц с болезнью Паркинсона (красные круги) и другими неврологическими заболеваниями (синие квадраты). Приведены графики трех первых координат, в сумме объясняющие 48,25% вариальности

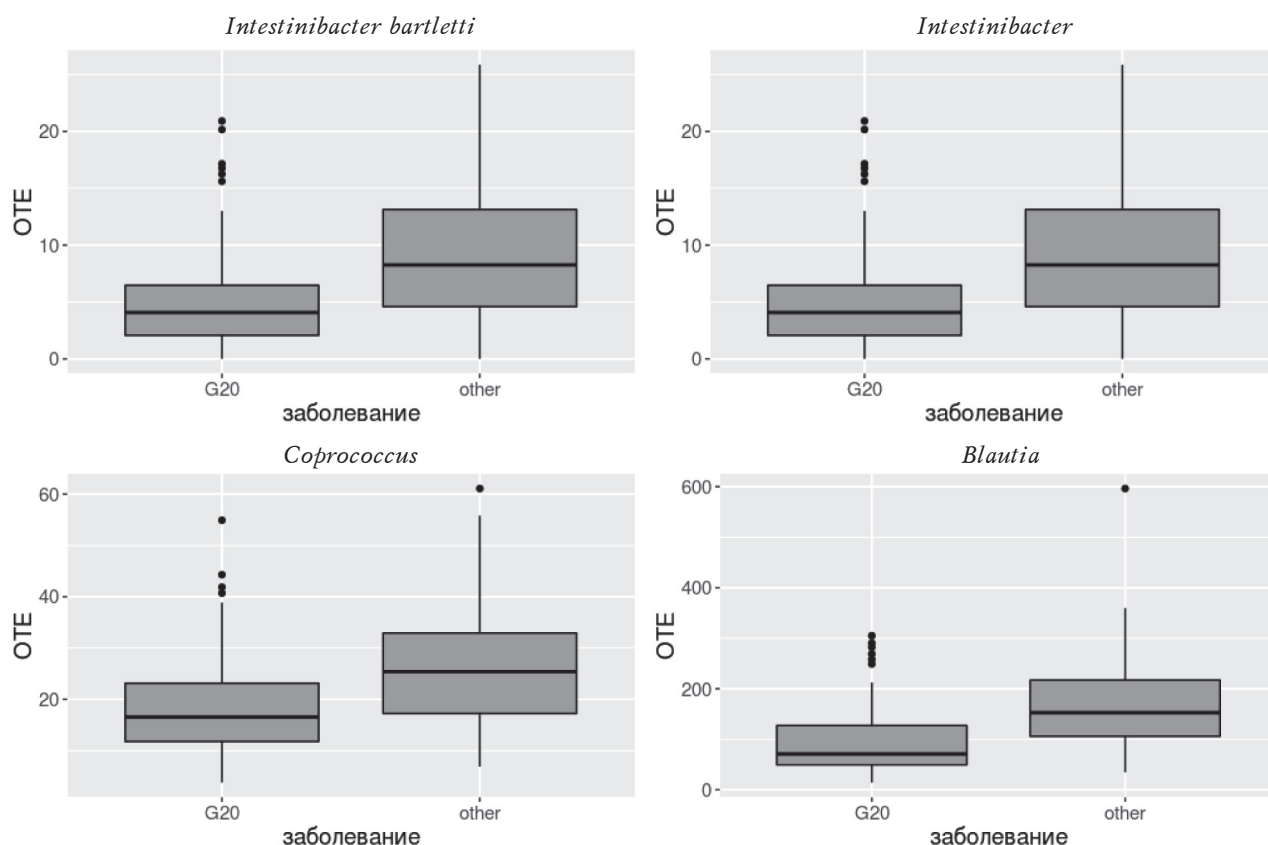


Рис. 4. Содержание бактерий в микробиоте лиц с болезнью Паркинсона (G20) и другими неврологическими заболеваниями (other)

Исследование особенностей состава кишечной микробиоты с помощью пакета metagenome Seq показало, что наличие болезни Паркинсона ассоциировано с повышением содержания ОТЕ бактерий видов: *Desulfovibrio piger*, *Lactobacillus mucosae*, *Yokenella regensburgei*, *Alistipes indistinctus*, *Oscillospira capillosus*, *Clostridium bol-*

*teae*, *Soleaferrea massiliensis*, *Butyricimonas virosa*, *Dorea massiliensis*, *Victivallis vadensis*, *Tyzzerella [Clostridium] lactatifermentans* и рода *Cellulosilyticum*. При этом ОТЕ вида *Victivallis vadensis* и рода *Cellulosilyticum* присутствовали только в группе пациентов с болезнью Паркинсона (табл. 2).

Таблица 2

Различия в представленности ОТЕ бактерий в микробиоте кишечника лиц с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями

| Название ОТЕ                                                  | Структурное сходство с референсом, % | Кол-во образцов в группе G20 | Кол-во образцов в группе other | Кол-во прочтений в группе G20 | Кол-во прочтений в группе other | LogFC  | p     |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------|-------|
| <i>Desulfovibrio piger</i>                                    | 100                                  | 29                           | 1                              | 2932                          | 8                               | -2,719 | 0,020 |
| <i>Lactobacillus mucosae</i>                                  | 100                                  | 56                           | 13                             | 17501                         | 489                             | -2,327 | 0,049 |
| <i>Yokenella regensburgei</i> JN175339                        | 93,8                                 | 45                           | 13                             | 2924                          | 157                             | -2,183 | 0,017 |
| <i>Alistipes indistinctus</i> AB600999                        | 96                                   | 30                           | 7                              | 1026                          | 52                              | -2,055 | 0,017 |
| <i>Cellulosilyticum</i>                                       | 100                                  | 15                           | 0                              | 372                           | 0                               | -1,875 | 0,014 |
| <i>Christensenella minuta</i> AB490809                        | 84,1                                 | 44                           | 12                             | 1721                          | 101                             | -1,613 | 0,048 |
| <i>Oscillospira[Pseudoflavonifractor] capillosus</i> AY136666 | 91,2                                 | 53                           | 13                             | 1622                          | 375                             | -1,587 | 0,048 |
| <i>Clostridium bolteae</i> AJ508452                           | 90,7                                 | 32                           | 4                              | 619                           | 31                              | -1,459 | 0,048 |
| <i>Soleaferrea massiliensis</i> JX101688                      | 88,9                                 | 27                           | 7                              | 380                           | 33                              | -1,420 | 0,036 |
| <i>Butyricimonas virosa</i>                                   | 100                                  | 48                           | 7                              | 588                           | 109                             | -1,417 | 0,049 |

| Название ОТЕ                                | Структурное сходство с референсом, % | Кол-во образцов в группе G20 | Кол-во образцов в группе other | Кол-во прочтений в группе G20 | Кол-во прочтений в группе other | LogFC  | <i>p</i> |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------|----------|
| <i>Tyzzerella lactatifermentans</i>         | 100                                  | 18                           | 1                              | 296                           | 7                               | -1,390 | 0,049    |
| <i>Dorea massiliensis</i> JX101687          | 93,9                                 | 29                           | 6                              | 234                           | 11                              | -1,160 | 0,036    |
| <i>Victivallis vadensis</i> AY049713        | 94                                   | 15                           | 0                              | 68                            | 0                               | -1,038 | 0,014    |
| <i>Anoxystipes fissicatena</i> NR 104800.1  | 94,9                                 | 23                           | 17                             | 48                            | 49                              | 0,777  | 0,014    |
| <i>Fusobacterium periodonticum</i> AB910749 | 96,5                                 | 7                            | 9                              | 49                            | 25                              | 0,777  | 0,049    |
| <i>Gemmiger formicilis</i> GU562446         | 92,7                                 | 20                           | 12                             | 55                            | 34                              | 0,787  | 0,014    |
| <i>Papillibacter cinnamivorans</i> AF167711 | 89,7                                 | 58                           | 18                             | 181                           | 112                             | 0,810  | 0,014    |
| <i>Alistipes senegalensis</i> JF824804      | 96                                   | 10                           | 7                              | 20                            | 18                              | 0,948  | 0,004    |
| <i>Roseburia faecis</i>                     | 100                                  | 35                           | 21                             | 140                           | 119                             | 1,034  | 0,014    |
| <i>Lachnoclostridium indolis</i>            | 100                                  | 9                            | 9                              | 10                            | 44                              | 1,085  | 0,001    |
| <i>Blautia</i>                              | 100                                  | 92                           | 33                             | 95742                         | 69333                           | 1,101  | 0,014    |
| <i>Coprococcus</i>                          | 100                                  | 86                           | 32                             | 2484                          | 1652                            | 1,374  | 0,021    |
| <i>Clostridium populeti</i> X71853          | 90,5                                 | 59                           | 27                             | 951                           | 577                             | 1,435  | 0,022    |
| <i>Peptostreptococcaceae</i>                | 100                                  | 83                           | 29                             | 4451                          | 2444                            | 1,436  | 0,049    |
| <i>Clostridium tertium</i> JX267105         | 95,7                                 | 37                           | 23                             | 373                           | 324                             | 1,510  | 0,009    |
| <i>Roseburia intestinalis</i>               | 100                                  | 57                           | 28                             | 1652                          | 1517                            | 1,552  | 0,042    |
| <i>Eubacterium desmolans</i> EUBRRDO        | 94,2                                 | 80                           | 32                             | 4144                          | 3175                            | 1,577  | 0,041    |
| <i>Christensenella minuta</i> AB490809      | 84,9                                 | 57                           | 19                             | 1075                          | 593                             | 1,581  | 0,014    |
| <i>Eubacterium cylindroides</i> AB018186    | 79,3                                 | 10                           | 6                              | 241                           | 700                             | 1,665  | 0,047    |
| <i>Anoxystipes fissicatena</i> NR 104800.1  | 92,3                                 | 46                           | 21                             | 399                           | 462                             | 1,691  | 0,004    |
| <i>Clostridium clariflavum</i> NR 102987.1  | 83,7                                 | 13                           | 6                              | 571                           | 201                             | 1,778  | 0,036    |
| <i>Phascolarctobacterium faecium</i> X72867 | 93,9                                 | 10                           | 4                              | 326                           | 281                             | 1,816  | 0,014    |
| <i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>       | 100                                  | 28                           | 14                             | 358                           | 727                             | 1,892  | 0,017    |
| <i>Anaerostipes</i>                         | 100                                  | 92                           | 33                             | 35096                         | 25719                           | 1,940  | 0,049    |
| <i>Fusicatenibacter</i>                     | 100                                  | 88                           | 32                             | 15808                         | 10019                           | 2,048  | 0,048    |
| <i>Eubacterium eligens</i>                  | 100                                  | 55                           | 21                             | 7624                          | 2783                            | 2,318  | 0,030    |
| <i>Coprococcus eutactus</i>                 | 100                                  | 45                           | 17                             | 2665                          | 2798                            | 2,418  | 0,009    |
| <i>Intestinibacter bartlettii</i>           | 100                                  | 88                           | 32                             | 12953                         | 12440                           | 2,499  | 0,009    |
| <i>Anoxystipes fissicatena</i> NR 104800.1  | 92                                   | 50                           | 24                             | 2770                          | 2019                            | 2,755  | 0,001    |

П р и м е ч а н и е. Структурное сходство с референсом – доля структурного сходства найденной ОТЕ с эталонной в базе данных HITdb; кол-во образцов в группе G20 – количество пациентов с болезнью Паркинсона, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; кол-во образцов в группе other – количество пациентов с другими неврологическими заболеваниями, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; кол-во прочтений в группе G20 – количество прочтений данной ОТЕ в группе пациентов с болезнью Паркинсона; кол-во прочтений в группе other – количество прочтений данной ОТЕ в группе пациентов с другими неврологическими заболеваниями; LogFC – кратность различия в представленности ОТЕ; отрицательные значения свидетельствуют о более выраженном содержании данной ОТЕ у лиц с болезнью Паркинсона, положительные значения свидетельствуют о более выраженном содержании данной ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями; *p* приведены с поправкой на множественное сравнение по Бенджамини – Хохбергу.

В свою очередь, наличие других неврологических заболеваний ассоциировано с повышением представленности ОТЕ бактерий видов: *Anoxystipes fissicatena*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemmiger formicilis*, *Papillibacter cinnamivorans*, *Alistipes senegalensis*, *Roseburia faecis*, *Lachnoclostridium indolis*, *Clostridium populeti*, *Clostridium tertium*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium cylindroides*, *Clostridium clariflavum*, *Phascolarctobacterium faecium*, *Erysipelatoclostridium ramosum*, *Eubacterium eligens*, *Coprococcus eutactus*, *Intestinibacter bartlettii*, родов *Blautia*, *Coprococcus*, *Anaerostipes*, и *Fusicatenibacter*, а также семейства *Peptostreptococcaceae* (см. табл. 2).

Также обнаружены различия в содержании ОТЕ, ассоциированных с бактерией *Christensenella minuta*. В группе пациентов с болезнью Паркинсона более представлена ОТЕ, имеющая 84,1% сходства, а в группе пациентов с другими неврологическими заболеваниями более встречаемой оказалась ОТЕ с 84,9% сходства по нуклеотидному составу с фрагментом V3–V4 гена 16S рРНК данного микроорганизма. Биологическая трактовка такого наблюдения затруднительна.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Кишечная микробиота пациентов с болезнью Паркинсона отличается в среднем более богатым

таксономическим составом, чем микробиота при других неврологических заболеваниях. Богатство таксономического состава – одна из важнейших характеристик любого биома, причем снижение разнообразия микробиоты какого-либо из органов живого организма обычно свидетельствует о наличии в нем выраженного патологического процесса, чаще всего – воспаления [14, 15]. Снижение разнообразия кишечной микробиоты достаточно часто наблюдается не только при воспалительных заболеваниях кишечника, но и в случае ожирения, а также у людей, придерживающихся «западной» диеты, богатой жирами и легкоусвояемыми сахарами [16]. Высокий уровень таксономического разнообразия делает микробиоту устойчивой к изменениям в составе, в частности к колонизации патогенами, а снижение разнообразия увеличивает вероятность развития дисбиоза и еще большего усугубления дисбаланса микрофлоры [16].

В кишечной микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению с микробиотой при других неврологических заболеваниях наблюдалось снижение содержания родов и видов бактерий, относящихся к микроорганизмам с пробиотическими свойствами, а также продуцентам бутирата. Так, представители рода эубактерий *Eubacterium cylindroides*, *Eubacterium desmolans* и *Eubacterium eligens*, сниженные в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона, относятся к нормофлоре, населяющей организм человека. Известно, что *Eubacterium cylindroides* является важным источником бутирата – одного из важнейших противовоспалительных факторов, продуцируемых симбиотическими бактериями кишечника [17]. К продуцентам бутирата, предположительно оказывающим пробиотическое влияние, относят также бактерии родов *Anaerostipes*, *Fusicatenibacter*, *Roseburia*, *Blautia*, *Coproccoccus* и видов *Clostridium populeti*, *Roseburia faecis* и *Roseburia intestinalis*, повышенные в группе пациентов с другими неврологическими заболеваниями [18–20]. Снижение представленности бактерий *Roseburia*, *Blautia* и *Coproccoccus* в кишечной микробиоте при болезни Паркинсона отмечалось также при сравнении со здоровыми людьми в исследовании, проведенном на американской популяции [8].

С другой стороны, у пациентов с болезнью Паркинсона также отмечается повышение содержания некоторых бактерий с пробиотическими свойствами относительно микробиоты пациентов с другими неврологическими заболеваниями. *Lactobacillus mucosae* и *Butyricimonas virosa* яв-

ляются важными компонентами здоровой микробиоты и оказывают противовоспалительный и трофический эффект на эпителий кишечника [21, 22]. Для бактерий рода *Butyricimonas* показано снижение представленности в кишечной микробиоте при рассеянном склерозе, больные данной патологией составляют практически половину от группы сравнения [23]. Однако наряду с повышением представленности некоторых пробиотических бактерий в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона преобладают и условно патогенные бактерии: *Desulfovibrio piger* (вид ассоциирован с воспалительными заболеваниями кишечника), и оппортунистический патоген *Yokenella regensburgei* [24]. В настоящее время нейровоспаление рассматривается как этиологический фактор болезни Паркинсона [25]. Преобладание микроорганизмов с провоспалительными свойствами при снижении содержания противовоспалительных бактерий в микрофлоре лиц с болезнью Паркинсона отмечается и при сравнении этих пациентов со здоровыми людьми [8], что может служить важным признаком роли нейровоспаления в развитии данного заболевания.

Достаточно интересным является снижение представленности в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона бактерий *Lachnoclostridium indolis* и *Intestinibacter bartlettii*, участвующих в метаболизме аминокислот, в частности триптофана. Бактерии вида *Intestinibacter bartlettii* (ранее причисляемые к роду клостридий [26]) участвуют в метаболизме белков, получаемых с растительной пищей, а именно в переработке ароматических аминокислот до фенилуксусной, 4-гидроксифенилуксусной и, наиболее активно, β-индолилуксусной кислоты – вещества группы ауксинов, растительных гормонов [27]. Сама β-индолилуксусная кислота оказывает туморогенный эффект из-за повреждения ДНК клеток [28, 29]. Одно из производных β-индолилуксусной кислоты, митохондриевая кислота, оказывает защитное воздействие на фибробласты, полученные от больных с нейродегенеративной патологией, вероятнее всего благодаря олигомеризации АТФ-синтазы и последующей продукции большего количества АТФ [30]. Поражение митохондрий является одним из вероятных патогенетических механизмов, приводящих к развитию болезни Паркинсона. Снижение представленности данных бактерий у лиц с болезнью Паркинсона может указывать на большую подверженность митохондрий таких пациентов различного рода поражениям, потенциально способствующим развитию болезни Паркинсона.

Наряду с нейровоспалением, изменение работы нервной системы, в частности на уровне синапсов, рассматривается как один из общих этиологических факторов нейродегенеративных и нейроонтогенетических заболеваний [31]. В этой связи достаточно актуально повышение содержания *Clostridium bolteae* в микробиоте кишечника при болезни Паркинсона, поскольку для данных бактерий показана ассоциация с аутизмом [32]. Кроме того, в микробиоте кишечника пациентов с болезнью Паркинсона отмечается повышение представленности бактерий, способных оказывать влияние на работу нейронов. Так *Lactobacillus mucosae*, содержание которой в микробиоте кишечника повышается как в сравнении с другими неврологическими заболеваниями, так и при сравнении с группой здорового контроля на финской популяции [7], способна влиять на секрецию  $\alpha$ -синуклеина через взаимодействия с нейронами кишечника [33, 34]. Кроме того, одно из производных  $\beta$ -индолилуксусной кислоты, выделяемой ранее упоминавшийся *Intestinibacter bartlettii*, – 5-гидроксииндолилуксусная кислота – является метаболитом серотонина и способно оказывать влияние на работу нервной системы, в частности понижать болевой порог [35].

Также выявлено изменение представленности бактерий, связанных с потерей и набором веса. Так, у пациентов с болезнью Паркинсона отмечается повышение содержания бактерий *Dorea massiliensis* и *Soleaferrea massiliensis*, которые выделены из фекалий пациента с анорексией [36], а также *Oscillospira* [*Pseudoflavonifractor*] *capillosus*, ассоциированных с низким уровнем индекса массы тела у людей [37]. Тогда как у лиц с другими неврологическими заболеваниями повышается содержание провоцирующей набор массы тела бактерии *Erysipelatoclostridium ramosum* [38]. Известно, что изменения в составе микробиоты кишечника могут провоцировать изменение веса организма-хозяина [39]. Одним из проявлений болезни Паркинсона является потеря веса пациентом [40], что может быть связано в том числе и с изменением состава микробиоты кишечника.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что микробиота кишечника при болезни Паркинсона достоверно отличается по таксономическому разнообразию и бактериальному составу от микробиоты пациентов с другими неврологическими заболеваниями, в том числе нейровоспалительными и нейродегенеративными.

Микробиотический ландшафт кишечника при болезни Паркинсона имеет ряд особенностей, характерных для больных с данной патологией в сравнении с пациентами, страдающими от других неврологических заболеваний.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП №14.604.21.0150 «Выявление биомаркеров микробиотического сообщества кишечника для ранней, доклинической диагностики болезни Паркинсона» (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0150).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

План и проведение научно-исследовательской работы полностью соответствовали принципам Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice – GCP) и Хельсинской декларации (включая поправки). Протокол исследования был одобрен независимым этическим комитетом СибГМУ (заключение № 3669 от 22 декабря 2014 г.). Письменное информированное согласие получали от всех пациентов или от их близких родственников и лиц, официально признанных ответственными за пациентов на момент проведения исследования. Пациенты и их родственники были информированы о характере исследования, его цели и возможных осложнениях, а также могли в любое время в одностороннем порядке прервать исследование.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Spasova D.S., Surh C.D. Blowing on embers: commensal microbiota and our immune system // *Front Immunol.* 2014; 5: 318.
2. Carabotti M., Scirocco A., Maselli M.A., Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems // *Ann Gastroenterol.* 2015; 28 (2): 203–209.
3. Wang H.X., Wang Y.P. Gut Microbiota-brain Axis // *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2016; 5th Oct., 129 (19): 2373–80. doi: 10.4103/0366-6999.190667.
4. Khan F., Oloketuyi S.F. A future perspective on neurodegenerative diseases: Nasopharyngeal and gut microbiota // *J. Appl. Microbiol.* 2016; Oct., 14. doi: 10.1111/jam.13327.
5. Miller Diane B., O'Callaghan James P., Biomarkers of Parkinson's Disease (Pd): Present and Future // *Metabolism.* 2015; Mar., 64 (301): 40–46. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.030.

6. Maresova P., Klimova B., Novotny M., Kuca K. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe-A Call for a Uniform European Strategy // *J. Alzheimers. Dis.* 2016; Oct., 4; 54 (3): 1123–1133.
7. Scheperjans F., Aho V., Pereira P.A., Koskinen K., Paulin L., Pekkonen E. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype // *Mov Disord.* 2015; Mar., 30 (3): 350–358. doi: 10.1002/mds.26069.
8. Keshavarzian A., Green S.J., Engen P.A., Voigt R.M., Naqib A., Forsyth C.B., et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease // *Mov Disord.* 2015; Sep., 30 (10): 1351–1360. doi: 10.1002/mds.26307.
9. Egshatyan L., Kashtanova D., Popenko A., Tkacheva O., Tyakht A., Alexeev D. et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance // *Endocr. Connect.* 2016; Jan., 5 (1): 1–9. doi: 10.1530/EC-15-0094.
10. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010; May, 7 (5): 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
11. DeSantis, T.Z., P. Hugenholtz, N. Larsen. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5069–5072.
12. Ritari J., Salojärvi J., Lahti L & de Vos W.M. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database // *BMC Genomics.* 2015; Dec., 12, 16 (1): 1056. doi: 10.1186/s12864-015-2265-y
13. Paulson J.N., Stine O.C., Bravo H.C., Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nat Methods.* 2013; Dec., 10 (12): 1200–1202. doi: 10.1038/nmeth.2658.
14. Giloteaux L., Goodrich J.K., Walters W.A., Levine S.M., Ley R.E., Hanson M.R. Reduced diversity and altered composition of the gut microbiome in individuals with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome // *Microbiome.* 2016; 4 (1): 1.
15. Wright E.K., Kamm M.A., Teo S.M., Inouye M., Wagner J., Kirkwood C.D. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review // *Inflamm Bowel Dis.* 2015; Jun., 21 (6): 1219–1228. doi: 10.1097/MIB.0000000000000382.
16. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota // *Nature.* 2012; Sep., 13, 489 (7415): 220–230. doi: 10.1038/nature11550
17. Jeraldo P., Hernandez A., Nielsen H.B., Chen X., White B.A., Goldenfeld N., Nelson H., Alhquist D., Boardman L., Chia N. Capturing One of the Human Gut Microbiome's Most Wanted: Reconstructing the Genome of a Novel Butyrate-Producing, Clostridial Scavenger from Metagenomic Sequence Data // *Front Microbiol.* 2016; May, 26 (7): 783. doi: 10.3389/fmicb.2016.00783.
18. Riviére A., Selak M., Lantin D., Leroy F., De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut // *Front Microbiol.* 2016; Jun, 28 (7): 979. doi: 10.3389/fmicb.2016.00979.
19. Takada T., Kurakawa T., Tsuji H., Nomoto K. Fusicatenibacter saccharivorans gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; Oct., 63 (10): 3691–3696. doi: 10.1099/ijs.0.045823-0.
20. Sleat R., Mah R.A. Clostridiurn populeti sp. nov., a Cellulolytic Species from a Woody-Biomass Digestor. // *International Journal of systematic bacteriology.* Apr. 1985; 35 (2): 160–163.
21. Kverka M., Zakostelska Z., Klimesova K., Sokol D., Hudcovic T., Hrnčir T., Rossmann P., Mrazek J., Kopečný J., Verdu E.F., Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition // *Clin. Exp. Immunol.* 2011 Feb; 163 (2): 250–259. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x.
22. Bui T.P., Ritari J., Boeren S., de Waard P., Plugge C.M., de Vos W.M. Production of butyrate from lysine and the Amadori product fructoselysine by a human gut commensal // *Nat. Commun.* 2015; Dec., 1, 6: 10062.
23. Jangi S. et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis // *Nat. Commun.* 7:12015. doi: 10.1038/ncomms12015 (2016).
24. Stock I., Sherwood K.J., Wiedemann B. Antimicrobial susceptibility patterns, beta-lactamases, and biochemical identification of Yokenella regensburgei strains. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; Jan., 48 (1): 5–15.
25. Hong H., Kim B.S., Im H.I. Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. // *Int. Neurol.* 2016; May, 20 (1): 2–7. doi: 10.5213/inj.1632604.302.
26. Gerritsen J., Fuentes S., Grievink W., van Niftrik L., Tindall B.J., Timmerman H.M., Rijkers G.T., Smidt H. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014; May, 64 (5): 1600–1616. doi: 10.1099/ijs.0.059543-0.
27. Russell W.R., Duncan S.H., Scobbie L., Duncan G., Cantlay L., Calder A.G., Anderson S.E., Flint H.J. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein // *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; Mar., 57 (3): 523–535. doi: 10.1002/mnfr.201200594.
28. Salopek-Sondi B., Piljac-Zegarac J., Magnus V., Kopjar N. Free radical-scavenging activity and DNA damaging potential of auxins IAA and 2-methyl-IAA evaluated in human neutrophils by the alkaline comet assay // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2010; May–June, 24 (3): 165–173. doi: 10.1002/jbt.20323.

29. Dalmazzo L.F., Santana-Lemos B.A., J6como R.H., Garcia A.B., Rego E.M., da Fonseca L.M., Falcro R.P. Antibody-targeted horseradish peroxidase associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis in vitro in hematological malignancies // *Leuk. Res.* 2011; May, 35 (5): 657–662. doi: 10.1016/j.leukres.2010.11.025.
30. Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Matsushashi T., Matsuo A., Sato T., Oba Y., Watanabe S., Minaki D., Saigusa D., Shimbo H., Mori N., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Yuri A., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Kohzaki M., Anzai J., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Toyomizu M., Ito S., Osaka H., Hayashi K., Abe T. Mitochonic acid 5 (MA-5), a derivative of the plant hormone indole-3-acetic acid, improves survival of fibroblasts from patients with mitochondrial diseases // *Toboku J. Exp. Med.* 2015; 236 (3): 225–232. doi: 10.1620/tjem.236.225.
31. Lepeta K., Lourenco M.V., Schweitzer B.C., Martino Adami P.V., Banerjee P., Catuara-Solarz S., de La Fuente Revenga M., Guillem A.M., Haidar M., Ijomone O.M., Nadorp B., Qi L., Perera N.D., Refsgaard L.K., Reid K.M., Sabbar M., Sahoo A., Schaefer N., Sheean R.K., Suska A., Verma R., Vicidomini C., Wright D., Zhang X.D., Seidenbecher C. Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders – A review from students to students. // *J. Neurochem.* 2016; Sep., 138 (6): 785–805. doi: 10.1111/jnc.13713.
32. Pequegnat B., Sagermann M., Valliani M., Toh M., Chow H., Allen-Vercoe E., Monteiro M.A. A vaccine and diagnostic target for *Clostridium bolteae*, an autism-associated bacterium. // *Vaccine.* 2013; Jun, 31 (26): 2787–2790. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.04.018.
33. Kunze W.A., Mao Y.K., Wang B., Huizinga J.D., Ma X., Forsythe P., Bienenstock J. Lactobacillus reuteri enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening // *J. Cell. Mol. Med.* 2009; 13 (8B): 2261–2270.
34. Paillusson S., Clairembault T., Biraud M., Neunlist M., Derkinderen P. Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons // *J. Neurochem.* 2013; 125: 512–517.
35. Chen Y., Palm F., Lesch K., Gerlach M., Moessner R., Sommer C. 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA), a main metabolite of serotonin, is responsible for complete Freund's adjuvant-induced thermal hyperalgesia in mice // *Mol. Pain.* 2011; 7: 21.
36. Pfeleiderer A., Lagier J.C., Armougom F., Robert C., Valettes B., Raoult D. C ulturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; Nov., 32 (11): 1471–1481. doi: 10.1007/s10096-013-1900-2.
37. Goodrich J.K., Waters J.L., Poole A.C., Sutter J.L., Koren O., Blekhman R. et al. Human genetics shape the gut microbiome // *Cell.* 2014; Nov., 6, 159 (4): 789–799. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.053.
38. Woting A., Blaut M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease // *Nutrients.* 2016; Apr., 6, 8 (4): 202. doi: 10.3390/nu8040202.
39. Wang L., Li P., Tang Z., Yan X., Feng B. Structural modulation of the gut microbiota and the relationship with body weight: compared evaluation of liraglutide and saxagliptin treatment. // *Sci. Rep.* 2016; Sep., 16, 6: 33251. doi: 10.1038/srep33251.
40. Akbar U., He Y., Dai Y., Hack N., Malaty I., McFarland N.R. et al. Weight loss and impact on quality of life in Parkinson's disease // *PLoS One.* 2015; May, 4, 10 (5): e0124541. doi: 10.1371/journal.pone.0124541

Поступила в редакцию 08.11.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Петров Вячеслав Алексеевич, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Алифорова Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Салтыкова Ирина Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Ирина Александровна, канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Наталья Григорьевна, д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Дорофеева Юлия Борисовна, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Тягт Александр Викторович, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории биоинформатики, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва.

Алтухов Илья Алексеевич, лаборант-исследователь лаборатории биоинформатики, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва; аспирант, Московский физико-технический институт (государственный университет), г. Долгопрудный.

Кострюкова Елена Сергеевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией постгеномных исследований в биологии, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва.

Титова Марина Андреевна, канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Миронова Юлия Сергеевна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Ижболдина Ольга Петровна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Никитина Мария Анатольевна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Перевозчикова Татьяна Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Файт Елена Александровна, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Сазонов Алексей Эдуардович, д-р мед. наук, зам. проректора Управления научной политики и организации научных исследований МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

(✉) Петров Вячеслав Алексеевич, e-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru

УДК 616.34-008.87-092:616.858:616.8]-07

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-113-125

For citation: Petrov V.A., Alifirova V.M., Saltykova I.V., Zhukova I.A., Zhukova N.G., Dorofeeva Yu.B., Tyakht A.V., Altukhov I.A., Kostryukova E.S., Titova M.A., Mironova Yu.S., Izboldina O.P., Nikitina M.A., Perevozchikova T.V., Fait E.A., Sazonov A.E. Comparison study of gut microbiota in case of Parkinson's disease and other neurological disorders. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 113–125

## Comparison study of gut microbiota in case of Parkinson's disease and other neurological disorders

Petrov V.A.<sup>1</sup>, Alifirova V.M.<sup>1</sup>, Saltykova I.V.<sup>1</sup>, Zhukova I.A.<sup>1</sup>, Zhukova N.G.<sup>1</sup>, Dorofeeva Yu.B.<sup>1</sup>, Tyakht A.V.<sup>2</sup>, Altukhov I.A.<sup>2,3</sup>, Kostryukova E.S.<sup>2</sup>, Titova M.A.<sup>1</sup>, Mironova Yu.S.<sup>1</sup>, Izboldina O.P.<sup>1</sup>, Nikitina M.A.<sup>1</sup>, Perevozchikova T.V.<sup>1</sup>, Fait E.A.<sup>1</sup>, Sazonov A.E.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute of Physico-Chemical Medicine of Russian Federal Medico-Biological Agency (RIPCM)

1a, Malaya Pirogovskaya Str., Moscow, 119992, Russian Federation

<sup>3</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (State University)

9, Institutskiy Per., Dolgoprudny, Moscow Region, 141701, Russian Federation

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University

1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

### ABSTRACT

Currently the role of microbiota in diseases pathogenesis, its therapeutic and diagnostic potential are of the utmost interest for scientists and medical doctors. Parkinson's disease is neurodegenerative disorder for which microbiota's dysbiosis was previously shown.

**The main goal** of the study is to compare the colon microbiota composition in case of Parkinson's disease and other neurological pathologies, including idiopathic familial dystonia, essential tremor, multiple sclerosis, multiple system atrophy in order to determine the intestinal flora landscape specific to Parkinson's disease.

**Material and methods.** One hundred twenty-six patients, 93 with Parkinson's disease and 33 with other neurological pathology were examined. For all patients, physical examination and fecal samples collection were performed. Microbiota taxonomic composition was analyzed by sequencing of bacterial 16S rRNA genes followed by bioinformatic and statistical analysis.

**As a result** of the study, significant differences between groups in microbiota composition were found. Gut microbiota of patients with Parkinson's disease was characterized by increase of *Desulfovibrio piger*, *Lactobacillus mucosae*, *Yokenella regensburgei*, *Alistipes indistinctus*, *Oscillospira capillosus*, *Clostridium bolteae*, *Soleaferrea massiliensis*, *Butyrivibrio fibrisolens*, *Dorea massiliensis*, *Victivallis vadensis* abundances. Patients with other neurological diseases had increased levels of bacteria belonging to *Blautia*, *Intestinibacter*, *Coproccoccus* genera and *Anoxybacter* species. *Fusobacterium periodonticum*, *Gemmiger formicilis*, *Papillibacter cinnamivorans*, *Roseburia faecis*, *Lachnoclostridium indolis*, *Clostridium populeti*, *Clostridium tertium*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium cylindroides*, *Clostridium clariflavum*, *Eubacterium eligens*, *Coproccoccus eutactus*, *Intestinibacter bartlettii* species in their gut microbiota.

**Consequently**, gut microbiota in case of Parkinson's disease was different from the microbiota of patients with other neurological diseases, including neuroinflammatory and neurodegenerative disorders, in terms of taxonomic diversity and composition.

**Key words:** gut microbiota, Parkinson's disease, multiple sclerosis, neurological diseases, 16S rRNA gene sequencing.

Received November 08.2016

Accepted December 01.2016

**Petrov Vyacheslav A.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Alifirova Valentina M.**, MD, Professor, Head of the Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Saltykova Irina V.**, PhD, Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Irina A.**, PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Natalia G.**, MD, Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Dorofeeva Yulia B.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Tyakht Alexandr V.**, PhD, Senior Researcher, RIPCМ, Moscow, Russian Federation.

**Altukhov Ilya A.**, Laboratory Researcher, RIPCМ, Moscow; Post-graduate Student, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russian Federation.

**Kostyukova Elena S.**, PhD, Head of Laboratory Postgenomics Researchs in Biology, RIPCМ, Moscow, Russian Federation.

**Titova Marina A.**, PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Mironova Yulia S.**, Post-graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Izhboldina Olga P.**, Post-graduate Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Nikitina Maria A.**, Post-graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Perevozchikova Tatyana V.**, PhD, Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Fait Elena A.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Sazonov Alexey E.**, MD, Deputy Vice-Rector, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

(✉) **Petrov Vyacheslav A.**, e-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru

УДК 616.23/.24-002.2-085.835.3:616.26-008

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-126-133

Для цитирования: Титова О.Н., Кузубова Н.А., Волчков В.А., Козырев А.Г., Гичкин А.Ю., Склярова Д.Б. Функциональное состояние диафрагмы у больных хронической обструктивной болезнью легких на фоне проведения длительной кислородотерапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 126–133

## Функциональное состояние диафрагмы у больных хронической обструктивной болезнью легких на фоне проведения длительной кислородотерапии

Титова О.Н.<sup>1</sup>, Кузубова Н.А.<sup>1</sup>, Волчков В.А.<sup>2</sup>, Козырев А.Г.<sup>1</sup>, Гичкин А.Ю.<sup>1</sup>, Склярова Д.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова  
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Изучить функциональное состояние диафрагмы у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), осложнившейся хронической гипоксемией.

**Материал и методы.** Были обследованы 90 больных ХОБЛ (III–IV стадии по классификации GOLD, 2015), относящихся к группе риска D: 45 больных с хронической гипоксемией и 45 нормоксемичных пациента. Оценивались спирометрические показатели, сатурация кислорода и кислород артериальной крови, одышка по шкале модифицированного вопросника Британского медицинского исследовательского совета (mMRC), количество обострений ХОБЛ. Проводилось ультразвуковое исследование диафрагмы.

Пациенты обследовались дважды, исходно при поступлении в стационар и через 12 мес. Всем больным с хронической гипоксемией назначали длительную кислородотерапию (ДКТ).

**Результаты.** Изучение характеристик больных ХОБЛ показало, что пациенты с гипоксемией отличались от нормоксемичных больных не только более выраженными одышкой и ограничением скорости воздушного потока, но и функциональным состоянием диафрагмы. Назначение ДКТ сопровождалось через 1 год у больных с гипоксемией динамикой функционального состояния диафрагмы (увеличением скорости расслабления мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании) и снижением числа обострений ХОБЛ.

**Заключение.** Изменение функции диафрагмы может быть одним из механизмов положительного влияния ДКТ на прогноз ХОБЛ, в том числе на число обострений болезни у больных с гипоксемией.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, гипоксемия, длительная кислородотерапия, диафрагма.

### ВВЕДЕНИЕ

Почти сразу после открытия кислорода в начале 1770-х гг., приоритет которого оспаривается между трудами английского химика Джозефа Пристли и шведского фармацевта Карла Виль-

гельма Шееле, стали предприниматься попытки использования этого газа в медицинских целях. Пионерами в области применения кислорода для длительной терапии респираторных заболеваний стали в 1950–1960 гг. А. Barach, J.E. Cotes, J.C. Gilson, A.K. Pierce, T. Petty [1]. Благодаря их усилиям длительная кислородотерапия (ДКТ)

✉ Козырев Андрей Геннадьевич, e-mail: kozyrev@bk.ru.

в амбулаторных условиях к настоящему времени является общепризнанным и, что немаловажно, широко распространенным методом оказания медицинской помощи больным с хронической гипоксемической дыхательной недостаточностью (ХГДН).

В 2013 г. в г. Санкт-Петербурге был открыт Городской респираторный центр, основной задачей которого является организация ДКТ больным с ХГДН. Существенным отличием работы центра стало обеспечение больных кислородными концентраторами, которое в соответствии с решением правительства г. Санкт-Петербурга впервые в Российской Федерации финансируется из городского бюджета. Начиная с 2015 г. предоставлено уже около 100 концентраторов. Такой подход является экономически оправданным. Снижая количество обострений хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), основной причины ХГДН, проведение ДКТ позволяет уменьшить количество госпитализаций таких пациентов и, как следствие, общие расходы на их лечение [2].

Назначение ДКТ рассматривается как единственный способ продлить жизнь больному с ХГДН. Показано, что проведение такого лечения оказывает положительное действие на легочную гемодинамику, сопровождается повышением переносимости физических нагрузок, уменьшением выраженности депрессии, улучшением качества жизни [3]. Вместе с тем остается и много вопросов, требующих дальнейшего уточнения. Современные принципы назначения ДКТ по-прежнему вытекают из результатов всего двух исследований, Nocturnal Oxygen Therapy Trial (NOTT) и Medical Research Council Trial (MRC), проведенных еще в начале 1980-х гг. и методологически не вполне совпадавших. Не вполне ясно, в частности, насколько эффективно назначение ДКТ не только больным ХОБЛ, которая была условием включения в NOTT и MRC, но и пациентам, страдающим другими заболеваниями, приводящими к ХГДН (интерстициальные заболевания легких, муковисцидоз и т.д.). Дискутируется целесообразность кислородного лечения при продолжении пациентом курения, в случаях, когда выраженная гипоксемия наблюдается только в периоды обострений респираторной патологии, или когда ДКТ сочетается с другими методами респираторной поддержки, например неинвазивной вентиляцией легких.

Детализация показаний к назначению ДКТ тесно связана с выявлением предикторов необходимости для пациента в обозримом будущем такого лечения и выживаемостью больных, уже

находящихся на кислородной поддержке. Предпринимались повторные попытки выяснить прогностическое значение нарушений показателей функции внешнего дыхания, особенно такой скрининговой величины, как объем форсированного выдоха за первую секунду ( $ОФВ_1$ ). К настоящему времени известно, что, хотя у подавляющего большинства больных с ХГДН наблюдаются низкие уровни  $ОФВ_1$ , само по себе его падение необязательно сочетается со значительной гипоксемией, а только делает ее подтверждение более вероятным [4, 5]. Влияние степени отклонений функции внешнего дыхания на выживаемость пациентов на ДКТ одними исследователями подтверждается [6], другими – нет [7]. Риск летального исхода у больных, получающих кислородное лечение, определяется выраженностью гипоксемии и гиперкапнии, анемии (особенно в сравнении с полицитемией), возрастом, полом пациента, продолжением курения, присутствием сопутствующих заболеваний [8–11]. Большое значение для выживания таких больных имеют также индекс массы тела и сопутствующие заболевания [12].

Еще одним фактором, который влияет на летальность среди больных ХОБЛ, является диафрагмальная дисфункция [13]. Подвижность диафрагмы сказывается у таких пациентов также на величине одышки и переносимости физических нагрузок [14].

Дисфункция диафрагмы у больных ХОБЛ объясняется рядом причин [15], которые можно разделить на респираторные и системные. К первым относится хроническая гиперинфляция, приводящая к уплощению и ухудшению контрактной способности диафрагмы, а также постоянная необходимость справляться с преодолением повышенного сопротивления дыхательных путей. Системными факторами являются системное воспаление и оксидативный стресс, нарушение газового состава крови, пожилой возраст и сопутствующие заболевания, характерные для больных ХОБЛ, дефицит анаболических стероидов, недостаток общей физической активности, ряд лекарств, применяемых для лечения таких пациентов, в первую очередь системные глюкокортикостероиды. Следует ожидать, что влияние перечисленных факторов на состояние диафрагмы будет особенно велико у больных с терминальными стадиями ХОБЛ, сопровождающимися выраженной гипоксемией.

Целью нашего исследования явилось изучение функционального состояния диафрагмы у больных ХОБЛ с хронической гипоксемической

дыхательной недостаточностью на фоне проведения длительной кислородотерапии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 90 больных ХОБЛ, в т.ч. 69 мужчин и 21 женщина, средний возраст которых составил  $(66 \pm 6)$  лет. В исследование включались больные ХОБЛ с III–IV стадиями заболевания по классификации GOLD, пересмотр 2015 г., относившиеся к группе риска D. В группу 1 входили 45 больных с хронической гипоксемией, в группу 2 – 45 нормоксемичных пациента. Преобладающим был смешанный (эмфизематозно-бронхитический) фенотип болезни. В исследование не включались пациенты, переносившие в течение последних 2 мес обострения ХОБЛ, больные с клинически значимой сопутствующей патологией, с хирургическими вмешательствами на органах грудной клетки, острым инфарктом миокарда, острым нарушением мозгового кровообращения в анамнезе. Проводившаяся медикаментозная терапия строилась согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ХОБЛ. На момент включения в исследование все пациенты подписали информированное согласие.

У больных оценивалась тяжесть одышки по шкале модифицированного вопросника Британского медицинского исследовательского совета (mMRC). Проводилась пульсоксиметрия с уточнением уровня сатурации кислородом ( $\text{SaO}_2$ , %) и анализ газового состава артериальной крови, полученной путем катетеризации лучевой артерии, с определением величины парциального напряжения кислорода ( $\text{PaO}_2$ , мм рт. ст.).

Спирометрия выполнялась на приборе для комплексного исследования функциональных показателей внешнего дыхания Masterscreen (Erich Jager, Германия). Определялись следующие параметры: жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду ( $\text{ОФВ}_1$ ), индекс Тиффно (ИТ). Оценка результатов спирометрии проводилась с использованием должных величин, определенных по инструкции, разработанной Р.Ф. Клементом, Н.А.Зильбером (1986).

Для оценки функционального состояния диафрагмы проводилось сканирование диафрагмы с помощью ультразвуковой диагностической системы VIVID 7 Dimension (GE, США), матричного конвексного датчика, несущая частота 2–4 МГц. Локация диафрагмы осуществлялась из правого подреберья, по срединноключичной линии. Использовались следующие режимы работы аппарата:

М-режим, анатомический М-режим, В-режим. Все показатели функционального состояния диафрагмы определялись как при спокойном дыхании (СД), так и при форсированном (ФД). Рассчитывались фракция утолщения (ФУ), скорость сокращения (СС) и скорость расслабления (СР) мышечной части диафрагмы.

После проведенного обследования пациентам из группы 1 назначалась длительная кислородотерапия на дому с помощью кислородных концентраторов продолжительностью не менее 16–18 ч в сутки. Через 12 мес больные обследовались повторно.

В группах 1 и 2 уточнялось количество обострений ХОБЛ, произошедших в течение 1 года. Обострением считалось ухудшение течения болезни, потребовавшее проведения антибактериальной и (или) системной глюкокортикостероидной терапии. Количество обострений, развившихся за 12 мес наблюдения, сравнивалось с тем же периодом времени, предшествовавшим включению в исследование.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 for Windows. С целью проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро – Уилка. При нормальном распределении параметры описывались с помощью среднего арифметического значения  $M$  и стандартного отклонения  $SD$ , не подчиняющиеся нормальному закону распределения – в виде медианы  $Me$ , 25-го и 75-го перцентилей ( $Q_{25}$ ;  $Q_{75}$ ). Для оценки достоверности различий в случае нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, а при распределении, отличающемся от нормального, – критерии Манна – Уитни (независимые переменные) и Вилкоксона (зависимые переменные). Статистически значимым считали уровень  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе 1 (пациенты с хронической гипоксемией) величина  $\text{PaO}_2$  составляла 59 (54; 50) мм рт. ст., в группе 2 (пациенты с нормоксемией) – 80 (72; 89) мм рт. ст. (табл. 1). Различия между группами по уровню  $\text{PaO}_2$  были достоверны,  $p < 0,001$ . Пациенты из групп 1 и 2 отличались также по показателю  $\text{SaO}_2$ : 88 (87; 90)% и 93 (92; 94)% соответственно,  $p < 0,001$ .

Продолжительность заболевания от момента установления диагноза достоверно не отличалась и составляла 9 (6; 10) лет у пациентов из группы 1 и 8 (6; 10) лет из группы 2. Стаж курения также был сопоставимым: 40 (35; 47) пачка/лет и 40

(40; 50) пачка/лет в группах 1 и 2 соответственно. У больных ХОБЛ с гипоксемией по сравнению с нормоксемичными пациентами выявлялась более выраженная одышка при оценке в баллах по шкале mMRC: 4 (4; 4) и 2 (2; 3) соответственно,  $p < 0,001$ .

Показатели ЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub> и ИТ в группах достоверно не отличались, однако у больных с гипоксемией по сравнению с больными без гипоксемии снижение ФЖЕЛ было заметнее,  $(48,7 \pm 7,5)\%$  и  $(62,5 \pm 5,6)\%$  соответственно,  $p = 0,008$ .

Т а б л и ц а 1

| Характеристика обследованных пациентов               |                  |                 |
|------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| Показатель                                           | Группа 1         | Группа 2        |
| Возраст, $M \pm SD$ , лет                            | $67 \pm 6$       | $65 \pm 6$      |
| Продолжительность заболевания, $Me (Q25; Q75)$ , лет | 9 (6; 10)        | 8 (6; 10)       |
| Стаж курения, $Me (Q25; Q75)$ , пачка/лет            | 40 (35; 47)      | 40 (40; 50)     |
| $PaO_2$ , $Me (Q25; Q75)$ , мм рт. ст.               | 59 (54; 60)**    | 80 (72; 89)     |
| $SaO_2$ , $Me (Q25; Q75)$ , %                        | 88 (87; 90)**    | 93 (92; 94)     |
| mMRC, $Me (Q25; Q75)$ , баллы                        | 4 (4; 4)**       | 2 (2; 3)        |
| ЖЕЛ, $M \pm SD$ , % от должного                      | $47,5 \pm 9,7$   | $51,5 \pm 10,6$ |
| ОФВ <sub>1</sub> , $M \pm SD$ , % от должного        | $31,5 \pm 7,8$   | $33,48 \pm 7,9$ |
| ФЖЕЛ, $M \pm SD$ , % от должного                     | $48,7 \pm 7,5^*$ | $62,5 \pm 5,6$  |
| ИТ, $M \pm SD$ , %                                   | $51,8 \pm 10,3$  | $49,6 \pm 7,7$  |

\*  $p = 0,008$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

При исследовании функциональных показателей диафрагмы было выявлено, что больные с гипоксемией по сравнению с нормоксемичными пациентами отличались более низкими величинами СР/СД:  $(1,45 \pm 0,09)$  см/с и  $(2,13 \pm 0,16)$  см/с соответственно,  $p = 0,014$  (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

| Характеристика функционального состояния диафрагмы у обследованных пациентов, $M \pm SD$ |                   |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Показатель                                                                               | Группа 1          | Группа 2        |
| Скорость сокращения мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, см/с                 | $1,95 \pm 0,11$   | $2,14 \pm 0,09$ |
| Скорость сокращения мышечной части диафрагмы при форсированном дыхании, см/с             | $4,21 \pm 0,39$   | $4,02 \pm 0,35$ |
| Скорость расслабления мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, см/с               | $1,45 \pm 0,09^*$ | $2,13 \pm 0,16$ |
| Скорость расслабления мышечной части диафрагмы при форсированном дыхании, см/с           | $4,10 \pm 0,53$   | $4,02 \pm 0,35$ |
| Фракция утолщения мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, см                     | $0,22 \pm 0,02$   | $0,27 \pm 0,02$ |
| Фракция утолщения мышечной части диафрагмы при форсированном дыхании, см                 | $0,17 \pm 0,01$   | $0,20 \pm 0,06$ |

\*  $p = 0,014$ .

Повторное обследование с учетом критериев исключения прошли 32 больных из группы 1 и 38 больных из группы 2. Трое больных из группы 1 скончались (в одном случае причиной было прогрессирование ХГДН, в двух – сердечно-сосудистые события).

При проведении повторного обследования у больных в группе 1 отмечена динамика СР/СД. По сравнению с исходным значением  $(1,45 \pm 0,09)$  см/с на фоне ДКТ наблюдалось повышение данного показателя до  $(2,25 \pm 0,20)$  см/с,  $p = 0,016$ . Достоверных различий между группами 1 и 2 как по этому показателю, так и по другим параметрам, характеризующим функциональное состояние диафрагмы, при повторном исследовании не выявлено (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

| Характеристика функционального состояния диафрагмы у обследованных больных ХОБЛ с гипоксемией, $M \pm SD$ |                   |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Показатель                                                                                                | До начала ДКТ     | На фоне ДКТ     |
| Скорость сокращения мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, см/с                                  | $1,95 \pm 0,11$   | $2,02 \pm 0,08$ |
| Скорость сокращения мышечной части диафрагмы при форсированном дыхании, см/с                              | $4,21 \pm 0,39$   | $4,35 \pm 0,34$ |
| Скорость расслабления мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, см/с                                | $1,45 \pm 0,09^*$ | $2,25 \pm 0,20$ |
| Скорость расслабления мышечной части диафрагмы при форсированном дыхании, см/с                            | $4,10 \pm 0,33$   | $4,88 \pm 0,35$ |
| Фракция утолщения мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, см                                      | $0,22 \pm 0,02$   | $0,24 \pm 0,04$ |
| Фракция утолщения мышечной части диафрагмы при форсированном дыхании, см                                  | $0,17 \pm 0,01$   | $0,19 \pm 0,03$ |

\*  $p = 0,016$ .

Назначение ДКТ больным группы 1 ассоциировалось с заметным снижением количества обострений ХОБЛ. За год, предшествовавший началу применения ДКТ, количество обострений в год в группе 1 оценивалось как 3 (3; 4), что существенно превышало показатель группы 2 (2 (2; 3);  $p < 0,001$ ). За год применения кислородных концентраторов количество обострений в группе 1 снизилось до 2 (1; 2) ( $p < 0,001$ ) и не отличалось от показателя группы 2, составлявшего 2 (1; 2).

В результате проведенного обследования было установлено, что больные ХОБЛ с ХГДН отличаются от нормоксемичных пациентов не только более выраженными нарушениями показателей функции внешнего дыхания, газового состава крови, толерантности к физическим нагрузкам, но и характеристиками функционального состояния

диафрагмы. Были показаны достоверные различия между группами больных в отношении скорости расслабления мышечной части диафрагмы при спокойном дыхании, которая оказалась более чувствительным показателем по сравнению с прочими.

Зависимость характеристик функционального состояния диафрагмы от тяжести течения ХОБЛ, в частности от степени обструктивных нарушений функции внешнего дыхания, уже отмечалась ранее [16–18]. Возможно, что у наиболее тяжелых больных ХОБЛ формируется своеобразный порочный круг. Прогрессирование обструктивного синдрома сопровождается истощением компенсаторных возможностей и прогрессирующим утомлением диафрагмы, главной дыхательной мышцы, что в свою очередь усугубляет гиперинфляцию и приводит к нарастанию нарушений газового состава крови. Назначение в такой ситуации ДКТ способствует восстановлению функциональных возможностей диафрагмы и внешнего дыхания в целом.

Обострения ХОБЛ являются важнейшим фактором риска, определяющим прогноз заболевания и влияющим на смертность, особенно у пациентов с тяжелым течением болезни [19, 20]. Больные с гипоксемией, которых обследовали, гораздо чаще демонстрировали обострения ХОБЛ, чем нормоксемичные пациенты, хотя все они были сопоставимы по классификации GOLD (2015). Назначение ДКТ и коррекция газового состава крови сопровождались существенным снижением количества ежегодных обострений ХОБЛ, что согласуется с наблюдениями других авторов [21]. Частота обострений на фоне ДКТ у пациентов с ХГДН становилась сопоставимой с аналогичным показателем для нормоксемичных больных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что больные ХОБЛ с ХГДН отличаются от сопоставимых нормоксемичных пациентов не только более выраженными одышкой и ограничением скорости воздушного потока, но и функциональным состоянием диафрагмы. Не исключено, что изменение функции основной дыхательной мышцы у больных с гипоксемией после начала ДКТ является одним из направлений реализации положительного влияния данного метода лечения на количество обострений ХОБЛ.

## 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Heffner J.E. The story of oxygen // *Respir Care*. 2013; 58 (1): 18–31.
2. Титова О.Н., Колабутин В.М., Кузубова Н.А., Волчков В.А., Козырев А.Г. Организация лечения больных пульмонологического профиля с хронической гипоксемической дыхательной недостаточностью в Санкт-Петербурге: первый опыт // *Здравоохранение Российской Федерации*. 2015; . 59 (6): 30–33.
3. COPD Working Group. Long-term oxygen therapy for patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): an evidence-based analysis // *Ont. Health. Technol. Assess. Ser.* 2012; 12 (7): 1–64.
4. Lim S., MacRae K.D., Seed W.A., Roberts C.M. The value of forced expiratory volume in 1 s in screening subjects with stable COPD for  $\text{PaO}_2 < 7.3$  kPa qualifying for long-term oxygen therapy // *Respir. Med.* 1998; 92 (9): 1122–1126.
5. Rodríguez D.A., Jover L., Drakulovic M.B., Gómez F.P., Roca J., Albert Barbera J., Wagner P.D., Rodríguez-Roisin R. Below what FEV1 should arterial blood be routinely taken to detect chronic respiratory failure in COPD? // *Arch. Bronconeumol.* 2011; 47 (7): 325–329.
6. Dallari R., Barozzi G., Pinelli G., Merighi V., Grandi P., Manzotti M., Tartoni P.L. Predictors of survival in subjects with chronic obstructive pulmonary disease treated with long-term oxygen therapy // *Respiration*. 1994; 61 (1): 8–13.
7. Law S., Boyd S., Macdonald J., Raeside D., Anderson D. Predictors of survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease receiving long-term oxygen therapy // *BMJ Support Palliat. Care*. 2014; 4 (2): 140–145.
8. Boutou A.K., Karrar S., Hopkinson N.S., Polkey M.I. Anemia and survival in chronic obstructive pulmonary disease: a dichotomous rather than a continuous predictor // *Respiration*. 2013; 85 (2): 126–131.
9. Ekström M.P., Jørgéus C., Ström K.E. Comorbidity and sex-related differences in mortality in oxygen-dependent chronic obstructive pulmonary disease // *PLoS One*. 2012; 7 (4): e35806.
10. Kollert F., Tippelt A., Müller C., Jörres R.A., Porzelius C., Pfeifer M., Budweiser S. Hemoglobin levels above anemia thresholds are maximally predictive for long-term survival in COPD with chronic respiratory failure // *Respir. Care*. 2013; 58 (7): 1204–1212.
11. Lima D.F., Dela Coleta K., Tanni S.E., Silveira L.V., Godoy I., Godoy I. Potentially modifiable predictors of mortality in patients treated with long-term oxygen therapy // *Respir. Med.* 2011; 105 (3): 470–476.
12. Marti S., Mucoz X., Rios J., Morell F., Ferrer J. Body weight and comorbidity predict mortality in COPD patients treated with oxygen therapy // *Eur. Respir. J.* 2006; 27 (4): 689–696.

13. Yamaguti W.P., Paulin E., Salge J.M., Chammas M.C., Cukier A., Carvalho C.R. Diaphragmatic dysfunction and mortality in patients with COPD // *J. Bras. Pneumol.* 2009; 35 (12): 1174–1181.
14. Paulin E., Yamaguti W.P., Chammas M.C., Shibao S., Stelmach R., Cukier A., Carvalho C.R. Influence of diaphragmatic mobility on exercise tolerance and dyspnea in patients with COPD // *Respir. Med.* 2007; 101 (10): 2113–2118.
15. Gea J., Pascual S., Casadevall C., Orozco-Levi M., Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings // *J. Thorac. Dis.* 2015; 7 (10): E418–E438.
16. Александров А.А., Перлей В.Е., Гичкин А.Ю., Суркова Е.Г., Яковлева Н.Г., Кузубова Н.А. Взаимосвязь функционального состояния диафрагмы с показателями функции внешнего дыхания у больных ХОБЛ с тяжелым и среднетяжелым течением // *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.* 2012; 19 (3): 66–69.
17. Dos Santos Yamaguti W.P., Paulin E., Shibao S., Chammas M.C., Salge J.M., Ribeiro M., Cukier A., Carvalho C.R. Air trapping: The major factor limiting diaphragm mobility in chronic obstructive pulmonary disease patients // *Respirology.* 2008; 13 (1): 138–144.
18. Scheibe N., Sosnowski N., Pinkhasik A., Vonderbank S., Bastian A. Sonographic evaluation of diaphragmatic dysfunction in COPD patients // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015; 10: 1925–1930.
19. Hurst J.R., Vestbo J., Anzueto A., Locantore N., Millerova H., Tal-Singer R., Miller B., Lomas D.A., Agustí A., Macnee W, Calverley P, Rennard S., Wouters E.F, Wedzicha J.A. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease // *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (12): 1128–1138.
20. Suissa S., Dell'Aniello S., Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality // *Thorax.* 2012; 67 (11): 957–963.
21. Ringbaek T.J., Viskum K., Lange P.. Does long-term oxygen therapy reduce hospitalisation in hypoxaemic chronic obstructive pulmonary disease? // *Eur. Respir. J.* 2002; 20 (10): 38–42.

Поступила в редакцию 19.05.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Титова Ольга Николаевна**, д-р мед. наук, профессор, директор НИИ пульмонологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

**Кузубова Наталия Анатольевна**, д-р мед. наук, зам. директора по научной работе НИИ пульмонологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

**Волчков Владимир Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург.

**Козырев Андрей Геннадьевич**, канд. мед. наук, зав. лабораторией экологической и профессиональной пульмонологии НИИ пульмонологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

**Гичкин Алексей Юрьевич**, канд. мед. наук, зав. лабораторией клинической физиологии кровообращения НИИ пульмонологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

**Склярова Дарья Борисовна**, мл. научный сотрудник лаборатории интерстициальных заболеваний легких НИИ пульмонологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

(✉) Козырев Андрей Геннадьевич, e-mail: kozyrev@bk.ru

УДК 616.23/.24-002.2-085.835.3:616.26-008

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-126–133

For citation: Titova O.N., Kuzubova N.A., Volchikov V.A., Kozyrev A.G., Gichkin A.Yu., Skljjarova D.B. Functional state of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease on long-term oxygen therapy. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (5): 126–133

## Functional state of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease on long-term oxygen therapy

Titova O.N.<sup>1</sup>, Kuzubova N.A.<sup>1</sup>, Volchikov V.A.<sup>2</sup>, Kozyrev A.G.<sup>1</sup>, Gichkin A.Yu.<sup>1</sup>, Skljjarova D.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> First Pavlov State Medical University of St. Petersburg  
6/8, L'va Tolstogo Str., St. Petersburg, 197022, Russian Federation

<sup>2</sup> St. Petersburg State University  
7/9, Universitetskaya Nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

**ABSTRACT**

**Purpose.** To study the functional state of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) complicated by chronic hypoxemia.

**Materials and methods.** The study included 90 patients with COPD III–IV stages, group D (GOLD, 2015): 45 patients with chronic hypoxemia and 45 normoxemic patients. The following parameters were analyzed: spirometric level, oxygen saturation and arterial blood oxygen, breathlessness (by the Modified British Medical Research Council Questionnaire), rate of COPD exacerbations. Ultrasound examination of the diaphragm was conducted.

Investigations were carried out twice: at baseline and after 12 months of observation. All patients with chronic hypoxemia were prescribed long-term oxygen therapy (LTOT).

**Results.** The study of functional indicators in COPD patients revealed that the presence of hypoxemia was characterized, as compared with normoxemic patients, not only by more severe breathlessness and airflow limitation, but the alteration of diaphragmatic function. LTOT appointment in hypoxemic patients was accompanied in a year by changes in the functional state of the diaphragm (increase in relaxation rate of the diaphragm during quiet breathing) and a reduction in the number of COPD exacerbations.

**Conclusion.** The shift in diaphragm function could mediate the positive impact of LTOT on COPD prognosis, including the number of COPD exacerbations in patients with hypoxemia.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, hypoxemia, long-term oxygen therapy, diaphragm.

**REFERENCES**

1. Heffner J.E. The story of oxygen // *Respir Care*. 2013; 58 (1): 18–31.
2. Titova O.N., Kolabutin V.M., Kuzubova N.A., Volchikov V.A., Kozyrev A.G. Organizatsiya lecheniya bol'nykh pul'monologicheskogo profilja s hronicheskoi gipoksemicheskoi dyhatel'noi nedostatochnost'yu v Sankt-Peterburge: pervyi opyt [The management of patients with pulmonary diseases and chronic hypoxemic respiratory failure in Saint-Petersburg: the first experience] // *Zdravoobranenie Rossijskoj Federacii*. 2015; 59 (6): 30–33 (in Russian).
3. COPD Working Group. Long-term oxygen therapy for patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): an evidence-based analysis // *Ont. Health. Technol. Assess. Ser.* 2012; 12 (7): 1–64.
4. Lim S., MacRae K.D., Seed W.A., Roberts C.M. The value of forced expiratory volume in 1 s in screening subjects with stable COPD for  $\text{PaO}_2 < 7.3$  kPa qualifying for long-term oxygen therapy // *Respir. Med.* 1998; 92 (9): 1122–1126.
5. Rodríguez D.A., Jover L., Drakulovic M.B., Gómez F.P., Roca J., Albert Barbera J., Wagner P.D., Rodríguez-Roisin R. Below what FEV1 should arterial blood be routinely taken to detect chronic respiratory failure in COPD? // *Arch. Bronconeumol.* 2011; 47 (7): 325–329.
6. Dallari R., Barozzi G., Pinelli G., Merighi V., Grandi P., Manzotti M., Tartoni P.L. Predictors of survival in subjects with chronic obstructive pulmonary disease treated with long-term oxygen therapy // *Respiration*. 1994; 61 (1): 8–13.
7. Law S., Boyd S., Macdonald J., Raeside D., Anderson D. Predictors of survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease receiving long-term oxygen therapy // *BMJ Support Palliat. Care*. 2014; 4 (2): 140–145.
8. Boutou A.K., Karrar S., Hopkinson N.S., Polkey M.I. Anemia and survival in chronic obstructive pulmonary disease: a dichotomous rather than a continuous predictor // *Respiration*. 2013; 85 (2): 126–131.
9. Ekström M.P., Jørgéus C., Ström K.E. Comorbidity and sex-related differences in mortality in oxygen-dependent chronic obstructive pulmonary disease // *PLoS One*. 2012; 7 (4): e35806.
10. Kollert F., Tippelt A., Müller C., Jörres R.A., Porzelius C., Pfeifer M., Budweiser S. Hemoglobin levels above anemia thresholds are maximally predictive for long-term survival in COPD with chronic respiratory failure // *Respir. Care*. 2013; 58 (7): 1204–1212.
11. Lima D.F., Dela Coleta K., Tanni S.E., Silveira L.V., Godoy I., Godoy I. Potentially modifiable predictors of mortality in patients treated with long-term oxygen therapy // *Respir. Med.* 2011; 105 (3): 470–476.
12. Marti S., Mucoz X., Rios J., Morell F., Ferrer J. Body weight and comorbidity predict mortality in COPD patients treated with oxygen therapy // *Eur. Respir. J.* 2006; 27 (4): 689–696.
13. Yamaguti W.P., Paulin E., Salge J.M., Chammas M.C., Cukier A., Carvalho C.R. Diaphragmatic dysfunction and mortality in patients with COPD // *J. Bras. Pneumol.* 2009; 35 (12): 1174–1181.
14. Paulin E., Yamaguti W.P., Chammas M.C., Shibao S., Stelmach R., Cukier A., Carvalho C.R. Influence of diaphragmatic mobility on exercise tolerance and dyspnea in patients with COPD // *Respir. Med.* 2007; 101 (10): 2113–2118.

15. Gea J., Pascual S., Casadevall C., Orozco-Levi M., Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings // *J. Thorac. Dis.* 2015; 7 (10): E418–E338.
16. Aleksandrov A.L., Perley V.E., Gichkin A.Yu., Surkova E.G., Jakovleva N.G., Kuzubova N.A. Vzaimosvjaz' funkcional'nogo sostojanija diafragmy s pokazateljami funkcii vneshnego dyhanija u bol'nyh HOBL s tjazhyolym i srednetjazhyolym techeniem [Relationship between the diaphragm functional condition and the PFT parameters in patients with severe and moderate COPD] // *Uchjonye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova.* 2012; 19 (3): 66–69 (in Russian).
17. Dos Santos Yamaguti W.P., Paulin E., Shibao S., Chammas M.C., Salge J.M., Ribeiro M., Cukier A., Carvalho C.R. Air trapping: The major factor limiting diaphragm mobility in chronic obstructive pulmonary disease patients // *Respirology.* 2008; 13 (1): 138–144.
18. Scheibe N., Sosnowski N., Pinkhasik A., Vonderbank S., Bastian A. Sonographic evaluation of diaphragmatic dysfunction in COPD patients // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015; 10: 1925–1930.
19. Hurst J.R., Vestbo J., Anzueto A., Locantore N., Müllerova H., Tal-Singer R., Miller B., Lomas D.A., Agusti A., Macnee W., Calverley P., Rennard S., Wouters E.F., Wedzicha J.A. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease // *N. Engl. J. Med.* 2010; 363 (12): 1128–1138.
20. Suissa S., Dell'Aniello S., Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality // *Thorax.* 2012; 67 (11): 957–963.
21. Ringbaek T.J., Viskum K., Lange P.. Does long-term oxygen therapy reduce hospitalisation in hypoxaemic chronic obstructive pulmonary disease? // *Eur. Respir. J.* 2002; 20 (10): 38–42.

Received May 19.2016

Accepted December 01.2016

**Titova Ol'ga N.**, MD, Professor, Director of Research Institute of Pulmonology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Russian Federation.

**Kuzubova Natalija A.**, MD, Deputy Director for Scientific Work, Research Institute of Pulmonology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Russian Federation.

**Volchikov Vladimir A.**, MD, Professor, Head of Anesthesiology and Intensive Care Department, St. Petersburg State University, Russian Federation.

**Kozyrev Andrey G.**, MD, Head of the Laboratory of Environmental and Occupational Pulmonology, Research Institute of Pulmonology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Russian Federation.

**Gichkin Aleksei Yu.**, MD, Head of the Laboratory of Clinical Physiology of Blood Circulation, Research Institute of Pulmonology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Russian Federation.

**Skjarova Dar'ja B.**, Junior Researcher of Laboratory of Interstitial Lung Disease, Research Institute of Pulmonology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Kozyrev Andrey G.**, e-mail: kozyrev@bk.ru

УДК 616.34-008.87-02:616.858

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-134-146

Для цитирования: Тяхт А.В., Алифирова В.М., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Латыпова А.В., Миронова Ю.С., Петров В.А., Ижболдина О.П., Титова М.А., Никитина М.А., Кострюкова Е.С., Дорофеева Ю.Б., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э. Связана ли микрофлора кишечника с болезнью Паркинсона? *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 134–146

## Связана ли микрофлора кишечника с болезнью Паркинсона?

Тяхт А.В.<sup>1</sup>, Алифирова В.М.<sup>2</sup>, Жукова Н.Г.<sup>2</sup>, Жукова И.А.<sup>2</sup>, Латыпова А.В.<sup>2</sup>, Миронова Ю.С.<sup>2</sup>, Петров В.А.<sup>2</sup>, Ижболдина О.П.<sup>2</sup>, Титова М.А.<sup>2</sup>, Никитина М.А.<sup>2</sup>, Кострюкова Е.С.<sup>1</sup>, Дорофеева Ю.Б.<sup>2</sup>, Салтыкова И.В.<sup>2</sup>, Сазонов А.Э.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

Россия, 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет

Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1

### РЕЗЮМЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — это нейродегенеративное заболевание со сложным патогенезом. В поисках причин развития нейродегенеративного и нейровоспалительного процесса все большую роль отводят оси «микробиота — кишечник — мозг».

**Цель исследования** — выявление связи между составом микробиоты кишечника и клиническими проявлениями БП.

**Материал и методы.** Было обследовано 89 пациентов с диагнозом БП. Был учтен анамнез, тяжесть болезни по шкале Хен и Яра, произведена оценка степени проявлений БП с помощью Унифицированной шкалы оценки проявлений БП. Дополнительно пациентами были заполнены карты оценки самочувствия пациента с болезнью Паркинсона (Parkinson's Well-Being Map). Для оценки консистенции каловых масс использовалась Бристольская шкала. Выделение ДНК проводилось в соответствии с ранее описанной методикой. Подготовка библиотек и ампликонное секвенирование маркерного варибельного участка V3–V4 бактериальных генов 16S рРНК проводились на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно стандартному протоколу производителя. Фильтрация прочтений по баллам качества и их таксономическая классификация проведены с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.0. Осуществлена оценка  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия, проанализированы различия в представленности отдельных таксономических единиц между группами пациентов при использовании программного обеспечения IBM SPSS Statistics 23.1.

**Результаты.** Выявлены значимые различия в представленности семи родов между группами пациентов с разными формами заболевания. Всего было идентифицировано около 40 родов, относительная представленность которых в сумме составила 54,8% от общего микробиотического состава кишечника, причем часть родов имели корреляции с клиническими проявлениями заболевания.

**Заключение.** Вероятно, эти микроорганизмы могут являться непосредственными участниками патогенеза БП и требуют более пристального внимания в свете новых тенденций воздействия на организм путем коррекции микробиотического состава кишечника.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, микробиом, немоторные проявления, нейродегенерация.

✉ Жукова Ирина Александровна, e-mail: irzhukova@inbox.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – это распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся моторными и немоторными проявлениями, которые коррелируют с возрастом и длительностью болезни. Немоторные проявления привлекают все больше внимания, так как их анализ может быть подтверждением новых представлений о патогенезе БП.

Развитие нейродегенеративного процесса на сегодняшний день не изучены до конца. Существует множество теорий, одна из которых – прионная. Данная гипотеза подразумевает первичное поражение периферических тканей (кишечник, ольфакторный эпителий) с последующим распространением патологического процесса в виде агрегации  $\alpha$ -синуклеина каудорострально – к центральной нервной системе [1, 2]. В основе патогенеза проявлений поражения центральных и периферических отделов нервной системы в соответствии с данной гипотезой лежит, предположительно, модификация и мисфолдинг (неправильная укладка, упаковка белков) присутствующего в нормальной нервной ткани белка  $\alpha$ -синуклеина с образованием его агрегатов, обладающих цитотоксическим эффектом [3, 4]. Причины такого действия до конца не изучены, не ясна и связь с нейровоспалительным процессом, имеющим место при нейродегенеративных заболеваниях [5]. Нейровоспаление может выступать как в роли триггера, так и быть вторичной реакцией на модификацию протеиновой структуры нейрона [6]. Экспериментальные исследования с нарушением связи между энтеральной нервной системой и стволом мозга с помощью гемиваготомии останавливали прогрессирование симптомов на токсических моделях паркинсонизма [7]. Подобные данные получены и в популяционном исследовании, которое показало снижение риска развития БП у пациентов после ваготомии [8]. Возможна и независимая от блуждающего нерва связь изменений иннервации кишечника с центральной нервной системой через токсические и провоспалительные субстанции, проникающие в системную циркуляцию из просвета кишечника в связи с повышением проницаемости его стенок. Косвенным подтверждением прионной теории является ранний, за десятки лет до установления клинического диагноза БП, дебют вегетативных периферических проявлений со стороны кишечника. Альфа-синуклеин-позитивные нейроны в слизистой оболочке кишечника и его депозиты в ядрах продолговатого мозга, регулирующих функцию желудочно-кишечного

тракта, выявляются задолго до моторной манифестации БП [9]. Частыми клиническими проявлениями этих анатомических нарушений является дисфункция желудка в виде гастропареза, раннего насыщения, анорексии, чувства переполнения желудка, тошноты и рвоты. Патология дистального отдела желудочно-кишечного тракта встречается у 20–77% пациентов с БП и часто за много лет до двигательных проявлений заболевания в виде запоров, сниженной скорости кишечного транзита, аноректальной дисфункции [10]. Запоры являются одним из наиболее частых немоторных симптомов, тяжесть которых усиливается применением дофаминергических препаратов, и, в свою очередь, играет роль в патогенезе моторных флуктуаций на поздних стадиях, нарушая всасывание леводопы [11].

Причины такой последовательности патологических изменений долгое время оставались неизученными. Однако в связи с возрастающим интересом к микробиологическому составу кишечника в норме и при патологии многие исследователи начали отмечать ассоциацию специфических нарушений микробиома кишечника с неврологической и психиатрической патологией [12]. Новое развитие получило понятие «ось – кишечник – мозг». Один из механизмов возможной способности микробиоты кишечника регулировать состояние центральной нервной системы осуществляется через активацию четырех типов toll-подобных рецепторов (TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7). Эти рецепторы, экспрессируемые нейронами энтеральной нервной системы, связываются с вирусной РНК и бактериальными пептидами, вызывая активацию нейронов в желудочно-кишечном тракте [13]. Бактерии, населяющие кишечник, способны продуцировать серотонин, мелатонин, гамма-аминомасляную кислоту, гистамин и ацетилхолин, которые известны как медиаторы центральной и периферической нервной системы [14]. Нарушение продукции этих молекул потенциально может вызывать изменения в состоянии центральной нервной системы. Активно изучается возможное влияние микрофлоры кишечника на развитие неврологической патологии. Так, получены убедительные результаты на моделях рассеянного склероза и нейродегенеративных заболеваний [15, 16]. В частности, при БП выявлено значимое снижение популяции бактерий семейства *Prevotellaceae* при сравнении с контрольной группой и корреляция состава микрофлоры кишечника с клиническим фенотипом заболевания [17]. На уровне родов микроорганизмов установлено, что относительное преобладание

«противовоспалительных» продуцирующих бутират бактерий *Blautia*, *Coproccoccus* и *Roseburia* более характерно для группы контроля, а «провоспалительных» протеобактерий рода *Ralstonia* – для больных с БП. Метагеномный анализ генов микроорганизмов, ответственных за метаболизм и биосинтез липосахаридов, также указывал на наличие у пациентов провоспалительного дисбиоза, способного индуцировать локальный синтез альфа-синуклеина и последующее развитие нейродегенеративного процесса [17].

Вероятно, определенные изменения микробиома кишечника и функции желудочно-кишечного тракта могут являться прогностическим фактором и (или) критерием для формирования групп риска развития БП, а также возможной точкой отсчета для разработки новых препаратов с нейрорепаративным эффектом.

Целью представленной работы являлось изучение взаимосвязи клинических проявлений БП с микробиотой кишечника и создание коллекции биологического материала пациентов с БП.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 89 пациентов с диагнозом БП. Диагноз определяли согласно общепринятой Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Специальный код рубрики для БП – G20 по МКБ-10. Верификацию диагноза БП осуществляли в соответствии с международными клинко-диагностическими критериями Банка головного мозга общества БП Великобритании (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank). Диагноз формулировали согласно рекомендациям Центра экстрапирамидных заболеваний Минздрава РФ с указанием клинической формы, наличия постуральной неустойчивости и нарушения ходьбы, преобладания выявленных симптомов в конечностях, выраженности когнитивных нарушений, депрессии и вегетативной недостаточности; уточнением темпа прогрессирования, с учетом наличия осложнений, связанных с длительным лечением леводопосодержащими препаратами. Стадию заболевания оценивали по шкале Хен и Яра у каждого субъекта, когда он находился в оптимальном «включенном» состоянии в соответствии со шкалой Modified Hoehn and Yahr Scale [18].

План и проведение научно-исследовательской работы полностью соответствовали принципам Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice – GCP) и Хельсинской декларации (включая поправки) [19]. Степень выраженности проявлений паркинсонизма оценивали с помощью шкалы Unified Parkinson's Disease Rating

Scale (UPDRS, Унифицированная рейтинговая шкала оценки болезни Паркинсона) [20]. Шкала UPDRS является стандартизированным, надежным и полноценным инструментом для определения тяжести клинических состояний при БП. Первый раздел UPDRS рассматривает такие функции, как мышление, поведение и настроение, II раздел – повседневную активность, III раздел – двигательные нарушения, IV раздел – осложнения лечения. Для дополнительной характеристики субъективных жалоб пациента со стороны желудочно-кишечного тракта использовали карты оценки самочувствия пациента с БП (Parkinson's Well-Being Map), раздел питание и пищеварение, где частота предъявляемых жалоб представлялась в пределах от 0 до 4 (0 – никогда, 4 – всегда).

Пациенты заполняли дневники, предусматривающие характеристику различных параметров дефекации в течение недели. Для определения консистенции каловых масс использовали Бристольскую шкалу, включающую визуальное изображение семи типов стула. Данная классификация ассоциирована с содержанием воды, состоянием кишечной экосистемы и временем кишечного транзита. Бристольская шкала может использоваться и в ранжированном варианте: наименьшее количество баллов соответствует наиболее плотным типам каловых масс и медленному кишечному транзиту, тогда как высокие баллы указывают на максимальное содержание воды и наиболее быстрый транзит. В дневнике пациенты отмечали наличие или отсутствие затруднений при дефекации, ощущения неполного опорожнения кишечника, а также указывали данные о приеме слабительных препаратов.

У всех обследуемых изучали микробиотическое разнообразие кишечника. Забор материала осуществляли согласно стандартизированной методике забора образцов кала. Из образцов, прошедших этап контроля качества, выделяли тотальную метагеномную ДНК микробиоты в соответствии с описанной стандартной методикой [21]. Подготовка библиотек и ампликонное секвенирование маркерного переменного участка V3–V4 бактериальных генов 16S рРНК проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно стандартному протоколу производителя. Фильтрация прочтений по качеству и их таксономическая классификация проводилась с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.0 [22]. Для более точного определения таксономической принадлежности прочтений использовали подход, включающий в себя применение двух таксономических баз данных. На

первом этапе командой `pick_rep_set.py` осуществляли подбор референсного набора операционных таксономических единиц (ОТЕ) бактерий на основании сравнения полученных прочтений генов 16S рРНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [23]. На втором этапе командой `assign_taxonomy.py` с использованием алгоритма RDP определяли таксономическую принадлежность данных ОТЕ на основе специализированной базы кишечной микробиоты человека HITdb, которая содержит информацию о связи ОТЕ с ближайшими культивируемыми видами [24]. Таксономическая информация о микробиоте кишечника была агрегирована на уровне бактериальных родов.

Для оценки  $\alpha$ -разнообразия проводили прореживание образцов до уровня образца с минимальной представленностью ОТЕ (3400 ОТЕ/образец) с последующим подсчетом таксономических индексов разнообразия `chao1`, `Shannon`, `PD whole tree` и `observed OTUs` в исследуемых группах. Поиск различий в степени таксономического богатства микробиоты кишечника больных с БП осуществляли в пакете `stats` языка R с использованием критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни, результат представлен в виде медианы  $Me$ , интерквартильного размаха [ $Q_1$ ;  $Q_3$ ]. Для прореживания, расчета индексов разнообразия и визуализации применяли программное обеспечение QIIME версии 1.9.1.

Для оценки  $\beta$ -разнообразия выполняли нормализацию данных с использованием алгоритма CSS [25] и расчет метрики `weighted Unifrac`. Далее, с использованием пакета `vegan` языка R, анализировали многомерное неметрическое шкалирование и определяли вклад формы заболевания в различия сообществ по составу микробиоты кишечника методами `ANOSIM` (ANalysis Of SIMilarity, анализ общности) и `Adonis` с оценкой достоверности при 999 перестановках. Нормализацию и расчет метрики считали в программном обеспечении QIIME версии 1.9.1, визуализацию проводили с помощью пакета `ggplot2` языка R.

Статистическую оценку корреляций и различий в представленности таксономических единиц анализировали при использовании программного обеспечения IBM SPSS Statistics. Сравнение между двумя группами осуществляли при использовании критерия Манна – Уитни (U), между несколькими группами – с использованием критерия Краскела – Уоллиса (H) с последующим попарным сравнением между группами. Исследование корреляций реализовывали с использованием критерия Спирмена. Статистически значимыми считали различия  $p$  на уровне 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашем исследовании приняли участие 59 (66,3%) женщин и 30 (33,7%) мужчин в возрасте 47–83 лет (средний возраст составил 69 (64; 76) лет). Индекс массы тела у обследуемых составил 26,95 (23,92; 30,38) кг/м<sup>2</sup>, что соответствует начальной степени ожирения. Дебют заболевания приходился на 62,5 (55,0; 69,5) года. В структуре клинической картины наиболее часто регистрировали смешанную форму БП (66,3%), значительно реже – акинетико-ригидную (24,7%) и дрожательную (9,0%). Среди обследуемых встречали лиц как с начальными проявлениями паркинсонизма, так и с более выраженными двигательными расстройствами: I стадию по шкале Хен и Яра выявили у 10 (11,2%) человек, II стадию – 30 (33,7%), III стадию – 45 (50,6%), IV стадию – у 4 (4,5%). Все пациенты получали стандартную комбинированную терапию противопаркинсоническими препаратами.

Среди жалоб со стороны желудочно-кишечного тракта при БП преобладала констипация – у 40 (45,3%) пациентов, тошнота и (или) рвота – 8 (9,4%), а также чувство неполного опорожнения кишечника – у 29 (33,3%) и затруднения при акте дефекации – 37 (41,7%). Согласно карте самочувствия 81 (91,3%) пациент с БП отмечал жалобы со стороны желудочно-кишечного тракта большую часть времени и только 8 (8,7%) – расстройства пищеварительного тракта не беспокоили. Подавляющее количество пациентов 60 (68%) использовали слабительные препараты. Проведя анализ типов каловых масс, описанных с помощью Бристольской шкалы, наиболее часто у больных с БП отмечали второй и четвертые типы каловых масс (25 и 37,5% соответственно).

Все полученные образцы ДНК кишечной микробиоты просеквенированы. По результатам данного исследования в составе кишечной микробиоты пациентов с БП обнаружен 121 род микроорганизмов. При анализе представленности метагеномных сообществ отмечено, что наиболее распространенными в образцах пациентов с БП явились р. *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Blautia* и *Ruminococcus*, составляющие 49,1% микробиома кишечника. Представленность двух из этих родов была ассоциирована со стадией заболевания (*Bacteroides*) и UPDRS II (*Ruminococcus*).

Всего 40 родов микроорганизмов были связаны с клиническими характеристиками БП. Значимые различия по семи таксономическим единицам выявлены между пациентами с разными формами

БП. При этом дрожательная форма отличалась от акинетико-ригидной и смешанной по распространенности р. *Allistipes*, *Bilophila*, *Peptococcus*. Смешанная и дрожательная формы различались от

акинетико-ригидной по р. *Stoquefichus*. По представленности р. *Desulfitobacterium*, *Gemmiger*, *Victivallis* выявлены отличия между смешанной и акинетико-ригидной формами БП (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

| Представленность родов микроорганизмов у пациентов с разными формами болезни Паркинсона |                            |                           |                          |                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| ОТЕ                                                                                     | Форма БП, Me [Q1; Q3]      |                           |                          | Статистическая значимость                                                 |
|                                                                                         | Дрожательная               | Акинетико-ригидная        | Смешанная                |                                                                           |
| <i>Allistipes</i>                                                                       | 15,445 [9,459; 15,445]     | 37,802 [31,351; 56,050]   | 43,432 [23,866; 50,493]  | H = 8,636<br>$p_{1-2} = 0,022$<br>$p_{1-3} = 0,013$<br>$p_{2-3} = 1,000$  |
| <i>Bilophila</i>                                                                        | 1,904 [0; 4,089]           | 7,674 [4,436; 9,291]      | 5,531 [3,096; 9,151]     | H = 9,742<br>$p_{1-2} = 0,007$<br>$p_{1-3} = 0,028$<br>$p_{2-3} = 1,000$  |
| <i>Desulfitobacterium</i>                                                               | 2,941 [0; 9,189]           | 1,000 [0,000; 5,176]      | 5,063 [2,429; 7,760]     | H = 6,215<br>$p_{1-2} = 0,663$<br>$p_{1-3} = 1,000$<br>$p_{2-3} = 0,038$  |
| <i>Gemmiger</i>                                                                         | 92,951 [92,951; 49215,000] | 120,398 [96,215; 187,012] | 87,533 [60,877; 117,534] | H = 8,469<br>$p_{1-2} = 1,000$<br>$p_{1-3} = 0,945$<br>$p_{2-3} = 0,013$  |
| <i>Peptococcus</i>                                                                      | 7,435 [3,006; 7,825]       | 0,000 [0; 2,103]          | 0,000 [0; 2,753]         | H = 7,774<br>$p_{1-2} = 0,020$<br>$p_{1-3} = 0,035$<br>$p_{2-3} = 1,000$  |
| <i>Stoquefichus</i>                                                                     | 3,000 [1,649; 6,822]       | 9,042 [7,350; 14,066]     | 6,792 [3,032; 8,808]     | H = 14,183<br>$p_{1-2} = 0,002$<br>$p_{1-3} = 0,318$<br>$p_{2-3} = 0,006$ |
| <i>Victivallis</i>                                                                      | 0,000 [0; 5,588]           | 0,000 [0; 0]              | 1,995 [0; 7,390]         | H = 11,797<br>$p_{1-2} = 0,553$<br>$p_{1-3} = 1,000$<br>$p_{2-3} = 0,002$ |

П р и м е ч а н и е.  $p_{1-2}$  – различия между дрожательной и акинетико-ригидной,  $p_{2-3}$  – акинетико-ригидной и смешанной,  $p_{1-3}$  – дрожательной и смешанной формами. В значения  $p$  внесена поправка Бонферрони для нескольких испытаний.

Исследование  $\alpha$ -разнообразия среди пациентов с разными формами БП, рассчитанного в метрике PD whole tree (рис. 1), позволило выявить, что наименьшее таксономическое разнообразие характерно для пациентов с акинетико-ригидной формой БП. При этом статистически значимыми были различия между смешанной (29,86 [30,61; 34,56]) и акинетико-ригидной (32,17 [27,05; 32,06]) формами заболевания ( $p = 0,023$ ), также имела тенденция к различию между дрожательной и смешанной формой.

Также выполнен анализ таксономического состава метагеномных сообществ образцов кишечной микробиоты больных БП с разными формами заболевания с использованием неметрического многомерного шкалирования (рис. 2). Расстояние между точками на графике указывает на степень сходства таксономического состава образцов. В

результате оценки  $\beta$ -разнообразия установлено, что форма заболевания вносит статистически достоверный вклад в состав микробиоты (ANO-SIM ( $R^2 = 0,117$ ;  $p = 0,043$ ), Adonis ( $R^2 = 0,029$ ;  $p = 0,022$ )).

При анализе корреляционных связей между степенью тяжести БП, выраженностью отдельных проявлений болезни в соответствии с UPDRS и представленностью родов микроорганизмов получены значимые результаты (табл. 2). При этом наибольшее количество связей выявлено с первым разделом шкалы, характеризующим немоторные аспекты повседневной жизни. Чаще это была положительная корреляция, то есть большая представленность рода микроорганизмов кишечника ассоциирована со значительным влиянием немоторных симптомов на повседневную жизнь пациента.

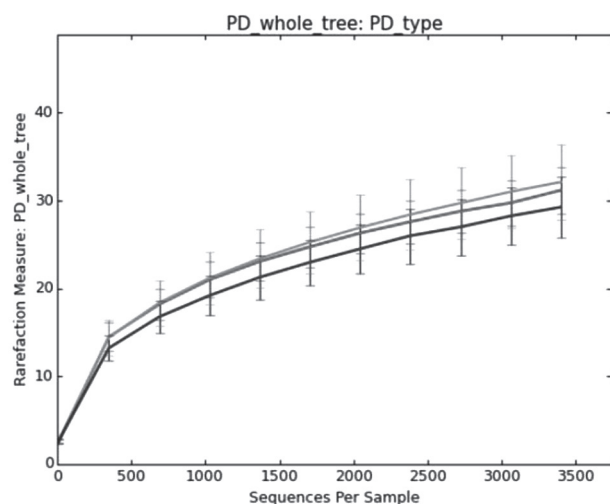


Рис. 1. Анализ  $\alpha$ -разнообразия, рассчитанного при помощи индекса PD whole tree, для пациентов с дрожательной (красная кривая), akinetико-ригидной (синяя кривая) и смешанной (оранжевая кривая) формами болезни Паркинсона при прореживании образцов до глубины в 3400 ОТЕ/образец. Индекс  $\alpha$ -разнообразия рассчитан на десяти подвыборках, «усы» обозначают величину стандартного отклонения

Распространенность шести родов микроорганизмов кишечника больных с БП отрицательно коррелировала с третьим разделом шкалы, учитывающим объективную оценку двигательных функций пациента, и только пять родов выделенных микроорганизмов демонстрировали положи-

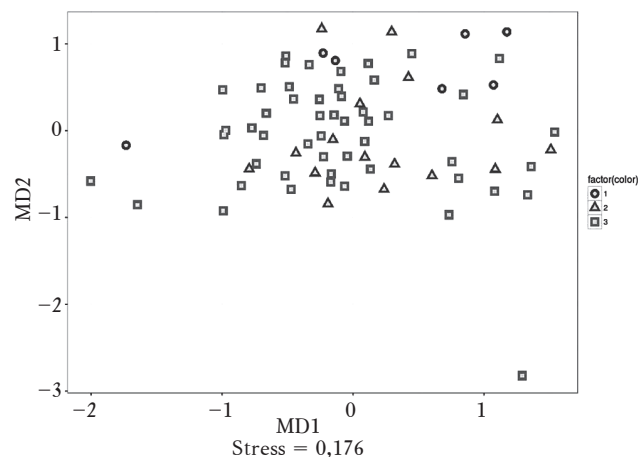


Рис. 2. Оценка таксономического состава микробиоты кишечника для пациентов с дрожательной (красный цвет), akinетико-ригидной (синий цвет) и смешанной (зеленый цвет) формами болезни Паркинсона

тельную корреляцию с баллами по этому разделу. Большая распространенность семи родов ассоциирована с более высокими баллами по второму разделу шкалы, оценивающему двигательные аспекты повседневной жизни. Эти данные могут свидетельствовать об определенной роли микроорганизмов кишечника в развитии двигательных нарушений при БП. При анализе также установлена положительная корреляция представленности рода *Bacteroides* со стадией БП.

Т а б л и ц а 2

| Корреляционные связи между представленностью отдельных родов кишечных микроорганизмов и клиническими характеристиками пациентов, $\rho$ |                 |         |          |           |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|----------|-----------|----------|
| Род микроорганизмов                                                                                                                     | Шкала Хен и Яра | UPDRS I | UPDRS II | UPDRS III | UPDRS IV |
| <i>Acetanaerobacterium</i>                                                                                                              | —               | —       | —        | -0,356*   | —        |
| <i>Actinobacillus</i>                                                                                                                   | —               | —       | —        | -0,436*   | —        |
| <i>Allisonella</i>                                                                                                                      | —               | —       | —        | —         | 0,731**  |
| <i>Anaerococcus</i>                                                                                                                     | —               | —       | —        | -0,356*   | —        |
| <i>Bacteroides</i>                                                                                                                      | 0,252*          | —       | —        | —         | —        |
| <i>Catenibacterium</i>                                                                                                                  | —               | 0,548** | —        | —         | 0,921**  |
| <i>Christensenella</i>                                                                                                                  | —               | —       | —        | -0,437*   | —        |
| <i>Collinsella</i>                                                                                                                      | —               | -0,361* | -0,474** | —         | —        |
| <i>Coproccoccus</i>                                                                                                                     | —               | —       | —        | —         | 0,456**  |
| <i>Dielma</i>                                                                                                                           | —               | 0,424*  | —        | —         | —        |
| <i>Enterobacter</i>                                                                                                                     | —               | 0,445*  | 0,570**  | 0,375*    | —        |
| <i>Finegoldia</i>                                                                                                                       | —               | 0,604** | 0,365*   | —         | —        |
| <i>Gemmiger</i>                                                                                                                         | —               | 0,533** | 0,362*   | —         | 0,749**  |
| <i>Intestinimonas</i>                                                                                                                   | —               | 0,577** | —        | —         | —        |
| <i>Lachnobacterium</i>                                                                                                                  | —               | —       | —        | —         | 0,897**  |
| <i>Lactobacillus</i>                                                                                                                    | —               | —       | —        | -0,373*   | —        |
| <i>Lactonifactor</i>                                                                                                                    | 0,236*          | —       | —        | —         | —        |
| <i>Leuconostoc</i>                                                                                                                      | —               | 0,446*  | 0,570**  | 0,376*    | —        |
| <i>Megamonas</i>                                                                                                                        | —               | 0,383*  | —        | —         | —        |
| <i>Mogibacterium</i>                                                                                                                    | —               | —       | —        | 0,375*    | —        |
| <i>Nevskia</i>                                                                                                                          | -0,307**        | —       | —        | —         | —        |

О к о н ч а н и е т а б л. 2

| Род микроорганизмов       | Шкала Хен и Яра | UPDRS I | UPDRS II | UPDRS III | UPDRS IV |
|---------------------------|-----------------|---------|----------|-----------|----------|
| <i>Oscillospira</i>       | —               | 0,445°  | 0,570**  | 0,375°    | —        |
| <i>Oxalobacter</i>        | —               | 0,445°  | 0,571**  | 0,375°    | —        |
| <i>Parabacteroides</i>    | —               | 0,583** | —        | —         | —        |
| <i>Parasutterella</i>     | —               | —       | —        | —         | 0,842**  |
| <i>Peptococcus</i>        | 0,246°          | —       | —        | —         | —        |
| <i>Peptoniphilus</i>      | —               | —       | —        | –0,356°   | —        |
| <i>Peptostreptococcus</i> | 0,237°          | —       | —        | —         | —        |
| <i>Prevotella</i>         | —               | 0,546** | —        | —         | —        |
| <i>Roseburia</i>          | —               | —       | —        | —         | 0,644**  |
| <i>Ruminococcus</i>       | —               | —       | –0,387°  | —         | —        |
| <i>Soleaferrea</i>        | —               | 0,493** | —        | —         | —        |
| <i>Streptococcus</i>      | —               | 0,520** | —        | —         | —        |
| <i>Tannerella</i>         | —               | —       | —        | —         | 0,389°   |
| <i>Tyzzerella</i>         | —               | –0,378° | —        | —         | —        |
| <i>Victivallis</i>        | —               | 0,446°  | 0,571**  | 0,375°    | —        |

П р и м е ч а н и е.  $\rho$  – коэффициент корреляции Спирмена. Значимость корреляции на уровне: \* 0,05, \*\* 0,01.

Жалобы со стороны желудочно-кишечного тракта (затруднения при дефекации, чувство неполного опорожнения кишечника и запоры) ассоциированы с изменениями представленности родов *Turicibacter* ( $U = 233,500$ ;  $p = 0,047$ ) и *Solobacterium* ( $U = 261,000$ ;  $p = 0,004$ ), которые были значимо выше в группе с жалобами на запоры. Тогда как род *Dielma* присутствовал у пациентов без нарушений ( $U = 89,500$ ;  $p = 0,016$ ). Преобладание рода *Stoqueficbus* ( $U = 105,500$ ;  $p = 0,036$ ) было значимо выше среди пациентов, не предъявивших жалобы на затруднение при дефекации.

Значимая отрицательная корреляция выявлена между частотой расстройств желудочно-кишечного тракта и представленностью *Barnesiella* ( $\rho = -0,385$ ;  $p = 0,043$ ), *Dielma* ( $\rho = -0,300$ ;  $p = 0,042$ ), *Nevskia* ( $\rho = -0,325$ ;  $p = 0,028$ ), *Prevotella* ( $\rho = -0,300$ ;  $p = 0,043$ ), *Streptococcus* ( $\rho = -0,331$ ;  $p = 0,024$ ). Слабая положительная корреляция была обнаружена с родом *Ruminococcus* ( $\rho = 0,295$ ;  $p = 0,047$ ), также связанным с затруднениями в двигательном-обусловленном ежедневном функционировании (UPDRS II). При этом достоверной связи между двигательными расстройствами и нарушением функции желудочно-кишечного тракта выявить не удалось.

## ОБСУЖДЕНИЕ

БП является клинически гетерогенным заболеванием. Дрожательная, акинетико-ригидная и смешанная формы заболевания характеризуются различными прогнозами и течением, разной реакцией на получаемое противопаркинсоническое лечение. Причины развития той или иной формы

заболевания остаются до конца не выясненными, несмотря на многочисленные исследования.

Выявленные различия в составе микробиоты у пациентов с разными формами БП могут указывать на роль кишечной микрофлоры в генезе клинических различий между моторными подтипами. По представленным данным, акинетико-ригидная форма характеризовалась значимо меньшим таксономическим разнообразием, чем дрожательная и смешанная формы БП. Значимые различия выявлены и при анализе  $\beta$ -разнообразия, оценивающего таксономическую близость состава микробиоты между группами. Меньшее таксономическое богатство является характерным признаком неблагоприятных условий среды, косвенным признаком воспаления и предпосылкой к снижению защитной функции микрофлоры.

При сравнении представленности отдельных родов микроорганизмов дрожательная форма отличалась от акинетико-ригидной и смешанной по родам *Alistipes*, *Bilophila*, *Peptococcus*. *Alistipes* – род облигатно анаэробных грамм-отрицательных индол-позитивных бактерий, вероятно, оказывает влияние на биодоступность триптофана, поступающего с пищей. Относительное преобладание этих бактерий в кишечнике было выявлено у пациентов с депрессивным расстройством [26]. В других исследованиях установлена связь между представленностью *Alistipes* и кишечным воспалением у пациентов с синдромом раздраженного кишечника [27]. *Bilophila* – род грамм-отрицательных, анаэробных бактерий, представители которого были ассоциированы с развитием воспалительных заболеваний кишечника и гнойного

аппендицита [27, 28]. Как следует из названия, эти бактерии принимают активное участие в метаболизме желчных кислот, являющихся важным фактором электролитного баланса в просвете кишечника, что оказывает влияние на его моторную функцию [29]. *Peptococcus* – грамм-положительные неспорообразующие бактерии-патобионты, участвующие в метаболизме нитроароматических соединений и приводящие к генерации генотоксических и канцерогенных агентов [30]. В данном исследовании выявлена значимая положительная корреляция представленности этого рода, а также микроорганизмов порядка *Clostridiales* (*Peptostreptococcus* и *Lactonifactor*) со стадией БП. Согласно литературным источникам, содержание микробиоты этих трех родов в кишечнике зависит от состава потребляемой пищи и повышается при поступлении большого количества продуктов животного происхождения [31].

Представленность бактерий рода *Stoquefichus* оказалась значимо выше у пациентов с акинетико-ригидной формой БП по сравнению со смешанной и дрожательной. Этот род оказался также ассоциирован с отсутствием дефекационной дисфункции у пациентов. Важным оказалось то, что дрожательная форма характеризовалась большей представленностью родов *Desulfitobacterium* и *Gemmiger*, хотя в обоих случаях это различие с двумя другими группами не было значимым, в то время как *Desulfitobacterium* был значимо более представлен у пациентов со смешанной формой в сравнении с акинетико-ригидной группой пациентов с БП. *Desulfitobacterium* – грамм-положительные, неспорообразующие бактерии семейства *Peptococcaceae*, являются стандартными представителями микробиома кишечника человека. В то же время относительное повышенное их содержание отмечено в кишечнике пациентов с болезнью Крона в сравнении с микробиомом здоровых лиц [32]. Род *Gemmiger* был ассоциирован с более высоким риском эндоскопического рецидива воспалительных заболеваний кишечника [33]. При этом стоит также отметить наличие значимой положительной корреляционной связи между представленностью рода *Gemmiger* со степенью нарушений ежедневного функционирования и выраженностью двигательных симптомов (UPDRS II, UPDRS III). Наибольшая представленность рода *Victivallis* оказалась характерна для пациентов со смешанной формой БП. Положительную корреляцию с тяжестью немоторных и моторных проявлений по шкале UPDRS можно объяснить тем, что данная группа больных характеризуется более тяжелым течением и от-

носительно более быстрым прогрессированием. Такую же связь с UPDRS продемонстрировали роды *Enterobacter*, *Leuconostoc*, *Oscillospira* и *Oxalobacter*. При этом *Enterobacter* и *Leuconostoc* могут быть отнесены к условно-патогенным организмам, способным вызывать клинически выраженную бактериемию и быть этиологическим фактором заболеваний кишечника и верхних дыхательных путей [33, 34], тогда как *Oscillospira* и *Oxalobacter* в литературе ассоциируются в основном с положительным влиянием на организм человека [36, 37]. В данном исследовании род *Prevotella* оказался ассоциирован с более высокими баллами по I разделу UPDRS.

Значительная распространенность желудочно-кишечных расстройств среди пациентов, принявших участие в представленном исследовании, в целом соответствует данным литературы. Разница в наличии микроорганизмов между пациентами с жалобами со стороны желудочно-кишечного тракта и без жалоб может указывать на роль микробиоты в развитии моторной дисфункции кишечника, но также может иметь место и обратная связь: снижение скорости кишечного транзита создает неблагоприятные условия для функционирования одних бактерий и дает преимущество другим видам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования выявлена взаимосвязь между такими клиническими характеристиками БП, как форма болезни, стадия, тяжесть моторных и немоторных проявлений и родовым составом микробиоты кишечника пациентов с БП. Более половины (54,8%) микроорганизмов кишечника больных с БП имеют ассоциации с теми или иными проявлениями заболевания. Несмотря на то что причинно-следственные связи между изменениями в составе микробиоты кишечника и патогенезом БП не ясны до конца, вероятно, некоторые микроорганизмы могут являться предикторами менее благоприятного прогноза. Перспективным представляется исследование возможностей профилактики нейродегенеративных заболеваний, направленное в первую очередь на нормализацию таксономических соотношений и разнообразия микрофлоры кишечника в группах риска.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП №14.604.21.0150 «Выявление биомаркеров микробиотического сообщества кишечника для ранней, доклинической диагностики БП» (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0150).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

План и проведение научно-исследовательской работы полностью соответствовали принципам Надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice – GCP) и Хельсинской декларации (включая поправки). Протокол исследования был одобрен независимым этическим комитетом СибГМУ (заключение № 3669 от 22 декабря 2014 г.). Письменное информированное согласие получали от всех пациентов или от их близких родственников и лиц, официально признанных ответственными за пациентов на момент проведения исследования. Пациенты и их родственники были информированы нами о характере исследования, его цели и возможных осложнениях, а также могли в любое время в одностороннем порядке прервать исследование.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lema Tomé C.M. et al. Inflammation and  $\alpha$ -synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease—is there a link? // *Molecular Neurobiology*. 2012; 47 (2): 561–574.
2. Visanji N.P. et al. The prion hypothesis in Parkinson's disease: braak to the future // *Acta Neuropathologica Communications*. 2013; 1: 2–2.
3. Blandini F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 8 (1): 189–201.
4. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. Москва: Янус-К, 2002: 248.
5. Barnum C.J., Tansey M.G. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease // *Progress in Brain Research*. 2010; 184: 113–132.
6. Niranjan R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes // *Mol. Neurobiol.* 2014; 49 (1): 28–38.
7. Klingelhoefer L., Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease [mdash] the gut-brain axis and environmental factors // *Nat. Rev. Neurol.* 2015; 11 (11): 625–636.
8. Svensson E. et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease // *Annals of Neurology*. 2015; 78 (4): 522–529.
9. Del Tredici K., Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2012; 27 (5): 597–607.
10. Cersosimo M. et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms // *J. Neurol.* 2013; 260 (5): 1332–1338.
11. Pfeiffer R.F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease // *Parkinsonism & Related Disorders*. 17 (1): 10–15.
12. Tillisch K. The effects of gut microbiota on CNS function in humans // *Gut Microbes*. 2014; 5 (3): 404–410.
13. Mao Y.-K. et al. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons // *Nat. Commun.* 2013; 4: 1465.
14. Barrett E. et al.  $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine // *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 113 (2): 411–417.
15. Bhargava P., Mowry E. Gut microbiome and multiple sclerosis // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2014; 14 (10): 1–8.
16. Ochoa-Repáraz J. et al. Induction of a regulatory B. cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora // *Gut Microbes*. 2010; 1 (2): 103–108.
17. Scheperjans F. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype // *Mov. Disord.* 2015; 30 (3): 350–358.
18. Goetz C.G. et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: status and recommendations. The Movement Disorder Society Task Force on rating scales for Parkinson's disease // *Movement Disorders*. 2004; 19 (9): 1020–1028.
19. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects // *Bulletin of the World Health Organization*. 2001; 79 (4): 373–374.
20. Goetz C.G. et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results // *Movement Disorders*. 2008; 23 (15): 2129–2170.
21. Egshatyan L. et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance // *Endocrine Connections*. 2016; 5 (1): 1–9.
22. Caporaso J.G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods*. 2010; 7 (5): 335–336.
23. DeSantis T.Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (7): 5069–5072.
24. Ritar J. et al. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database // *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1–10.
25. Paulson J.N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nat. Meth.* 2013; 10 (12): 1200–1202.
26. Jiang H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder // *Brain, Behavior and Immunity*. 2015; 48: 186–194.
27. Stasi C. et al. Altered neuro-endocrine-immune pathways in the irritable bowel syndrome: the top-down and

- the bottom-up model // *J. Gastroenterol.* 2012; 47 (11): 1177–1185.
28. Finegold S. et al. Clinical importance of *Bilophila wadsworthia* // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1992; 11 (11): 1058–1063.
  29. Summanen P.H. et al. *Bilophila wadsworthia* isolates from clinical specimens // *Clinical Infectious Diseases*. 1995; 20 (Supplement 2): 210–211.
  30. Joyce S.A., Gahan C.G.M. The gut microbiota and the metabolic health of the host // *Current Opinion in Gastroenterology*. 2014; 30 (2).
  31. Del Chierico F. et al. Mediterranean diet and health: food effects on gut microbiota and disease control // *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15 (7).
  32. Erickson A.R. Characterization of the human host gut microbiome with an integrated genomics / Proteomics Approach. 2011.
  33. Mondot S. et al. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery // *Gut*. 2016; 65 (6): 954–962.
  34. Ino K. et al. Bacteremia due to *Leuconostoc pseudomesenteroides* in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature // *Case Reports in Hematology*. 2016; 2016: 7648628.
  35. Davin-Regli A., Pagis J.-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment // *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 392.
  36. Konikoff T., Gophna U. *Oscillospira*: a central, enigmatic component of the human gut microbiota // *Trends in Microbiology*. 24 (7): 523–524.
  37. Duncan S.H. et al. *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68 (8): 3841–3847.

Поступила в редакцию 18.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Тяхт Александр Викторович, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории биоинформатики, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва.

Алифорова Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Наталья Григорьевна, д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Ирина Александровна, канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Латыпова Алина Викторовна, ординатор кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ г. Томск.

Ижболдина Ольга Петровна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Петров Вячеслав Алексеевич, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Миронова Юлия Сергеевна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Никитина Мария Анатольевна, аспирант кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ г. Томск.

Титова Марина Андреевна, канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск.

Кострюкова Елена Сергеевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией постгеномных исследований в биологии, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва.

Дорофеева Юлия Борисовна, мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Салтыкова Ирина Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Сазонов Алексей Эдуардович, д-р мед. наук, зам. проректора Управления научной политики и организации научных исследований МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

(✉) Жукова Ирина Александровна, e-mail: irzhukova@inbox.ru

УДК 616.34-008.87-02:616.858

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-134-146

For citation: Tyakht A.V., Alifirova V.M., Zhukova N.G., Zhukova I.A., Latypova A.V., Izhboldina O.P., Petrov V.A., Mironova Yu.S., Titova M.A., Nikitina M.A., Kostryukova E.S., Dorofeeva Yu.B., Saltykova I.V., Sazonov A.E. Is gut microbiota associated with Parkinson's disease? *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 126–133

## Is gut microbiota associated with Parkinson's disease?

Tyakht A.V.<sup>1</sup>, Alifirova V.M.<sup>2</sup>, Zhukova N.G.<sup>2</sup>, Zhukova I.A.<sup>2</sup>, Latypova A.V.<sup>2</sup>, Izhboldina O.P.<sup>2</sup>, Petrov V.A.<sup>2</sup>, Mironova Yu.S.<sup>2</sup>, Titova M.A.<sup>2</sup>, Nikitina M.A.<sup>2</sup>, Kostryukova E.S.<sup>1</sup>, Dorofeeva Yu.B.<sup>2</sup>, Saltykova I.V.<sup>2</sup>, Sazonov A.E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Physico-Chemical Medicine of Russian Federal Medico-Biological Agency (RIPCM), 1a, Malaya Pirogovskaya Str., Moscow, 119992, Russian Federation

<sup>2</sup> *Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>3</sup> *Lomonosov Moscow State University  
1, Leninskiy Gory, Moscow, 119991, Russian Federation*

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with a complex pathogenesis. Today more and more studies are focusing on microbiota-gut-brain axis searching the causes of neurodegenerative and neuroinflammatory processes.

**The aim** of our study is to determine the relationship between the composition of gut microbiota and clinical manifestations of PD.

**Materials and methods.** We examined 89 patients with a PD diagnosis. Clinical assessment was performed including medical history collection, rating disease stage using Hoehn and Yahr scale. Motor and nonmotor symptoms as well as possible complication were examined using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In addition, patients were asked to fill in Parkinson's Well-Being Map and defecation diary that included Bristol scale. DNA isolation was performed in accordance with the method described. Preparation of libraries and amplicon sequencing of marker variable region V3–V4 of bacterial 16S rRNA genes was performed with MiSeq device (Illumina, USA) according to manufacturer's standard protocol. Filtering readings by quality and their taxonomic classification were carried out using QIIME version 1.9.0 software. The assessment of statistical differences in abundance of taxonomic units among the groups of patients was performed using IBM SPSS Statistics 23.1 software.

**As a result,** we have identified significant differences in the abundance of seven genera among the groups of patients with different forms of the disease. We identified about 40 genera constituting 54.8% of the intestinal microbiota, that had a correlation with the clinical manifestations of the disease. These microorganisms might be involved in the pathogenesis of PD and, thus, require more clinical research in the light of emerging new methods of altering microbiotic composition by correcting dysbiosis to improve disease management and outcome.

**Key words:** Parkinson's disease, microbiome, nonmotor symptoms, neurodegeneration.

## REFERENCES

1. Lema Tomé C.M. et al. Inflammation and  $\alpha$ -synuclein's prion-like behavior in parkinson's disease—is there a link? // *Molecular Neurobiology*. 2012; 47 (2): 561–574.
2. Visanji N.P. et al. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future // *Acta Neuropathologica Communications*. 2013; 1: 2–2.
3. Blandini F. Neural and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease // *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8 (1): 189–201.
4. Illarionovskiy S.N. Konformatsionnye bolezni mozga [Conformational disorders of the brain]. Moscow: Yanus-K, 2002: 248 (in Russian).
5. Barnum C.J., Tansey M.G. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease // *Progress in Brain Research*. 2010; 184: 113–132.
6. Niranjan R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes // *Mol. Neurobiol*. 2014; 49 (1): 28–38.
7. Klingelhoefer L., Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease [mdash] the gut-brain axis and environmental factors // *Nat. Rev. Neurol*. 2015; 11 (11): 625–636.
8. Svensson E. et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease // *Annals of Neurology*. 2015; 78 (4): 522–529.
9. Del Tredici K., Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease // *Mov. Disord*. 2012; 27 (5): 597–607.
10. Cersosimo M. et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms // *J. Neurol*. 2013; 260 (5): 1332–1338.
11. Pfeiffer R.F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease // *Parkinsonism & Related Disorders*. 17 (1): 10–15.
12. Tillisch K. The effects of gut microbiota on CNS function in humans // *Gut Microbes*. 2014; 5 (3): 404–410.
13. Mao Y.-K. et al. Bacteroides fragilis polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons // *Nat. Commun*. 2013; 4: 1465.
14. Barrett E. et al.  $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine // *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 113 (2): 411–417.
15. Bhargava P., Mowry E. Gut Microbiome and Multiple Sclerosis // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. 2014; 14 (10): 1–8.

16. Ochoa-Repáraz J. et al. Induction of a regulatory B. cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora // *Gut Microbes*. 2010; 1 (2): 103–108.
17. Scheperjans F. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype // *Mov. Disord.* 2015; 30 (3): 350–358.
18. Goetz C.G. et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. The Movement Disorder Society Task Force on rating scales for Parkinson's disease // *Movement Disorders*. 2004; 19 (9): 1020–1028.
19. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects // *Bulletin of the World Health Organization*. 2001; 79 (4): 373–374.
20. Goetz C.G. et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results // *Movement Disorders*. 2008; 23 (15): 2129–2170.
21. Egshatyan L. et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance // *Endocrine Connections*. 2016; 5 (1): 1–9.
22. Caporaso J.G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods*. 2010; 7 (5): 335–336.
23. DeSantis T.Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (7): 5069–5072.
24. Ritar J. et al. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database // *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1–10.
25. Paulson J.N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nat. Meth.* 2013; 10 (12): 1200–1202.
26. Jiang H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder // *Brain, Behavior and Immunity*. 2015; 48: 186–194.
27. Stasi C. et al. Altered neuro-endocrine-immune pathways in the irritable bowel syndrome: the top-down and the bottom-up model // *J. Gastroenterol.* 2012; 47 (11): 1177–1185.
28. Finegold S. et al. Clinical importance of *Bilophila wadsworthia* // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1992; 11 (11): 1058–1063.
29. Summanen P.H. et al. *Bilophila wadsworthia* Isolates from Clinical Specimens // *Clinical Infectious Diseases*. 1995; 20 (Supplement 2): 210–211.
30. Joyce S.A., Gahan C.G.M. The gut microbiota and the metabolic health of the host // *Current Opinion in Gastroenterology*. 2014; 30 (2).
31. Del Chierico F. et al. Mediterranean diet and health: food effects on gut microbiota and disease control // *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15 (7).
32. Erickson A.R. Characterization of the human host gut microbiome with an integrated genomics / Proteomics Approach. 2011.
33. Mondot S. et al. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery // *Gut*. 2016; 65 (6): 954–962.
34. Ino K. et al. Bacteremia due to *Leuconostoc pseudomesenteroides* in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature // *Case Reports in Hematology*. 2016; 2016: 7648628.
35. Davin-Regli A., Pagis J.-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment // *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 392.
36. Konikoff T., Gophna U. *Oscillospira*: A central, enigmatic component of the human gut microbiota // *Trends in Microbiology*. 24 (7): 523–524.
37. Duncan S.H. et al. *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68 (8): 3841–3847.

Received September 18.2016

Accepted December 01.2016

**Tyakht Alexandr V.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Bioinformation, RIPCМ, Moscow, Russian Federation.

**Alifirova Valentina M.**, MD, Professor, Head of the Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Natalia G.**, MD, Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Zhukova Irina A.**, PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Latypova Alina V.**, Neurology Resident, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Izboldina Olga P.**, Post-graduate Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Petrov Vyacheslav A.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Mironova Yulia S.**, Post-graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Nikitina Maria A.**, Post-graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Titova Marina A.**, PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kostryukova Elena S.**, PhD, Head of Laboratory Postgenomics Research in Biology, RIPCМ, Moscow, Russian Federation.

**Dorofeeva Yulia B.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Saltykova Irina V.**, PhD, Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Sazonov Alexey E.**, MD, Deputy Vice-rector, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

(✉) **Zhukova Irina A.**, e-mail: irzhukova@inbox.ru

УДК 616.36/.369-006:616.995.122.21]-07(470+571)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-147-158

Для цитирования: Федорова О.С., Ковширина Ю.В., Ковширина А.Е., Федотова М.М., Деев И.А., Петровский Ф.И., Филимонов А.В., Дмитриева А.И., Кудяков Л.А., Салтыкова И.В., Михалев Е.В., Одерматт П., Огородова Л.М. Анализ заболеваемости инвазией *Opisthorchis felinus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы в Российской Федерации. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 147–158

## Анализ заболеваемости инвазией *Opisthorchis felinus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы в Российской Федерации

Федорова О.С.<sup>1</sup>, Ковширина Ю.В.<sup>1</sup>, Ковширина А.Е.<sup>1</sup>, Федотова М.М.<sup>1</sup>, Деев И.А.<sup>1</sup>, Петровский Ф.И.<sup>2</sup>, Филимонов А.В.<sup>2</sup>, Дмитриева А.И.<sup>3</sup>, Кудяков Л.А.<sup>3</sup>, Салтыкова И.В.<sup>1</sup>, Михалев Е.В.<sup>1</sup>, Одерматт П.<sup>4</sup>, Огородова Л.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Ханты-Мансийская государственная медицинская академия  
Россия, 628011, Ханты-Мансийский АО – Югра, г. Ханты-Мансийск, ул. Мира, 40

<sup>3</sup> Томский областной онкологический диспансер  
Россия, г. Томск, 634050 г. Томск, пр. Ленина, 115

<sup>4</sup> Швейцарский институт тропической медицины и общественного здоровья  
Швейцария, г. Базель, Зоцинштрассе, 57

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Исследовать взаимосвязь заболеваемости инвазией *Opisthorchis felinus* (*O. felinus*) и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы у населения Российской Федерации на основании анализа данных официальной медицинской отчетности за период 2011–2013 гг.

**Материал и методы.** Проанализированы статистические данные 81 региона России, отражающие заболеваемость описторхозом за период с 1 января 2011 г. по 31 декабря 2013 г. Проведен анализ официальных медицинских статистических данных злокачественного поражения печени и внутрипеченочных желчных протоков в 82 регионах России за аналогичный период, полученный из годовых отчетов Российского центра информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии.

**Результаты.** Заболеваемость инвазией *O. felinus* составила  $24,7 \pm 9,0$  на 100 000 населения. К гиперэндемичным по описторхозу регионам (уровень заболеваемости  $> 100$  на 100 000 населения) относятся Ханты-Мансийский автономный округ, Ямало-Ненецкий автономный округ, а также Тюменская, Томская, Омская и Новосибирская области (Западная Сибирь). Средний показатель заболеваемости инвазией *O. felinus* в динамике за последние 20 лет относительно стабилен, однако отмечается распространение инвазии на новые территории. Заболеваемость раком печени и внутрипеченочных желчных протоков составила  $4,8 \pm 0,2$  случаев на 100 000 населения, при этом наиболее высокие показатели регистрируются на Дальнем Востоке, в Сибири и Волгоградской области. Получены пилотные данные о взаимосвязи заболеваемости инвазией *O. felinus* и онкологическими заболеваниями гепатобилиарной системы у населения эндемичных регионов Российской Федерации.

**Ключевые слова:** инвазия *Opisthorchis felinus*, злокачественные новообразования гепатобилиарной системы, заболеваемость, эпидемиология.

## ВВЕДЕНИЕ

Описторхозная инвазия, вызываемая сибирской двуусткой (*O. felineus*), *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*), является причиной заболеваний органов пищеварительной системы у 40 млн человек разных регионов мира. При этом до 600–750 млн человек подвержены риску заражения описторхами [1–3].

Особенностью данного биогельминтоза является поражение гепатобилиарной системы человека, домашних животных (собак и кошек) и многих рыбоядных диких млекопитающих и птиц [4, 5]. В Российской Федерации естественные очаги описторхоза находятся вблизи р. Оби, Иртыша, Урала, Волги, Камы, Дона, Днепра, Северной Двины и Бирюсы [4–6]. При этом самый высокий уровень заражения описторхозом 50–80% обнаружен у населения середины и низовьев р. Оби и Иртыша. В некоторых регионах (Ханты-Мансийский автономный округ, Ямало-Ненецкий автономный округ) поражено более 80% жителей, что существенно влияет на структуру заболеваемости и представляет серьезную медицинскую проблему (данные 1980–1990-х гг.) [7, 8].

Клиническая картина описторхоза полиморфна и варьирует от бессимптомных форм до тяжелых проявлений; наиболее часто развивается поражение гепатобилиарной системы [9]. Хроническая массивная инвазия может приводить к персистирующему воспалению в желчных протоках [10, 11]. Результаты эпидемиологических исследований, проведенных в Юго-Восточной Азии в области взаимосвязи описторхоза и холангиокарциномы, позволили экспертам Всемирной организации здравоохранения отнести возбудитель *O. viverrini* к категории канцерогенов биологического происхождения [11, 12]. Опубликованы результаты ряда исследований, выполненных на основании материалов аутопсий и хирургических протоколов и отражающих канцерогенный потенциал *O. felineus* [10, 13–15]. Однако в доступной для анализа отечественной литературе до настоящего времени отсутствуют результаты эпидемиологических исследований, свидетельствующих об ассоциации инвазии *O. felineus* с развитием злокачественных новообразований желчевыводящей системы.

Цель данной работы – пилотное исследование взаимосвязи заболеваемости инвазией *Opisthorchis felineus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы у населения эндемичных регионов Российской

Федерации на основании анализа данных официальной медицинской отчетности за период 2011–2013 гг.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено пилотное аналитическое исследование официальных данных медицинской статистики, отражающей заболеваемость инвазией *O. felineus* и онкологическими заболеваниями гепатобилиарной системы во всех географических и политических субъектах Российской Федерации за период с 1 января 2011 г. по 31 декабря 2013 г.

В период 2011–2013 гг. Российская Федерация включала 83 субъекта (ru.wikipedia.org). При анализе данных учтено, что Ненецкий автономный округ подает свои медицинские отчеты в составе общих отчетов Архангельской области. Республика Тыва из-за отсутствия возможности получить сведения о заболеваемости описторхозной инвазией за указанный период исключена из анализа данных. Проанализированы статистические данные 81 региона России, отражающие заболеваемость описторхозом за период с 1 января 2011 г. по 31 декабря 2013 г., которые получены из государственных годовых отчетов региональных управлений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (Роспотребнадзор, <http://rosпотребнадзор.ru/>). В указанных отчетах приводятся абсолютные числа и показатель заболеваемости на 100 000 населения в год.

Годовые отчеты региональных отделений Роспотребнадзора формируются на основании сведений о впервые установленном диагнозе описторхозной инвазии. В соответствии с утвержденными стандартами диагностика инвазии *O. felineus* основывается на микроскопическом обнаружении яиц в образцах стула и (или) яиц и взрослых червей в желчи после дуоденального зондирования [16]. В Российской Федерации скрининговая диагностика гельминтозов (микроскопия кала) используется для различных групп пациентов: обследование детей до 18 лет ежегодно, взрослых при прохождении профилактического обследования или в ходе диспансерного наблюдения. Кроме того, всем жителям Российской Федерации проводится исследование фекалий при госпитализации в стационар в плановом либо экстренном порядке [17]. При выявлении случая инвазии заполняется утвержденная учетная форма № 058/у «Экстренное извещение об инфекционном заболевании, пищевом, остром профессиональном отравлении, необычной реак-

ции на прививку» и передается в региональное отделение Роспотребнадзора.

Проведен анализ официальных медицинских статистических данных злокачественного поражения печени и внутрипеченочных желчных протоков в 82 регионах России за аналогичный период, полученный из годовых отчетов Российского центра информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии [18–20]. Данные Ненецкого автономного округа учтены в составе отчетов Архангельской области.

Данные отчеты создаются на основании сведений, подаваемых согласно утвержденной учетной форме № 090/у «Извещение о больном с впервые в жизни установленным диагнозом рака или другого злокачественного новообразования». Они содержат показатели заболеваемости различных типов и локализаций онкологических заболеваний в соответствии с Международной статистической классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Особенности статистического учета не позволяют проанализировать данные о заболеваемости холангиокарциномой по всем субъектам Российской Федерации. В этой связи изучены показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков (код С22 МКБ-10). Используются абсолютные числа и показатель заболеваемости на 100 000 населения в год.

Статистическую обработку полученных данных провели с использованием программы Statistica 10.0. Вычисляли среднюю ежегодную заболеваемость за 2011–2013 гг., представив ее как среднее  $M \pm$  стандартное отклонение  $m$ , квартилей  $Q_{25}$  и  $Q_{75}$ . Для определения взаимосвязи между показателями заболеваемости описторхозной инвазией и злокачественными новообразованиями печени и желчных протоков использован метод ранговой корреляции Спирмена. Также субъекты РФ распределены на две группы: с низкой среднегодовой заболеваемостью описторхозом ( $< 50$  случаев на 100 000 населения) и высокой ( $\geq 50$  случаев на 100 000 населения). Сравнение между данными группами было проведено с помощью теста непараметрического ранга (тест Манна – Уитни). Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ . Для визуализации показателей заболеваемости (картирование) использована программа Microsoft Office Visio 2007. При составлении карты заболеваемости описторхозом использованы градации показателей, аналогичные использованным при картировании заболеваемости в 1991–1993 гг. [21].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Анализ заболеваемости инвазией *Opisthorchis felineus* за 2011–2013 гг.*

Результаты анализа свидетельствуют, что максимальное количество выявленных случаев описторхозной инвазии в Российской Федерации составило 32 323 (2012), минимальное – 28 874 (2013). Показатель заболеваемости за указанный период равен  $24,7 \pm 9,0$  на 100 000 населения.

Исследование показало, что заболеваемость инвазией *O. felineus* неоднородно распределена в различных субъектах РФ (рис. 1). Субъекты России стратифицированы в зависимости от уровня заболеваемости: гиперэндемичные регионы с уровнем заболеваемости  $> 100$  на 100 000 населения, регионы с высокой заболеваемостью (53–100 на 100 000 населения), регионы со средним уровнем инвазии *O. felineus* (22–52 на 100 000 населения), регионы с низким уровнем пораженности ( $< 22$  на 100 000 населения).

К гиперэндемичным относятся регионы Западной Сибири, расположенные в бассейнах р. Оби и Иртыша: Ханты-Мансийский автономный округ (599,7 на 100 000 населения), Ямало-Ненецкий автономный округ (261,9 на 100 000 населения), Тюменская область (201,2 на 100 000 населения), Томская область (188,8 на 100 000 населения), Омская область (155,2 на 100 000 населения), Новосибирская область (127,4 на 100 000 населения).

Районы с высоким уровнем заболеваемости описторхозной инвазией (53–100 на 100 000 населения) представлены Республикой Алтай (64,8 на 100 000 населения), Курганской областью (67,3 на 100 000 населения) и Кемеровской областью (73,98 на 100 000 населения).

Субъектами со средним уровнем инвазии *O. felineus* являются Красноярский край (52,8 на 100 000 населения), Алтайский край (50,5 на 100 000 населения), Республика Коми (50,2 на 100 000 населения), Свердловская область (35,7 на 100 000 населения). Красноярский, Алтайский край расположены в бассейнах р. Енисей, истоке р. Оби, последние два – в бассейне р. Печоры.

В большинстве субъектов европейской части Российской Федерации, Восточной Сибири и на Дальнем Востоке зарегистрирована самая низкая заболеваемость описторхозной инвазией – менее 2,5 на 100 000 населения. Как правило, это случаи описторхоза у мигрантов эндемичных территорий.

Однако более высокие показатели встречаются на территории Волго-Камского бассейна: Волгоградская область (4,5 на 100 000 населения), Республика Чувашия (3,5 на 100 000 населения),

Пензенская область (3,4 на 100 000 населения) – в бассейне р. Волги; Челябинская область (14,4 на 100 000 населения), Пермская область (8,3 на 100 000 населения), Кировская область (3,9 на 100 000 населения) – в бассейне р. Камы; Оренбургская область (9,0 на 100 000 населения) – в бассейне р. Урала.

На протяжении трех лет изучаемого периода не зарегистрированы случаи описторхозной инвазии в 27 регионах России, расположенных в Центральном, Северо-Западном, Южном федеральных округах, Республике Хакасия, Дальнем Востоке, а также в семи регионах Северо-Кавказского федерального округа.



Рис. 1. Заболеваемость инвазией *Opisthorchis felinus* на 100 000 населения на территории Российской Федерации за период 2011–2013 гг.

- |                            |                                  |                                      |                                 |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1 Белгородская область     | 24 Мурманская область            | 44 Самарская область                 | 65 Кемеровская область          |
| 2 Брянская область         | 25 Новгородская область          | 45 Оренбургская область              | 66 Новосибирская область        |
| 3 Владимирская область     | 26 Псковская область             | 46 Пензенская область                | 67 Омская область               |
| 4 Воронежская область      | 27 Республика Карелия            | 47 Пермский край                     | 68 Томская область              |
| 5 Ивановская область       | 28 Республика Коми               | 48 Саратовская область               | 69 Забайкальский край           |
| 6 Тверская область         | 29 Краснодарский край            | 49 Ульяновская область               | 70 Республика Бурятия           |
| 7 Калужская область        | 30 Астраханская область          | 50 Республика Башкортостан           | 71 Республика Алтай             |
| 8 Костромская область      | 31 Волгоградская область         | 51 Республика Марий Эл               | 72 Республика Тыва              |
| 9 Курская область          | 32 Ростовская область            | 52 Республика Мордовия               | 73 Республика Хакасия           |
| 10 Липецкая область        | 33 Республика Адыгея             | 53 Республика Татарстан              | 74 Приморский край              |
| 11 г. Москва               | 34 Республика Калмыкия           | 54 Республика Удмуртия               | 75 Хабаровский край             |
| 12 Московская область      | 35 Ставропольский край           | 55 Республика Чувашия                | 76 Амурская область             |
| 13 Орловская область       | 36 Республика Ингушетия          | 56 Ханты-Мансийский автономный округ | 77 Камчатский край              |
| 14 Рязанская область       | 37 Республика Дагестан           | 57 Ямало-Ненецкий автономный округ   | 78 Магаданская область          |
| 15 Смоленская область      | 38 Республика Кабардино-Балкария | 58 Курганская область                | 79 Сахалинская область          |
| 16 Тамбовская область      | 39 Республика Северная Осетия    | 59 Свердловская область              | 80 Чукотский автономный округ   |
| 17 Тульская область        | 40 Республика Карачаево-Черкесия | 60 Тюменская область                 | 81 Республика Саха (Якутия)     |
| 18 Ярославская область     | 41 Республика Чечня              | 61 Челябинская область               | 82 Еврейская автономная область |
| 19 Архангельская область   | 42 Нижегородская область         | 62 Алтайский край                    | 83 Ненецкий автономный округ    |
| 20 Вологодская область     | 43 Кировская область             | 63 Красноярский край                 |                                 |
| 21 Калининградская область |                                  | 64 Иркутская область                 |                                 |
| 22 г. Санкт-Петербург      |                                  |                                      |                                 |
| 23 Ленинградская область   |                                  |                                      |                                 |

*Динамика заболеваемости инвазией *Opisthorchis felineus* на территории Российской Федерации за период 1991–2013 гг.*

Проведен анализ динамики заболеваемости описторхозом на территории Российской Федерации за последние 20 лет. С этой целью проведено сопоставление данных заболеваемо-

сти за 2011–2013 гг. с аналогичными данными за период 1991–1993 гг., представленными в обзоре Б.Б. Прохорова, 1993 [21]. Картирование данных 2011–2013 гг. выполнено с учетом принципов ранжирования показателей, использованных при картировании в указанном обзоре (рис. 2).

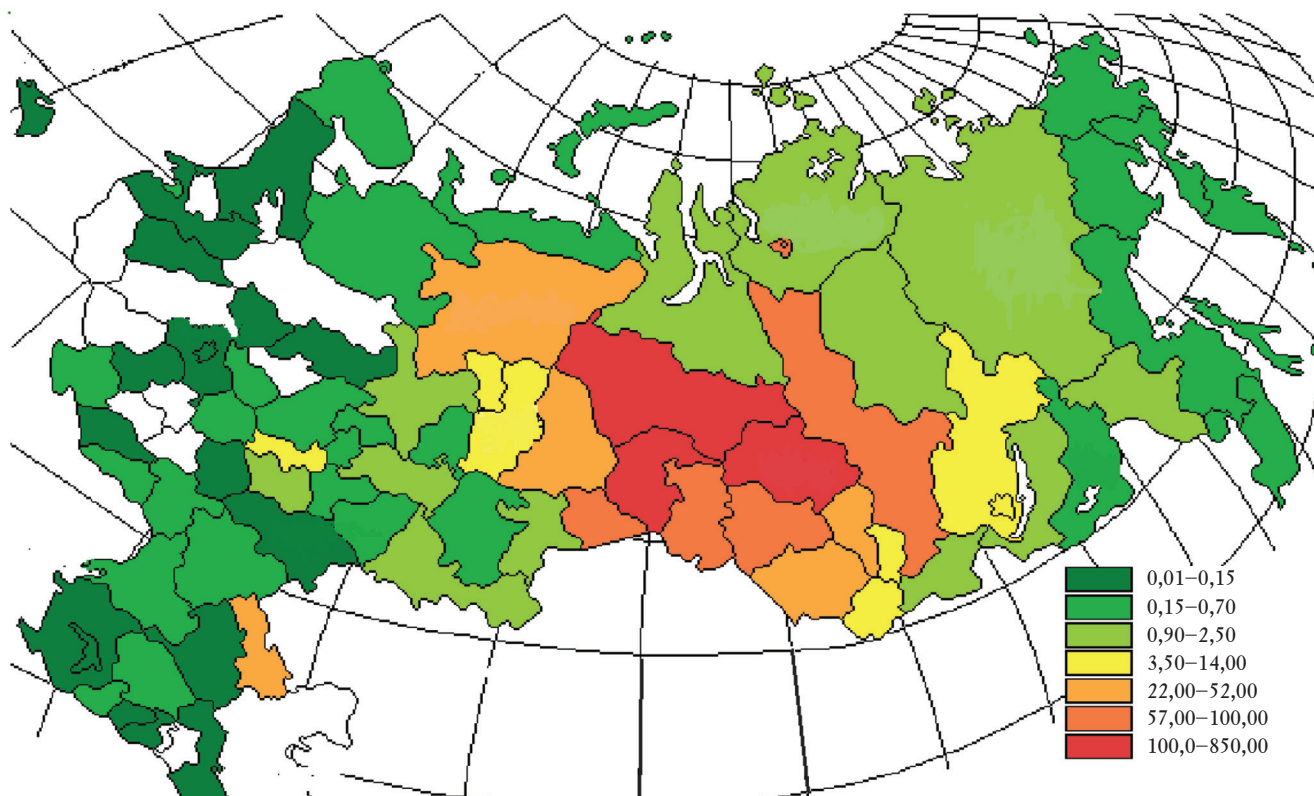


Рис. 2. Заболеваемость инвазией *Opisthorchis felineus* на 100 000 населения на территории Российской Федерации за период 1991–1993 гг. [21]

Установлено, что среднее значение заболеваемости описторхозом остается стабильным – 26,5 случаев на 100 000 населения в 1991–1993 гг. и 24,7 в 2011–2013 гг. Низкие показатели заболеваемости сохраняются на большинстве территорий европейской части России, Восточной Сибири и Дальнего Востока. Однако значительный рост уровня заболеваемости описторхозной инвазией отмечен в Западной Сибири – Омской, Новосибирской областях (с 57 до 155,2 и со 100 до 127,40 случаев на 100 000 населения соответственно).

Существенно выросла заболеваемость описторхозом в Ямало-Ненецком автономном округе с 0,9–2,5 до 261,9 на 100 000 населения. В то же время заболеваемость в Томской и Тюменской областях заметно сократилась за двадцатилетний период, но по-прежнему превышает 100 случаев на 100 000 населения.

Отмечено вовлечение в эпидемический процесс описторхозной инвазией новых регионов России. Увеличилось число выявленных случаев инвазии *O. felineus* в Западной Сибири (Алтай и Кемеровская область), в Приволжском (Пензенской, Волгоградской, Кировской, Оренбургской областях) и Уральском федеральных округах (Челябинская область).

Таким образом, не выявлено отчетливой динамики по среднему показателю заболеваемости за последние 20 лет (26,5 в 1991–1993 гг. против 24,7 в 2011–2013 гг. на 100 000 населения), однако отмечается расширение географии описторхозной инвазии, вовлечение новых регионов. С одной стороны, это может быть обусловлено улучшением диагностики, внедрением новых диагностических стандартов и скринговых программ [17]. С другой стороны, – ростом туризма и миграции населения в России из-за усиления экономических,

политических и культурных связей Сибири с другими регионами. В то же время неорганизованная миграция, усиление оттока населения из эндемичной местности, в том числе более старших возрастных групп с большим сроком проживания в очаге, и, следовательно, более инвазированных, переселение из северных районов в южные районы Сибири приводит к размыванию границ существующих очаговых территорий [22].

*Анализ заболеваемости злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков за период 2011–2013 гг.*

Количество впервые выявленных случаев злокачественных новообразований печени и внутрипеченочных желчных протоков в 2011 г. составило 6 525, в 2012 г. – 6 287, в 2013 г. – 6 789. Средний показатель заболеваемости данной патологией за период 2011–2013 гг. составил  $4,8 \pm 0,2$  случаев на 100 000 населения.

Анализ показал, что самые высокие показатели отмечены в Республике Саха и Томской области (14,5 и 9,3 на 100 000 населения соответственно) (рис. 3). К другим регионам с высоким уровнем заболеваемости раком печени и внутрипеченоч-

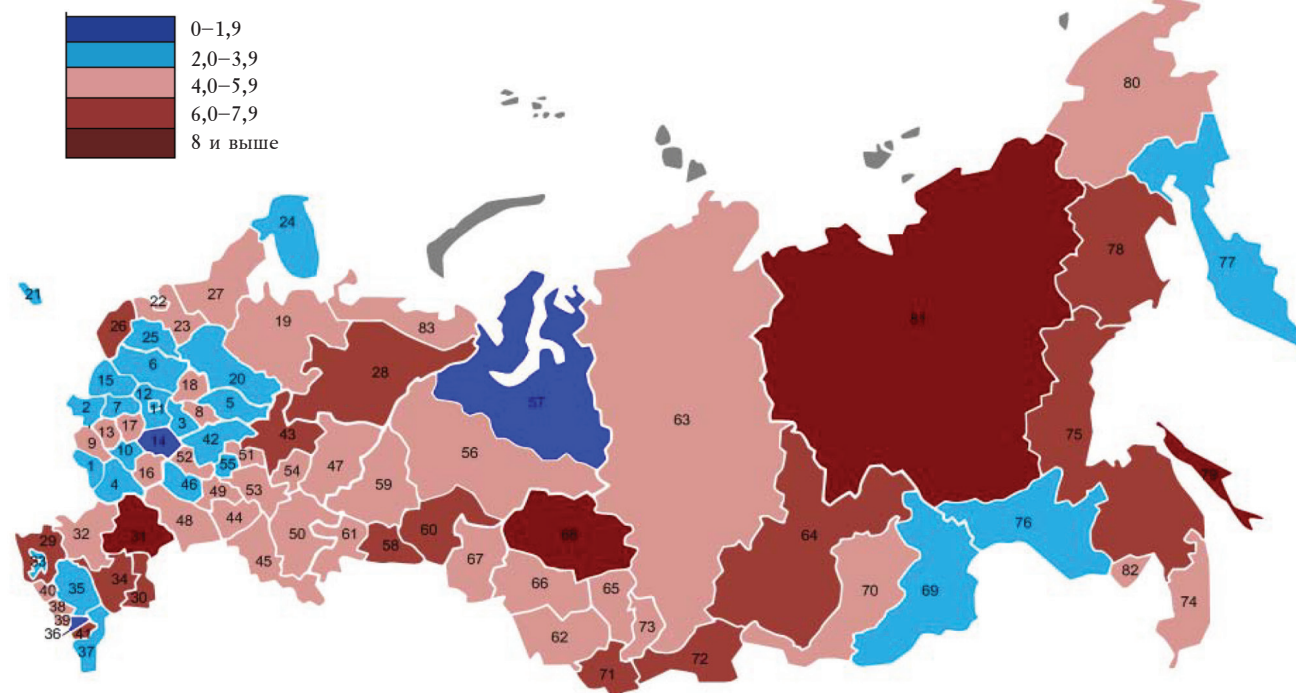


Рис. 3. Заболеваемость злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков на 100 000 населения на территории Российской Федерации за период 2011–2013 гг.

|                            |                                    |                               |                                      |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1 Белгородская область     | 24 Мурманская область              | 61 Челябинская область        | 82 Еврейская автономная область      |
| 2 Брянская область         | 25 Новгородская область            | 62 Алтайский край             | 83 Ненецкий автономный округ         |
| 3 Владимирская область     | 26 Псковская область               | 63 Красноярский край          | 40 Республика Карачаево-Черкесия     |
| 4 Воронежская область      | 27 Республика Карелия              | 64 Иркутская область          | 41 Республика Чечня                  |
| 5 Ивановская область       | 28 Республика Коми                 | 65 Кемеровская область        | 42 Нижегородская область             |
| 6 Тверская область         | 29 Краснодарский край              | 66 Новосибирская область      | 43 Кировская область                 |
| 7 Калужская область        | 30 Астраханская область            | 67 Омская область             | 44 Самарская область                 |
| 8 Костромская область      | 31 Волгоградская область           | 68 Томская область            | 45 Оренбургская область              |
| 9 Курская область          | 32 Ростовская область              | 69 Забайкальский край         | 46 Пензенская область                |
| 10 Липецкая область        | 33 Республика Адыгея               | 70 Республика Бурятия         | 47 Пермский край                     |
| 11 г. Москва               | 34 Республика Калмыкия             | 71 Республика Алтай           | 48 Саратовская область               |
| 12 Московская область      | 35 Ставропольский край             | 72 Республика Тыва            | 49 Ульяновская область               |
| 13 Орловская область       | 36 Республика Ингушетия            | 73 Республика Хакасия         | 50 Республика Башкортостан           |
| 14 Рязанская область       | 37 Республика Дагестан             | 74 Приморский край            | 51 Республика Марий Эл               |
| 15 Смоленская область      | 38 Республика Кабардино-Балкария   | 75 Хабаровский край           | 52 Республика Мордовия               |
| 16 Тамбовская область      | 39 Республика Северная Осетия      | 76 Амурская область           | 53 Республика Татарстан              |
| 17 Тульская область        | 57 Ямало-Ненецкий автономный округ | 77 Камчатский край            | 54 Республика Удмуртия               |
| 18 Ярославская область     | 58 Курганская область              | 78 Магаданская область        | 55 Республика Чувашия                |
| 19 Архангельская область   | 59 Свердловская область            | 79 Сахалинская область        | 56 Ханты-Мансийский автономный округ |
| 20 Вологодская область     | 60 Тюменская область               | 80 Чукотский автономный округ |                                      |
| 21 Калининградская область |                                    | 81 Республика Саха (Якутия)   |                                      |
| 22 г. Санкт-Петербург      |                                    |                               |                                      |
| 23 Ленинградская область   |                                    |                               |                                      |

ных желчных протоков относятся: Сахалинская (8,3 на 100 000 населения), Волгоградская (8,2 на 100 000 населения), Магаданская (7,4 на 100 000 населения), Тюменская (7,6 на 100 000 населения), Иркутская (7,5 на 100 000 населения) области. Самый низкий показатель был обнаружен в Ямало-Ненецком округе (0,9 на 100 000 населения).

*Анализ взаимосвязи заболеваемости инвазией *Opisthorchis felineus* и злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков*

В рамках настоящего исследования проанализирована взаимосвязь между заболеваемостью инвазией *O. felineus* и злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков в Российской Федерации в 2011–2013 гг.

Корреляционный анализ продемонстрировал слабую, но статистически значимую зависимость между изучаемыми показателями заболеваемости по субъектам РФ в 2011 г. ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,02$ ).

Анализ аналогичных показателей в 2012 и 2013 г. показал сохранение данной тенденции, хотя статистически значимой зависимости не получено ( $r = 0,21$ ;  $p = 0,07$ ; и  $r = 0,15$ ;  $p = 0,17$  соответственно). Отмечена указанная тенденция и при анализе показателей за три года ( $r = 0,20$ ;  $p = 0,07$ ).

Для сравнения средних показателей заболеваемости раком печени и внутрипеченочных желчных протоков в регионах с различным уровнем поражения биогельминтозами регионы России распределены на две группы: с высоким уровнем инвазии ( $\geq 50$  случаев на 100 000 населения) и низким ( $< 50$  случаев на 100 000 населения). Отмечено, что заболеваемость злокачественными новообразованиями статистически значимо выше в субъектах с высоким уровнем поражения населения описторхозом (таблица). Такая закономерность прослеживалась как по ежегодным показателям, так и по средним за период 2011–2013 гг.

Т а б л и ц а

| Заболеваемость злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков в регионах с высоким и низким уровнем инвазии <i>Opisthorchis felineus</i> |                                                            |      |      |                                                           |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------|------|-----------------------------------------------------------|------|------|------|
| Год                                                                                                                                                                     | Регионы с высоким уровнем инвазии <sup>1</sup> , $M \pm m$ | Q25  | Q75  | Регионы с низким уровнем инвазии <sup>2</sup> , $M \pm m$ | Q25  | Q75  | $p$  |
| 2011                                                                                                                                                                    | $6,07 \pm 0,59$                                            | 4,96 | 7,32 | $4,52 \pm 0,24$                                           | 3,39 | 5,34 | 0,01 |
| 2012                                                                                                                                                                    | $5,68 \pm 0,7$                                             | 4,58 | 6,71 | $4,51 \pm 0,26$                                           | 3,28 | 5,51 | 0,02 |
| 2013                                                                                                                                                                    | $5,34 \pm 0,6$                                             | 4,51 | 6,76 | $4,91 \pm 0,26$                                           | 3,50 | 5,87 | 0,22 |
| 2011–2013                                                                                                                                                               | $5,70 \pm 0,6$                                             | 4,92 | 6,82 | $4,64 \pm 0,24$                                           | 3,64 | 5,24 | 0,02 |

<sup>1</sup>  $\geq 50$  случаев на 100 000 населения; 12 субъектов РФ. <sup>2</sup>  $< 50$  случаев на 100 000 населения; 69 субъектов РФ.

В ходе анализа установлено, что в регионах с гиперэндемичным (Томская область, Тюменская область) и умеренным уровнем заболеваемости описторхозом (Волгоградская область, Иркутская область) регистрируются высокие показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков. В то же время в одном из субъектов РФ – Республике Саха – в 2011–2013 гг. наряду с низким показателем заболеваемости описторхозом регистрируются высокие показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями печени. Высокий уровень онкологической патологии гепатобилиарной системы может быть связан с некоторыми другими паразитарными и инфекционными заболеваниями, которые отмечены в данном регионе [23, 24]. Следует отметить, что ранее Республика Саха являлась эндемичной по описторхозной инвазии, о чем свидетельствует ряд работ [4, 5]. Учитывая, что малигнизация, как правило, формируется в результате длительного (20–30 лет) воспалительного процесса на фоне

хронической инвазии, нельзя полностью исключить вклад последней в рост новообразований печени и желчевыводящих протоков у местного населения в настоящее время.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные результаты, можно сделать следующие выводы.

1. Заболеваемость инвазией *O. felineus* в Российской Федерации за период 2011–2013 гг. составила  $24,7 \pm 9,0$  на 100 000 населения. К гиперэндемичным по описторхозу регионам (уровень заболеваемости  $> 100$  на 100 000 населения) относятся Ханты-Мансийский автономный округ, Ямало-Ненецкий автономный округ, а также Тюменская, Томская, Омская и Новосибирская области (Западная Сибирь).

2. Средний показатель заболеваемости инвазией *O. felineus* за последние 20 лет относительно стабилен ( $26,5$  в 1991–1993 гг.;  $24,7$  в 2011–2013 гг. на 100 000 населения), однако отмечается распространение инвазии на новые территории.

3. Заболеваемость раком печени и внутрипеченочных желчных протоков за период 2011–2013 гг. составила  $4,8 \pm 0,2$  случаев на 100 000 населения. Наиболее высокие показатели регистрируются на Дальнем Востоке, в Сибири и Волгоградской области.

4. Проведенное аналитическое исследование впервые предоставило пилотные данные о взаимосвязи заболеваемости инвазией *O. felineus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы у населения эндемичных регионов Российской Федерации.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

Материалы, изложенные в данной статье, опубликованы в журнале *Parasitology International*, 2016, Special Issue [26]. Официальное разрешение на публикацию русскоязычной версии статьи в журнале «Бюллетень сибирской медицины» выдано Отделом глобальных прав (Global Rights Department) издательства ELSEVIER 01.08.2016.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант «Фундаментальные подходы к оптимизации диагностики и терапии природно-очаговой инвазии *Opisthorchis felineus* в эндемичных регионах», договор от 14.04.16, № 16-44-700148\16).

## ЛИТЕРАТУРА

- Marcos L.A., Terashima A., Gotuzzo E. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21: 523–530. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32830f9818.
- Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* // *Int. J. Parasitol.* 2013; 43: 1031–1046. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.007
- Ogorodova L.M., Fedorova O.S., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V., Keiser J., Odermatt P., Brindley P.J., Mayboroda O.A., Velavan T.P., Freidin M.B., Sazonov A.E., Saltykova I.V., Pakharukova M.Y., Kovshirina Y.V., Kaloulis K., Krylova O.Y., Yazdanbakhsh M.; TOPIC Consortium. Opisthorchiasis: An Overlooked Danger // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9 (4): 35–63. DOI:10.1371/journal.pntd.0003563.
- Безр С.А. Паразитологический мониторинг в России (основы концепции) // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 1997; 1: 3–8.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2014; 116–117.
- Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // *Parasitology International.* 2012; 61: 25–31. DOI: 10.1016/j.parint.2011.07.021.
- Бронштейн А.М. Сообщение 3. Заболеваемость описторхозом и дифиллоботриозом населения пос. Ванзетур Ханты-Мансийского автономного округа // *Медицинская паразитология.* 1986; 5: 10–14.
- Осипова Л.П., Офицеров В.И., Ткаченко Т.Н., Жадапов С.И., Ругин В.П. Иммуноферментный анализ описторхозной инвазии у населения Шурышкарского района Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2004; 1: 14–17.
- Белобородова Э.И., Калюжина М.И., Тиличенко Ю.А., Тун М.А., Колосовская Т.А., Крицкая Н.Г. Хронический описторхоз и пищеварительная система: монография. Томск, 1996: 116.
- Максимова Г.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В., Львова М.Н., Катохин А.В., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А. Роль *Opisthorchis felineus* в индукции рака желчевыводящих путей // *Паразитология.* 2015; 49 (1): 3–11.
- Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Pairojkul C., Bhudhisawasdi V., Tesana S., Thinkamrop B., Bethony J.M., Loukas A., Brindley P.J. Liver fluke Induces cholangiocarcinoma // *PLoS Med.* 2007; 4: 1148–1155. DOI:10.1371/journal.pmed.0040201.
- A review of human carcinogens // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer IARC Biological agents. 2012; 100: 1–441. DOI: 10.1289/ehp.1409149.
- Бражникова Н.А., Толкаева М.В. Рак печени, желчных путей и поджелудочной железы при хроническом описторхозе // *Бюллетень сибирской медицины.* 2002; 2: 71–77.
- Хамидуллин Р.И., Агдуллин И.Р., Рахманин Ю.А., Погорельцев В.И., Хамидуллин А.Р., Галкина И.В., Хамидуллин И.Р., Султанаева Е.Г. Паразитарный фактор и рак // *Гигиена и санитария.* 2011; 6: 8–11.
- Максимова Г.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В., Львова М.Н., Катохин А.В., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А. Изменения в печени сирийских хомяков, индуцированные диметилнитрозамином на фоне описторхоза // *Медицинский академический журнал.* 2012; 7: 160–162.
- Описторхоз у взрослых // Клинические рекомендации. Москва, 2014: 53.
- Профилактика описторхоза: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010; 48 с.

18. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2011 году. М.: Московский онкологический исследовательский институт им. П. Герцена, 2013: 72–73.
19. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2012 году. М.: Московский онкологический исследовательский институт им. П. Герцена, 2014: 70–71.
20. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году. М.: Московский онкологический исследовательский институт им. П. Герцена, 2015: 70–71.
21. Прохоров Б.Б. Окружающая среда и здоровье населения России. <http://www.sci.aha.ru/ATL/ra55g.htm>.
22. Завозные гельминтозы в Российской Федерации: информационное письмо Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федерального Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора № 22ФЦ/139 от 16.01.2014. Москва, 2004.
23. Бугаева Т.Т., Иванов П.М., Алексеева М.Н., Одинцова Н.И., Бояркина А.П. Первичный рак печени в республике Саха (Якутия) // *Сибирский онкологический журнал*. 2009; 2 (32): 44–48.
24. Алексеева М.Н. Вирусные гепатиты в республике Саха (Якутия): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2002: 37.
25. Кучкина А.И., Федулова А.Г. Гигиенические аспекты паразитарных заболеваний в республике Саха (Якутия) // *Успехи современного естествознания*. 2014; 6: 147–148.
26. Fedorova O.S., Kovshirina Y.V., Kovshirina A.E., Fedotova M.M., Deev I.A., Petrovskiy F.I., Filimonov A.V., Dmitrieva A.I., Kudiyakov L.A., Saltykova I.V., Odermatt P., Ogorodova L.M. *Opisthorchis felinus* infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics // *Parasitol. Int.* 2016; Jul 26. pii: S1383-5769(16)30236-7. DOI: 10.1016/j.parint.2016.07.010.

Поступила в редакцию 11.10.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Федорова Ольга Сергеевна**, д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск.

**Ковширина Юлия Викторовна**, канд. мед. наук, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, СибГМУ, г. Томск.

**Ковширина Анна Евгеньевна**, студентка 5-го курса лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск.

**Федотова Марина Михайловна**, канд. мед. наук, ассистент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск.

**Деев Иван Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, первый проректор СибГМУ, г. Томск.

**Петровский Федор Игоревич**, д-р мед. наук, ректор Ханты-Мансийской государственной медицинской академии, г. Ханты-Мансийск.

**Филимонов Александр Вячеславович**, д-р мед. наук, доцент кафедры онкологии, лучевой диагностики и лучевой терапии Ханты-Мансийской государственной медицинской академии, г. Ханты-Мансийск.

**Дмитриева Алла Ивановна**, д-р мед. наук, зав. клинко-диагностической лабораторией, Томский областной онкологический диспансер, г. Томск.

**Кудяков Лев Александрович**, канд. мед. наук, главный врач Томского областного онкологического диспансера, г. Томск.

**Салтыкова Ирина Владимировна**, канд. мед. наук, научный сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

**Михалев Евгений Викторович**, д-р мед. наук, профессор кафедры госпитальной педиатрии, проректор по лечебной работе СибГМУ, г. Томск.

**Питер Одерматт**, доктор наук, руководитель научной группы «Гельминты и здоровье», отдел эпидемиологии и общественного здоровья, Швейцарский Институт тропической медицины и общественного здоровья, г. Базель, Швейцария.

**Огородова Людмила Михайловна**, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Федорова Ольга Сергеевна**, e-mail: [olga.sergeevna.fedorova@gmail.com](mailto:olga.sergeevna.fedorova@gmail.com)

УДК 616.36/.369-006:616.995.122.21]-07(470+571)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-147-158

For citation: Fedorova O.S., Kovshirina Y.V., Kovshirina A.E., Fedotova M.M., Deev I.A., Petrovskiy F.I., Filimonov A.V., Dmitrieva A.I., Kudyakov L.A., Saltykova I.V., Odermatt P., Ogorodova L.M. Analysis of opisthorchis felineus infection and liver and intrahepatic bile ducts cancer incidence rate in Russian Federation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 147–158

## Analysis of *Opisthorchis felineus* infection and liver and intrahepatic bile ducts cancer incidence rate in Russian Federation

Fedorova O.S.<sup>1</sup>, Kovshirina Y.V.<sup>1</sup>, Kovshirina A.E.<sup>1</sup>, Fedotova M.M.<sup>1</sup>, Deev I.A.<sup>1</sup>, Petrovskiy F.I.<sup>2</sup>, Filimonov A.V.<sup>2</sup>, Dmitrieva A.I.<sup>3</sup>, Kudyakov L.A.<sup>3</sup>, Saltykova I.V.<sup>1</sup>, Odermatt P.<sup>4</sup>, Ogorodova L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Khanty-Mansiysk State Medical Academy

40, Mira Str., Khanty-Mansiysk, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra, 628011, Russian Federation

<sup>3</sup> Tomsk Regional Oncology Center

115, Lenina Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>4</sup> Swiss Tropical and Public Health Institute, Department of Epidemiology and Public Health, University of Basel  
57, Socinstrasse, Basel, Switzerland

### ABSTRACT

**The purpose of this paper** is to perform the pilot review of the official medical statistics on reported *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) infection and liver and intrahepatic bile duct cancer in Russian Federation, covering the period 2011–2013.

**Materials and methods.** Statistical data collected from 81 regions of Russia, reflecting the incidence of opisthorchiasis over a period from the 1<sup>st</sup> of January 2011 to the 31<sup>st</sup> of December 2013 was analyzed. The analysis of official health statistics of malignant hepatic lesions and intrahepatic bile duct was conducted in 82 regions of Russia over the same period. The data was obtained from the annual reports of the Russian center of information technologies and epidemiological studies in the field of oncology.

**Results.** The average annual incidence of *O. felineus* was  $24,7 \pm 9,0$  cases per 100,000 population. The highest incidence was observed in Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug, Yamalo-Nenets Autonomous Okrug, Tyumen Oblast, Tomsk Oblast, Omsk Oblast and Novosibirsk Oblast. We did not observe any significant change in *O. felineus* infection rates within last 20 years. However, we found that infection incidence had increased in some geographical units of Western Siberia. The incidence of liver and intrahepatic bile duct cancers was  $4,8 \pm 0,2$  cases per 100,000 population; the highest rate was reported in Far East regions, Siberia and Volgograd Oblast. This study documents the importance of opisthorchiasis in certain endemic areas and presents the best available data on associations between *O. felineus* infection and liver/intrahepatic bile duct cancers in endemic areas of Russian Federation.

**Key words:** *Opisthorchis felineus* infection, liver and intrahepatic bile ducts cancer, incidence rate, epidemiology.

### REFERENCES

1. Marcos L.A., Terashima A., Gotuzzo E. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21: 523–530. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32830f9818.
2. Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* // *Int. J. Parasitol.* 2013. № 43. P. 1031–1046. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.007
3. Ogorodova L.M., Fedorova O.S., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V., Keiser J., Odermatt P., Brindley P.J., Mayboroda O.A., Velavan T.P., Freidin M.B., Sazonov A.E., Saltykova I.V., Pakharukova M.Y., Kovshirina Y.V., Kaloulis K., Krylova O.Y., Yazdanbakhsh M.; TOPIC Consortium. Opisthorchiasis: An Overlooked Danger // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9 (4): 35–63. DOI:10.1371/journal.pntd.0003563.

4. Beer S.A. Parazitologicheskij monitoring v Rossii (osnovy koncepcii) [Parasitological monitoring in Russia (the basic concepts)] // *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni – Medical Parasitology and parasitic diseases*. 1997; 1: 3–8 (in Russian).
5. Chissov V.I., Starinskogo V.V., Petrova G.V. (Eds). Sos-tojanie onkologicheskoy pomoshhi naseleniju Rossii v 2011 godu [Status of cancer care in Russia in 2011]. Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute Health-care Ministry Publ., 2012: 2408 (in Russian).
6. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // *Parasitology International*. 2012; 61: 25–31. DOI: 10.1016/j.parint.2011.07.021.
7. Bronshtein A.M. Zabolevaemost' opistorhozom i difillobotriozom naselenija pos. Vanzetur Hanty-Mansijskogo okruga [Opisthorchiasis and diphylobothriasis mor-bidity of the population in the settlement of Vanzetur, Khanty-Mansi National Okrug] // *Medicinskaya para-zitologiya – Medical Parasitology*. 1986; 5: 10–14 (in Russian).
8. Osipova L.P., Oficerov V.I., Tkachenko T.N., Zhadanov S.I., Rugin V.P. Immunofermentnyj analiz opistorhoznoj invazii u naselenija Shuryshkarskogo rajona Jamalo-Nenetskogo Avtonomnogo okruga (JaNAO) [Enzyme immunoassay of Opisthorchis invasion in the population of the Scu-ryshkarsky District, Yamalo-Nenets Autonomous Okrug] // *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni – Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 2004; 1: 14–17 (in Russian).
9. Beloborodova E.I., Kaljuzhina M.I., Tilichenko Ju.A. Tun M.A. Hronicheskij opistorhoz i pishhevaritel'naja-sistema [Chronic opisthorchiasis and digestive system]. Tomsk: TSU Publ., 1996: 118 (in Russian).
10. Maksimova G.A., Zhukova N.A., Kashina E.V., Lvo-va M.N., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A. Rol' Opisthorchis felinus v indukcii raka zhelche-vyvod-jashhih putej [Role of Opisthorchis Felinus on induction of bile duct cancer] // *Parazitologiya – Parasitology*. 2015; Jan-Feb, 49 (1): 3–118 (in Russian).
11. Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Pairojkul C., Bhudhisawasdi V., Tesana S., Thinkamrop B., Bethony J.M., Loukas A., Brindley P.J. Liver fluke Induces cholangiocarcinoma // *PLoS Med*. 2007; 4: 1148–1155. DOI:10.1371/journal.pmed.0040201.
12. A review of human carcinogens // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer IARC Biological agents. 2012; 100: 1–441. DOI: 10.1289/ehp.1409149.
13. Brazhnikova N.A., Tolkaeva M.V. Rak pecheni, zhelchnyh putej i podzheludochnoj zhelezy pri hronicheskom opistorhoze [Cancer of liver, biliary tracts and pancreas at chronic opisthorchosis] // *Byulleten' sibirskoj mediciny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2002; 2: 7–778 (in Russian).
14. Khamidullin R.I., Agullin I.R., Rakhmanin Yu.A., Pogo-reltsev V.I., Khamidullin A.R., Galkina I.V., Khamidullin I.R., Sultanayeva E.G. Parazitarnyj faktor i rak [Parasitic factor and cancer] // *Gigiena i sanitariya – Hygiene and Sanitation*. 2011; 6: 8–118 (in Russian).
15. Mordvinov V.A., Maksimova G.A., Zhukova N.A., Kashi-na E.V., Lvova M.N., Tolstikova T.G., Katokhin A.V. Izme-nenija v pecheni sirijskih homjakov, inducirovannye di-metilnitrozaminom na fone opistorhoza [Changes in Syrian hamsters liver induced dimethylnitrosamine in experimental opisthorchiasis] // *Medicinskij akademicheskij zbornal – Medical Academic Journal*. 2012; 7: 160–162 (in Russian).
16. Opistorhoz u vzroslyh [Opisthorchiasis in adults] // *Klinicheskie rekomendacii – Clinical Recommendations*. Moscow, 2014; 53: 8 (in Russian).
17. Profilaktika opistorhoza: metodicheskie ukazaniya [Pro-phylactics of opisthorchiasis. Methodical instructions] M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology, 2010: 48 (in Russian).
18. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2011 godu [Malignancies in Russia in 2011]. Chissov V.I., Starinsko-go V.V., Petrova G.V. (Eds). Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute Healthcare Ministry Publ., 2013: 289 (in Russian).
19. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2012 godu [Malignancies in Russia in 2012]. Kaprin A.D., Starinsko-go V.V., Petrova G.V. (Eds). Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute Healthcare Ministry Publ., 2014: 250 (in Russian).
20. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2013 godu [Malignancies in Russia in 2013]. Kaprin A.D., Starinskogo V.V., Petrova G.V. (Eds). Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute Healthcare Ministry Publ., 2015: 250 (in Russian).
21. Prokhorov B.B. Okruzhajushhaja sreda i zdorov'e naselenija Rossii [Environment and Health of the Russian population]. <http://www.sci.aha.ru/ATL/ra55g.htm> (accessed 1998).
22. Zavoznye gel'mintozy v Rossijskoj Federacii: informa-cionnoe pis'mo MZ RF, RPN ot 16 janvarja 2004 g., N 22FC/139 [Imported helminth infections in the Russian Federation: the information letter for Russian Ministry of Health, RPN on January 16, 2004, N 22FTS / 139]. Moscow, 2004 (in Russian).
23. Bugaeva T.T., Ivanov P.M., Alekseeva M.N., Odincova I.N., Bojarkina A.P. Pervichnyj rak pecheni v respublike Saha (Jakutija) [Primary liver cancer in the Republic of Sakha (Yakutia)] // *Sibirskij onkologicheskij zbornal – Siberian Journal of Oncology*. 2009; 2 (32): 44–48 (in Russian).
24. Alekseeva M.N. Virusnye gepatity v respublike Saha (Jakutija). Diss. dokt. med. nauk [Viral hepatitis in the Republic of Sakha (Yakutia). Dr. med. sci. diss.]. Sankt-Peterburg, 2002: 286 (in Russian)
25. Kychkina A.I., Fedulova A.G. Gigienicheskie aspekty parazitarnyh zabolevanij v respublike Saha (Jakutija) [Hy-

gienic aspects of parasitic diseases in the Republic of Sakha (Yakutia)] // *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya – The successes of modern science*. 2014; 6: 147–1488 (in Russian).  
26. Fedorova O.S., Kovshirina Y.V., Kovshirina A.E., Fedotova M.M., Deev I.A., Petrovskiy F.I., Filimonov A.V.,

Dmitrieva A.I., Kudyakov L.A., Saltykova I.V., Odermatt P., Ogorodova L.M. *Opisthorchis felineus* infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics // *Parasitol. Int.* 2016; Jul 26. pii: S1383-5769(16)30236-7. DOI: 10.1016/j.parint.2016.07.010.

Received October 11.2016

Accepted December 14.2016

**Fedorova Olga S.**, DM, Professor of Department of Faculty Pediatrics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kovshirina Yliy V.**, PhD, Assistant of Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kovshirina Anna E.**, Student of Department of General Medicine, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Fedotova Marina M.**, PhD, Assistant of Department of Faculty Pediatrics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Deev Ivan A.**, DM, Professor of Department of Faculty Pediatrics, First Vice-rector, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Petrovskiy Fedor I.**, DM, Associate Professor of Department of Clinical Immunology and Allergology, Rector of Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra, Khanty-Mansiysk, Russian Federation.

**Filimonov Alexandr V.**, PhD, Associate Professor of the Department of Oncology, Radiation Diagnostics and Radiotherapy Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra, Khanty-Mansiysk, Russian Federation.

**Dmitrieva Alla I.**, DM, Head of Clinical Diagnostic Laboratory, Deputy Head of the Scientific-Research Work of Tomsk Regional Oncologic Dispensary, Tomsk, Russian Federation.

**Saltykova Irina V.**, PhD, Researcher of Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Michalev Evgeny V.**, DM, Professor of Department of Hospital Pediatrics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Peter Odermatt**, PhD, Associate Professor of Department of Epidemiology and Public Health, Swiss Tropical and Public Health Institute Basel, University of Basel, Basel, Switzerland.

**Ogorodova Ludmila M.**, DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Faculty Pediatrics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Fedorova Olga S.**, e-mail: olga.sergeevna.fedorova@gmail.com

УДК 616.23/.24-002.2+616.248]-036.65:615.357:616.2-008.87

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-159–165

Для цитирования: Федосенко С.В., Карнаушкина М.А., Огородова Л.М., Петров В.А., Деев И.А., Куликов Е.С., Сазонов А.Э. Влияние курсового назначения системных глюкокортикостероидов при обострении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких на состав респираторной микробиоты в стабильный период. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 159–165

## Влияние курсового назначения системных глюкокортикостероидов при обострении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких на состав респираторной микробиоты в стабильный период

Федосенко С.В.<sup>1</sup>, Карнаушкина М.А.<sup>2</sup>, Огородова Л.М.<sup>1</sup>,  
Петров В.А.<sup>1</sup>, Деев И.А.<sup>1</sup>, Куликов Е.С.<sup>1</sup>, Сазонов А.Э.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет (МГМУ) им. И.М. Сеченова  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2

<sup>3</sup> Московский государственный университет (МГУ) им. М.В. Ломоносова  
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** — оценка способности системных глюкокортикостероидов, назначенных в период обострения заболевания, оказывать модифицирующее влияние на качественный и количественный состав орофарингеальной микробиоты.

**Материал и методы.** В исследование включены 88 больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и 50 пациентов с бронхиальной астмой (БА) стабильного течения, анамнезом наблюдения за больным на протяжении 12 мес и более, с отсутствием обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении 4 нед и более, предшествующих включению в работу. Также у всех пациентов, участвующих в исследовании, были взяты образцы орофарингеальной микробиоты для выделения бактериальной ДНК и секвенирования по последовательностям 16S рРНК генов с последующим анализом таксономического состава микробиоты. Для выявления взаимосвязи между таксономическим составом метабеномов и их метаданными использована обобщенная линейная модель (Generalised Linear Model, GLM) в ее реализации на программном языке R версии 3.1.0, пакет glm2.

**Результаты.** Получены данные о том, что использование системных глюкокортикостероидов, назначенных в период обострения БА и ХОБЛ, модифицирует состав респираторного микробиома в стабильный период, увеличивая орофарингеальную представленность непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* (включая представителей рода *Prevotella*) и снижая бактериальную обсемененность орофарингеальных мазков протеобактериями родов *Streptococcus* и *Haemophilus*, включающих патогенные микроорганизмы.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, системные глюкокортикостероиды, орофарингеальная микробиота, обострение.

## ВВЕДЕНИЕ

Хронические обструктивные заболевания легких, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и бронхиальная астма (БА), ассоциированы с персистирующим бронхолегочным воспалением, которое лежит в основе развития, поддержания и усугубления вентиляционных нарушений [1, 2]. Персистирующее бронхолегочное воспаление и выраженные вентиляционные нарушения у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких представляют собой значимый фактор риска контаминации дыхательных путей условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, что наиболее выражено в случае ХОБЛ [3]. Выполнен ряд исследований орофарингеальной микробиоты с использованием современных молекулярно-генетических методов. Вне обострения в группах больных БА и ХОБЛ по мере увеличения выраженности вентиляционных нарушений и тяжести заболевания отмечается уменьшение содержания непатогенных представителей типа *Bacteroidetes* (прежде всего рода *Prevotella*), в норме составляющих подавляющее большинство микроорганизмов респираторного тракта здорового человека. Вместе с тем установлено увеличение содержания потенциально патогенных и патогенных представителей *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinomyces*, *Mycoplasma* [4–6]. При этом степень указанных изменений наиболее выражена у больных тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ [4]. Вероятно, проводимая фармакотерапия может оказывать влияние на качественный и количественный состав микробиоты дыхательных путей у больных бронхиальной астмой и ХОБЛ.

Системные глюкокортикостероиды представляют собой одну из важнейших групп препаратов, широко используемых у больных БА и ХОБЛ в период обострения в дополнение к бронхолитической терапии [1, 2]. Следует отметить, что роль курсового приема системных глюкокортикостероидов в трансформации респираторной микробиоты у данной группы больных исследована слабо. В нескольких опубликованных результатах исследований, выполненных с участием больных ХОБЛ, отмечается положительное влияние применения системных кортикостероидов в период обострения заболевания как на качественные характеристики мокроты, так и на состав микробиоты сразу после разрешения обострения. Так, А.Е. Evensen (2010) отмечает уменьшение продукции гнойной мокроты при ХОБЛ на

фоне назначения короткого курса пероральных кортикостероидов [7].

В другом исследовании Y.J. Huang и соавт. (2014), используя высокотехнологичные методики секвенирования бактериальных генов 16S рРНК, полученных из мокроты 60 больных ХОБЛ в период обострения, описали динамику состава респираторной микробиоты непосредственно до и сразу после курса терапии. Последний включал помимо бронхолитиков только антибиотики, только системные кортикостероиды (СКС) или комбинацию антибактериальной терапии с курсом приема пероральных глюкокортикостероидов (ГКС). Оказалось, что применение антибактериальных препаратов без ГКС приводило сразу после курса лечения к существенному сокращению численности бактерий в мокроте по многим таксонам (преимущественно за счет представителей *Proteobacteria*). Однако при этом в значительной степени снижался показатель  $\alpha$ -разнообразия микробиоты. Снижение таксономического разнообразия респираторной микробиоты скорее следует расценивать как неблагоприятный эффект терапии, поскольку такое микробиотическое сообщество имеет меньший метаболический потенциал. Оно является менее устойчивым к внедрению и закреплению в нем микроорганизмов извне, в том числе и способных провоцировать развитие инфекционного процесса и, следовательно, обострение заболевания. С другой стороны, в группе больных ХОБЛ, получавших пероральные глюкокортикостероиды без антибиотиков, респираторная микробиота демонстрировала увеличение индекса таксономического разнообразия, но со значительным ростом численности многих микроорганизмов, включая представителей типа *Proteobacteria*. Оптимальный результат был получен в группе больных с обострением ХОБЛ, которые получали СКС в дополнение к антибактериальной терапии. В мокроте отмечалось снижение бактериальной нагрузки на фоне увеличения индекса таксономического разнообразия микробиоты [8].

В связи с тем, что остается неочевидным отдаленный эффект курсовой терапии СКС, проводимой в период обострения, на состав респираторной микробиоты у больных БА и ХОБЛ вне обострения, целью данного исследования стала оценка способности системных глюкокортикостероидов, назначенных в период обострения заболевания, оказывать модифицирующее влияние на качественный и количественный состав орофарингеальной микробиоты.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с поставленной целью по единому протоколу спланировано и выполнено одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование, в которое включены 88 больных ХОБЛ (средний возраст  $(58 \pm 9)$  лет, из них 57 пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести и 31 больной ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения) и 50 пациентов с БА (средний возраст  $(57 \pm 7)$  лет, из них 23 пациента с легкой контролируемой и частично контролируемой астмой и 27 больных тяжелой неконтролируемой астмой). В исследование включали мужчин и женщин, больных БА и ХОБЛ стабильного течения, с подтвержденным диагнозом (в соответствии с международными (GINA, GOLD) и Российскими клиническими рекомендациями), анамнезом наблюдения за больным на протяжении 12 мес и более, отсутствием анамнеза обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении 4 нед и более, предшествующих включению в работу.

Всем больным проводилось объективное клиническое обследование с тщательным сбором анамнестических данных и анализом медицинской документации, особое внимание уделено частоте курсов приема СКС за предшествующие включению 12 мес.

Также у всех пациентов, участвующих в исследовании, были взяты образцы орофарингеальной микробиоты для выделения бактериальной ДНК с помощью набора FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (MPBIO, США). Все образцы подвергнуты секвенированию по последовательностям 16S рНК генов, V3–V4 варибельные регионы на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США). Фильтрация ридов по качеству и их таксономическая классификация по байесовскому алгоритму против базы данных Greengenes V13.5 проведены с помощью программного обеспечения QIIME. Среднее число соотношенных по таксономии ридов на образце составило  $2\,151 \pm 245$ .

Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакета программ Statistica for Windows version 10.0. При сравнении частот качественных признаков использовался критерий  $\chi^2$ . Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные – в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $SD$  – стандартное отклонение. Разницу значений считали значимой при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ данных выполнен с использованием метода ранговой корреляции Спирмена ( $R$ ) в пакете stats языка R.

Для выявления взаимосвязи между таксономическим составом метагеномов и их метаданными использована обобщенная линейная модель (Generalised Linear Model, GLM) в ее реализации на программном языке R версии 3.1.0, пакет glm2. Этот метод позволяет выявлять нелинейные взаимосвязи между данными с распределением, отличным от нормального. В качестве предикторных переменных использованы данные о диагнозе доноров образцов, а также сведения о терапии, в том числе частоте курсов СКС. В качестве ответных переменных использованы показатели представленности бактериальных видов или родов (%). Модель применена в предположении Пуассоновского распределения величин. Результатом анализа с помощью данного метода является определение набора значений параметра оценки (англ. estimate), отражающего влияние изменения регрессора – предикторной переменной (в данном случае клиничко-анамнестические факторы) – на зависимую переменную (представленность той или иной операционной таксономической единицы) в логарифмическом масштабе. Рассчитываемый при этом коэффициент наклона прямой (КНП), определяющий направление и степень зависимости, является значением из выдачи команды glm в поле estimate. В физическом понимании, если провести прямую аппроксимации тренда зависимости исследуемых величин, то данный коэффициент определяет степень наклона данной прямой относительно горизонтальной оси.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении анамнеза отмечено, что в группе больных астмой курсы терапии системными глюкокортикостероидами за предшествующие 12 мес получали 44% пациентов (13% больных легкой контролируемой и частично контролируемой БА, что статистически значимо отличалось от частоты эпизодов приема СКС в группе больных тяжелой неконтролируемой БА – 70,4%;  $p = 0,00015$ ). Данный показатель у больных астмой прямо коррелировал с частотой обострений заболевания ( $R = 0,68$ ;  $p = 0,005$ ) и частотой случаев госпитализации по поводу обострения ( $R = 0,58$ ;  $p = 0,002$ ).

В группе больных ХОБЛ курсовую терапию СКС проводили 17,05% пациентов (в группе больных с ХОБЛ 2 степени тяжести – 8,8% случаев, у больных ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения – 32,3%,  $p = 0,0001$ ). При этом так же как и в случае астмы частота эпизодов курсовой терапии системными кортикостероидами прямо коррелировала с частотой обострений ( $R = 0,24$ ;  $p = 0,0035$ ) и госпитализаций ( $R = 0,73$ ;  $p = 0,005$ ).

Следует отметить, что частота курсов приема СКС за предшествующие 12 мес терапии статистически значимо различалась между группами больных БА и ХОБЛ ( $p = 0,006$ ).

При глубинном анализе таксономического состава микробиоты в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА определены наиболее представленные роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от всего микробиотического состава по всем образцам. Так, в число наиболее представленных микроорганизмов со значением 10% и более в структуре идентифицированного микробиотического генома в образцах больных ХОБЛ и пациентов с БА вошли роды *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*. Среди преобладающих микроорганизмов, составляющих 2–10% микробиоты, в образцах больных ХОБЛ следует выделить роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Porphyromonas*, а в образцах пациентов с БА – роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Actinobacillus*.

Для выявления значимых трендов в изменении состава орофарингеальной микробиоты на уровне родов и отделов под влиянием клинко-анамнестических факторов, таких как количество эпизодов применения системных кортикостероидов, использован метод обобщенных линейных моделей.

Влияние эпизодов приема СКС больными БА и ХОБЛ по сравнению с пациентами без анамнеза курсового приема глюкокортикостероидов на протяжении предшествующих 12 мес нашло отражение в снижении содержания в орофарингеальных мазках представителей родов *Streptococcus* (КНП =  $-0,091$ ;  $p = 0,005$ ) (рис. 1) и *Haemophilus* (КНП =  $-0,333$ ;  $p = 0,006$ ) (рис. 2), а также в увеличении представленности микроорганизмов отдела *Bacteroidetes* (КНП =  $0,091$ ;  $p = 0,0087$ ) (рис. 3) и рода *Prevotella* (КНП =  $0,176$ ;  $p = 0,005$ ) (рис. 4).

Несмотря на более высокую обсемененность представителями отдела *Bacteroidetes* образцов больных с анамнезом курсового приема СКС (в течение года до включения в исследование) по сравнению с пациентами без анамнеза применения СКС, по мере увеличения частоты приема глюкокортикостероидов намечался тренд к снижению содержания данных микроорганизмов в образцах (см. рис. 3).

Схожая закономерность наблюдается и на рис. 4, отражающем динамику содержания бактерий рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 мес.

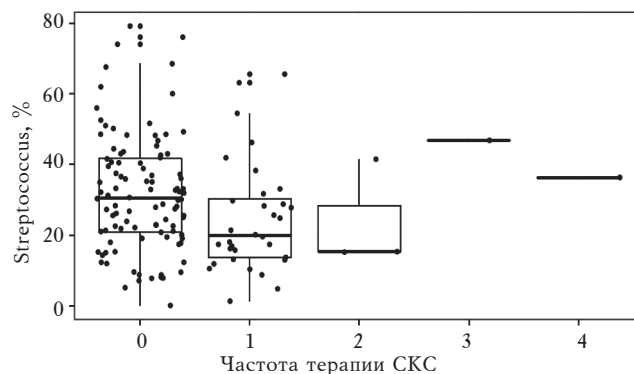


Рис. 1. Представленность рода *Streptococcus* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 мес

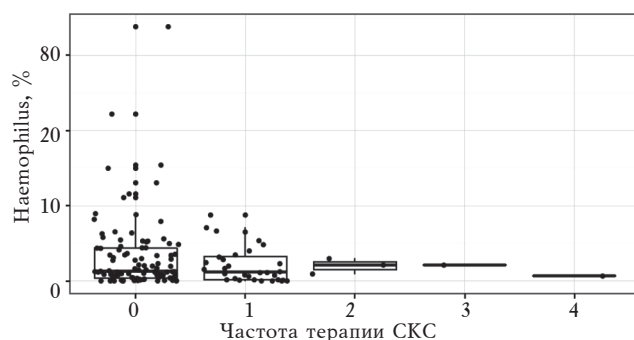


Рис. 2. Представленность рода *Haemophilus* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 мес

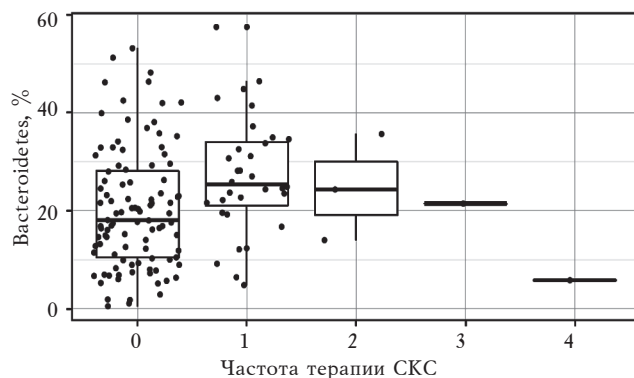


Рис. 3. Представленность отдела *Bacteroidetes* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 мес

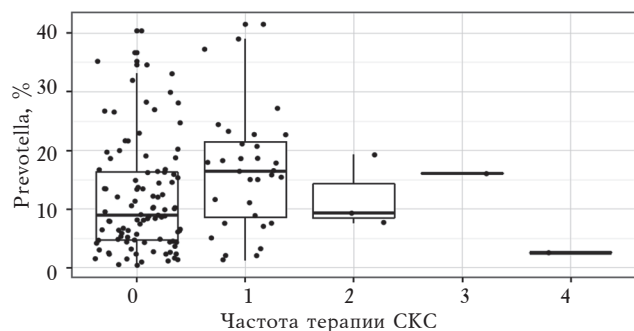


Рис. 4. Представленность рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 мес

Возможно, при включении в исследование большего количества пациентов с частыми обострениями и ассоциированными с ними эпизодами курсового применения СКС выявленный тренд был бы более значимым. Однако на протяжении предшествующего года подавляющее большинство скринированных в данной работе пациентов не применяло СКС ( $n = 101$ ), а 30 больным потребовался один курс приема глюкокортикостероидов в течение 12 мес. Небольшому количеству пациентов с наиболее тяжелым течением заболевания и частыми эпизодами обострения потребовалось два (три больных тяжелой неконтролируемой БА и один пациент с ХОБЛ тяжелого течения), три (два пациента с тяжелой неконтролируемой БА) и четыре (один больной тяжелой неконтролируемой БА) курсовых приема преднизолона.

Следует отметить, что исключение из ассоциативной статистической обработки больных БА не привело к изменению выявленных трендов во взаимосвязи степени представленности указанных выше бактерий в структуре орофарингеальных метагеномов в изолированной группе пациентов с ХОБЛ и влияния терапии СКС (таблица).

Т а б л и ц а

| Особенности количественного состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ ( $n = 88$ ) в зависимости от частоты курсовой терапии СКС за предшествующие 12 мес |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| Показатель                                                                                                                                                       | КНП   | $p$   |
| Род <i>Streptococcus</i>                                                                                                                                         | -0,09 | 0,005 |
| Род <i>Haemophilus</i>                                                                                                                                           | -0,33 | 0,006 |
| Род <i>Porphyromonas</i>                                                                                                                                         | -0,35 | 0,01  |
| Тип <i>Bacteroidetes</i>                                                                                                                                         | 0,09  | 0,01  |
| Род <i>Prevotella</i>                                                                                                                                            | 0,18  | 0,005 |

П р и м е ч а н и е. Чем выше значение КНП по модулю, тем сильнее выявленное влияние (значительнее различие); представлены значения  $p$  с поправкой на множественное сравнение по формуле Бонферрони.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Новые данные в рамках ассоциативного анализа представленности различных микроорганизмов в орофарингеальной микробиоте больных БА и ХОБЛ и анамнеза фармакотерапии свидетельствуют о том, что использование СКС, назначенных в период обострения заболевания, модифицирует состав респираторного микробиома в стабильный период. Влияние частоты эпизодов приема СКС, назначенных по поводу обострения у больных БА и ХОБЛ, нашло отражение в снижении содержания в орофарингеальных мазках таких родов протеобактерий, включающих патогенные микроорганизмы, как *Streptococcus* и *Haemophilus*.

Важным является достоверный тренд к увеличению доли микроорганизмов типа *Bacteroidetes* и представляющих его бактерий рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках у больных БА и ХОБЛ, использовавших СКС при обострениях, в отличие от образцов пациентов, не применявших СКС на протяжении предшествующего года. Установлено, что по мере увеличения количества эпизодов приема СКС, свидетельствовавших о большей частоте обострений, наблюдалось уменьшение содержания *Bacteroidetes* в мазках, однако оно по-прежнему оставалось статистически более высоким, чем в образцах пациентов, не применявших СКС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные о положительном модифицирующем влиянии СКС, назначенных при обострении БА и ХОБЛ, на состав респираторной микробиоты, проявляющемся в увеличении в стабильный период заболевания орофарингеальной представленности непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* и снижением бактериальной обсемененности представителями типа *Proteobacteria*, включающего условно патогенные и патогенные микроорганизмы, могут быть использованы в качестве дополнительного обоснования целесообразности назначения глюкокортикостероидов при обострении БА и ХОБЛ.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (ГК № 14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Данное исследование одобрено локальным комитетом по этике Сибирского государственного медицинского университета (№ 1927 от 28.03.2011).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // *Global Initiative for Asthma*. 2016. Vol. 2016. URL: [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2016.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2016.pdf);

2. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource] // *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. 2016. Vol. 2016. URL: [http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD\\_Report\\_2015\\_Apr2.pdf](http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2015_Apr2.pdf)
3. Monso E., Ruiz J., Tosell A. et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease: a study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 1316–1320.
4. Огородова Л.М., Федосенко С.В., Попенко А.С. и др. Сравнительный анализ орофарингеальной микрофлоры у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой различной степени тяжести // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 6: 669–678.
5. Beck J.M., Young V.B., Huffnagle G.B. The microbiome of the lung // *Transl. Res.* 2012; 160 (4): 258–266.
6. Hilty M., Burke C., Pedro H. et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways // *PLoS One*. 2010; 5 (1): e8578.
7. Huang Y.J., Sethi S., Murphy T. et al. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52 (8): 2813–2823. doi: 10.1128/JCM.00035-14.
8. Evensen A.E. Management of COPD exacerbations // *Am. Fam. Physician*. 2010. 81 (5): 607–613.

Поступила в редакцию 21.10.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Федосенко Сергей Вячеславович**, д-р мед. наук, ассистент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, г. Томск.

**Карнаушкина Мария Александровна**, канд. мед. наук, ассистент кафедры госпитальной терапии № 2, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва.

**Огородова Людмила Михайловна**, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск.

**Петров Вячеслав Алексеевич**, мл. науч. сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, СибГМУ, г. Томск.

**Деев Иван Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск.

**Куликов Евгений Сергеевич**, д-р мед. наук, доцент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, г. Томск.

**Сазонов Алексей Эдуардович**, д-р мед. наук, зам. проректора по научной политике и организации научных исследований, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

(✉) Федосенко Сергей Вячеславович, e-mail: s-fedosenko@mail.ru

УДК 616.23/.24-002.2+616.248]-036.65:615.357:616.2-008.87

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-159-165

For citation: Fedosenko S.V., Karnaushkina M.A., Ogorodova L.M., Petrov V.A., Deev I.A., Kulikov E.S., Sazonov A.E. Effect of systemic glucocorticosteroids in the management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease exacerbation on respiratory microbiota composition in the period of stability. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 159–165

## Effect of systemic glucocorticosteroids in the management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease exacerbation on respiratory microbiota composition in the period of stability

Fedosenko S.V.<sup>1</sup>, Karnaushkina M.A.<sup>2</sup>, Ogorodova L.M.<sup>1</sup>, Petrov V.A.<sup>1</sup>, Deev I.A.<sup>1</sup>, Kulikov E.S.<sup>1</sup>, Sazonov A.E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>2</sup> *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
8/2, Str. Trubetskaya, 119991, Moscow, Russian Federation*

<sup>3</sup> *M.V. Lomonosov Moscow State University  
1, Leninskiye Gory, 119991, Moscow, Russian Federation*

## ABSTRACT

**The purpose of this study is to** evaluate the ability of systemic glucocorticosteroids administered during the exacerbation of the disease to have a modifying effect on the qualitative and quantitative composition of the oropharyngeal microbiota.

**Material and methods.** The study included 88 patients with COPD and 50 patients with stable asthma. The patients have had a history of observation for twelve months or more; they are characterized by the absence of exacerbations and systemic antibiotic therapy for four weeks or more prior to inclusion in the study. Also, all patients participating in the study were taken samples of oropharyngeal microbiota for isolating bacterial DNA and sequencing 16S rRNA gene sequences followed by the analysis of the taxonomic composition of the microbiota. Generalized linear model implemented in the R programming language version 3.1.0, glm2 package was used to identify the relationship between taxonomic composition of metagenomes and metadata.

**Results.** The study suggests that the use of systemic glucocorticosteroids administered during the exacerbation of asthma and COPD modifies the composition of the respiratory microbiome in the period of stability increasing the oropharyngeal representation of non-pathogenic bacteria such as *Bacteroidetes* (including members of the genus *Prevotella*) and reducing bacterial contamination of oropharyngeal swabs by proteobacteria especially *Streptococcus*, and *Haemophilus*, which includes pathogens.

**Key words:** bronchial asthma, COPD, systemic glucocorticosteroids, oropharyngeal microbiota, exacerbation.

## REFERENCES

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // *Global Initiative for Asthma*. 2016. Vol. 2016. URL : [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2016.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2016.pdf);
2. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource] // *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. 2016. Vol. 2016. URL: [http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD\\_Report\\_2015\\_Apr2.pdf](http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2015_Apr2.pdf)
3. Monso E., Ruiz J., Tosell A. et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease: a study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1995; 152: 1316–1320.
4. Ogorodova L.M., Fedosenko S.V., Popenko A.S. et al. Sravnitelnyi analiz orofaringealnoi mikrobioty u bolnykh khronicheskoi obstruktivnoi boleznyuy legkikh i bronkhialnoi astmoi razlichnoi stepeni tyazhesti [Comparative analysis of the oropharyngeal microbiota in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma of varying severity] // *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences – Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2015; 6: 669–678 (in Russian).
5. Beck J.M., Young V.B., Huffnagle G.B. The microbiome of the lung // *Transl. Res*. 2012; 160 (4): 258–266.
6. Hilty M., Burke C., Pedro H. et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways // *PLoS One*. 2010; 5 (1): e8578.
7. Huang Y.J., Sethi S., Murphy T. et al. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // *J. Clin. Microbiol*. 2014
8. Evensen A.E. Management of COPD exacerbations // *Am. Fam. Physician*. 2010; 81 (5): 607–613.

Received October 21.2016

Accepted December 01.2016

**Fedosenko Sergey V.**, DM, Teaching Assistant of Department of General Medical Practice, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Karnaushkina Mariay A.**, PhD, Teaching Assistant of Department Hospital Therapy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

**Ogorodova Ludmila M.**, DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Faculty Pediatrics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Petrov Vyacheslav A.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Deev Ivan A.**, DM., Professor of Department of Faculty Pediatrics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kulikov Evgeny S.**, DM, Associate Professor of Department of Division of General Medical Practice, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Sazonov Alexey E.**, MD, Deputy Vice-rector, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

(✉) **Fedosenko Sergey V.**, e-mail: [s-fedosenko@mail.ru](mailto:s-fedosenko@mail.ru)

УДК 616.23/.24-002.2+616.248]-036.65:615.357:616.2-008.87

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-166-177

Для цитирования: Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Филинчук О.В., Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 166–177

## Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких

Чурина Е.Г.<sup>1,2</sup>, Уразова О.И.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1</sup>, Есимова И.Е.<sup>1</sup>, Кононова Т.Е.<sup>1</sup>,  
Филинчук О.В.<sup>1</sup>, Колобовникова Ю.В.<sup>1</sup>, Дмитриева А.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

### РЕЗЮМЕ

В статье представлен обзор научных исследований, раскрывающих механизмы неэффективной реализации антигенспецифического иммунного ответа при туберкулезе легких в зависимости от клинической формы (инфильтративный и диссеминированный туберкулез легких) и варианта течения (лекарственно-чувствительный и лекарственно-устойчивый туберкулез легких) заболевания. Установлено, что механизмы иммунного дисбаланса при туберкулезе легких связаны с нарушением костимуляции сигналов, необходимых для активации Т-лимфоцитов, и иммуносупрессорным действием регуляторных Т-клеток как при их взаимодействии с дендритными клетками на индуктивной стадии иммунного ответа, так и в процессе дифференцировки и пролиферации эффекторных клеток с формированием супрессорного режима иммунорегуляции.

**Ключевые слова:** туберкулез легких, иммунный ответ, регуляторные Т-клетки, иммунорегуляция.

### ВВЕДЕНИЕ

Патологическое течение противоинфекционного иммунного ответа и клиническая манифестация инфекционного заболевания возникают при нарушениях иммунологической реактивности организма. В случае адекватного взаимодополняющего функционирования систем врожденного и адаптивного иммунитета, напротив, происходит своевременное уничтожение любого инфекционного антигена (вне зависимости от пути его проникновения в макроорганизм) на уровне «первой линии защиты», как правило, в системе мукозального иммунитета, то есть иммунитета слизистых оболочек. При инфицировании чело-

века *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) развитие и прогрессирующее течение туберкулеза легких (ТЛ) практически всегда связано с наличием у пациента вторичной иммунологической недостаточности [1–3]. С другой стороны, в основе любого иммунопатологического процесса лежит первичная активация иммунных реакций, однако в случае туберкулезного воспаления она носит кратковременный и неэффективный характер и не приводит к полноценной реализации многостадийного иммунного ответа с образованием специфических к антигену клеток памяти. Установлено, что механизм иммунного дисбаланса при туберкулезной инфекции связан, прежде всего, с поляризацией иммунного ответа в направлении Treg- и Th2-зависимых путей [4–6]. В свою очередь, избыточное количество регуляторных

✉ Чурина Елена Георгиевна, e-mail: Lena1236@yandex.ru

Т-клеток (Treg) при ТЛ может быть опосредовано нарушением процесса презентации антигена, в частности, активацией толерогенных (индуцирующих иммунологическую толерантность) дендритных клеток на стадии инициации иммунного ответа [7, 8].

### Толерогенные дендритные клетки: особенности цитокинового профиля и роль в нарушении инициации Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезе легких

Презентация антигена является ключевым этапом иммунного ответа. Нарушение представления антигена лежит в основе неадекватного иммунного ответа против инфекционного патогена, в том числе МБТ. В числе основных антигенпрезентирующих клеток на сегодняшний момент рассматриваются дендритные клетки (ДК), которые определяют не только направленность дифференцировки Т-лимфоцитов, но и интенсивность и продолжительность иммунного ответа, тем самым являясь своего рода его «дирижерами».

При контакте с патогеном ДК связываются с его патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (РАМР). Это взаимодействие осуществляется, в том числе, через экспрессированные на ДК рецепторы семейства toll-подобных рецепторов (toll-like receptors – TLRs). В отношении МБТ таким рецептором является TLR типа 2 (TLR2). В результате контакта TLR2 с РАМР микобактерий в ДК запускается процесс трансдукции сигнала активации клетки через систему адаптерных молекул и транскрипционных факторов, в частности ядерного транскрипционного фактора NF-κB, что приводит к транскрипции генов-мишеней (генов главного комплекса гистосовместимости МНС (Major Histocompatibility Complex), или HLA (Human Leukocytes Antigens)), молекул костимуляции семейства B7, секретируемых ДК провоспалительных цитокинов – интерлейкинов (IL): IL-12, IL-18, IL-27.

После взаимодействия с возбудителем функционально и фенотипически зрелые ДК экспрессируют молекулы гистосовместимости МНС, или HLA, в комплексе с микробными пептидами, которые презентуются наивным Т-лимфоцитам и распознаются их Т-клеточным рецептором (TCR). Для передачи Т-лимфоцитам адекватной информации об антигене важную роль играют экспрессируемые на зрелых ДК поверхностные молекулы костимуляции семейства B7 (CD80 и CD86), которые связываются со своими лигандами (CD28) на наивных Т-лимфоцитах-хелперах

(Th0). Это служит сигналом к дифференцировке Th0 в Т-хелперы типа 1 (Th1) и их пролиферации с формированием клона антигенспецифических Т-клеток-эффекторов. Кроме того, активированные ДК продуцируют и секретируют цитокины, направляющие дифференцировку наивных Th0 в надлежащем направлении, то есть в Th1-клетки, и активацию последних (рис. 1).

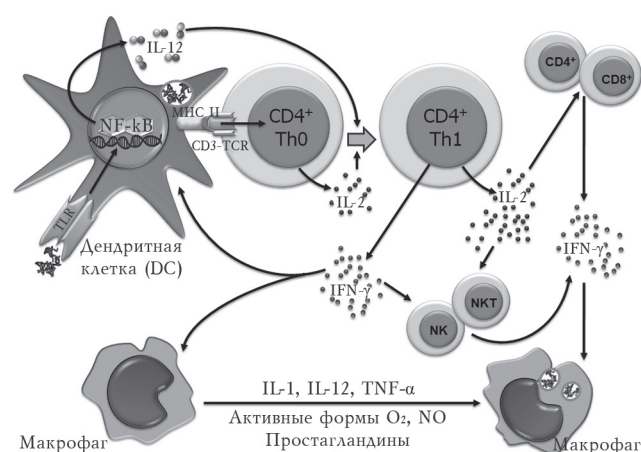


Рис. 1. Клетки-участники иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*: CD (cluster of differentiation) – кластеры дифференцировки клеток; CD8+ – субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов; IFN (interferon) – интерферон; Foxp3 – транскрипционный фактор для дифференцировки регуляторных Т-клеток; NK (natural killers) – натуральные киллеры; TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухолей (здесь и на рис. 2, 3)

На сегодняшний день одним из перспективных способов получения ДК является трансформация выделенных из периферической крови моноцитов в процессе их культивирования *in vitro* с добавлением ростовых факторов (IL-4, колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF)) и липополисахарида (ЛПС). Данный методический подход активно применяется для исследования дендритных клеток при физиологических и патологических процессах.

В ходе проведенного комплекса научных исследований, направленных на изучение особенностей иммунопатогенеза ТЛ, было установлено, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы (инфильтративный – ИТЛ, диссеминированный – ДТЛ) и варианта (лекарственно-чувствительный – ЛЧТЛ, лекарственно-устойчивый – ЛУТЛ) заболевания количество ДК, экспрессирующих молекулу CD209 (маркер зрелых миелиодных дендритных клеток), полученных из моноцитов крови в процессе их трансформации, оказалось выше, чем в группе здоровых доноров в 1,7 раза. Однако дальнейшее исследование их

иммунофенотипа показало нарушение экспрессии на ДК ряда молекул, важных для инициации иммунного ответа. Так, например, при анализе экспрессии TLR2 на ДК было выявлено снижение числа клеток TLR2<sup>+</sup> у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы и варианта заболевания в среднем в 2,5 раза по сравнению с нормой (то есть у здоровых добровольцев) [9, 10]. Предположительно, это может быть связано с «шеддингом» – сбрасыванием рецепторов данного типа в результате действия МБТ. Возможно, что оно происходит уже на уровне моноцитов и сохраняется при последующей трансформации их в ДК [11, 12]. Установлено, что CD209 является не только маркером ДК, но также играет важную роль в распознавании и захвате *M. tuberculosis*. Однако (в отличие от TLR2) CD209-опосредованный сигнал, поступая в клетку, не активирует, а напротив, ингибирует процессы созревания ДК, то есть является конкурентным по отношению к TLR2-зависимой активации клеток сигналом [13, 14].

Ранее было показано, что у больных ТЛ количество клеток, экспрессирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса – HLA-DR, было выше, чем у здоровых лиц, и составляло 93,60 (91,20–97,60)%, что позволяет сделать предположение об отсутствии нарушений со стороны презентирющей функции ДК. Наряду с этим выявлено, что у больных ТЛ резко пониженной (в 1,7 раза относительно нормы) является экспрессия на ДК молекул костимуляции CD80 и CD86, являющихся маркером зрелых иммуногенных (CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) ДК. Это позволило сделать предположение, что при ТЛ имеет место дефицит иммуногенных, то есть запускающих иммунный ответ, ДК [9, 10].

Известно, что отсутствие костимуляторного сигнала в ходе образования «иммунного синапса» между ДК и Т-лимфоцитами посредством молекул CD80 и CD86 (на ДК) и CD28 (на Т-клетках) приводит к подавлению дифференцировки и пролиферации Т-лимфоцитов, супрессии уже активированных Т-лимфоцитов и их гибели [7].

Что касается толерогенных ДК, экспрессирующих только одну из молекул костимуляции, в частности CD80, в отсутствие CD86 (то есть CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>), то у больных ТЛ их количество было в среднем по группе в 2,7 раза выше, чем у здоровых доноров. Выявлено, что молекула CD80 имеет высокое сродство к антигену CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, или CD152), экспрессируемому регуляторными Т-клетками с

иммуносупрессорной активностью, индуцирующих состояние иммунологической толерантности [5, 15, 16].

В процессе созревания ДК начинают секретировать провоспалительные цитокины, в число которых входят, в частности, IL-12, IL-18, IL-27. Продукция цитокинов и других «инструктирующих Т-хелперы» факторов является наиболее важным из TLR2-регулируемых сигналов, позволяющих ДК индуцировать Th1-клеточный иммунный ответ с генерацией Т-клеток-эффекторов [7, 17].

В ряде предыдущих работ установлено, что концентрация IL-12 (в частности его биологически активного гетеродимера IL-12p70, состоящего из двух субъединиц p35 и p40) в супернатантах культуральных суспензий зрелых ДК была повышенной (в среднем по группе больных ТЛ в 1,6 раза по отношению к группе здоровых добровольцев). Однако исключение составили группы больных с инфильтративным и лекарственно-устойчивым ТЛ, у которых данный показатель был, напротив, ниже нормы (12,50 (8,67–13,70) и 9,38 (6,73–10,32) пг/мл соответственно) [18, 19].

С одной стороны, повышение секреции IL-12 является благоприятным фактором при туберкулезной инфекции, поскольку преобладающие в этой ситуации позитивные эффекты IL-12, связанные с активацией Т-лимфоцитов, в последующем способствуют элиминации внутриклеточного патогена [20]. Вместе с тем у больных ТЛ наряду с гиперсекрецией гетеродимера IL-12p70 регистрировалось повышение продукции его гомодимера – IL-12p40, связывание которого с комплементарным цитокиновым рецептором на Т-лимфоцитах блокирует данный рецептор и препятствует передаче сигнала активации внутрь клетки [21, 22].

Что касается других цитокинов, секретируемых ДК, то у больных ТЛ выявлялись разнонаправленные изменения продукции IL-18 (в зависимости от клинической формы заболевания) в условиях гипопродукции IL-27 (в среднем в 2,5 раза по сравнению с нормой). Известно, что IL-27 способствует клональной экспансии CD4<sup>+</sup> наивных Т-клеток, усиливает действие IL-12 на Т-клетки [23, 24].

Таким образом, у больных ТЛ дефицит активированных иммуногенных CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> ДК и секреции IL-27 в условиях гиперпродукции иммуносупрессорного гомодимера IL-12p40 и увеличения количества толерогенных CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup> ДК позволяет сделать предположение о нарушении механизмов инициации Т-клеточного иммунного

ответа, опосредованном дисбалансом субпопуляций ДК и снижением их функциональной активности (рис. 2).

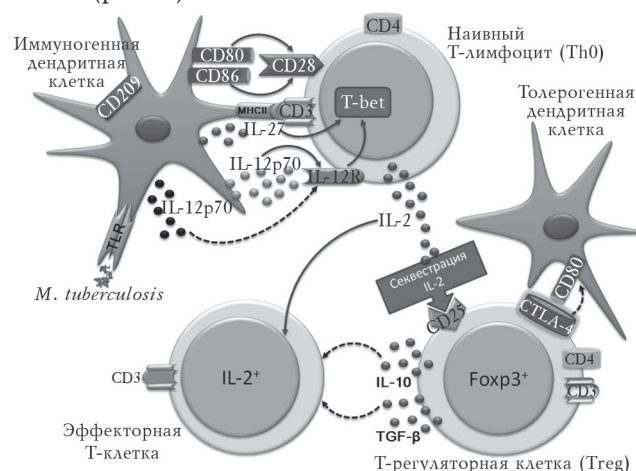


Рис. 2. Нарушения механизмов инициации Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезе легких. Здесь и в рис. 3: — — — — — стимулирующий эффект; - - - - - ингибирующий эффект

### Нарушение IL-12-зависимой активации Th1-лимфоцитов при туберкулезе легких

Необходимо отметить, что Th1-активирующее действие IL-27 связано, в первую очередь, с индукцией под его влиянием экспрессии  $\beta 2$ -субъединицы рецептора к IL-12 (IL-12R $\beta_2$ ) на Т-клетках [21, 24]. Дефицит секреции IL-27, несомненно, оказывает негативное влияние на формирование полноценного рецептора к IL-12 на Т-лимфоцитах и активацию клеток. Тем не менее результаты проведенных исследований позволили установить нарушения внутриклеточной передачи активационного сигнала в Т-клетках, не связанные с изменениями продукции Th1-ассоциированных цитокинов при ТЛ. Так, при специфической IL-12/IL-27-индукции лимфоцитов *in vitro* у больных ТЛ (независимо от клинической формы заболевания) регистрировалось снижение количества клеток, экспрессирующих  $\beta 2$ -субъединицу рецептора к IL-12 (в 1,8 раза при ЛЧТЛ и в 2,1 раза при ЛУТЛ по сравнению с показателями в группе здоровых добровольцев) [23]. Вместе с тем у больных ТЛ отмечалось нарушение количественного соотношения Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы gp130 и WSX-1, в комплексе составляющих активный рецептор к IL-27. Это проявлялось в уменьшении числа лимфоцитов CD3<sup>+</sup>gp130<sup>+</sup> (в среднем в 1,6 раза) на фоне повышенного (в 2,1 раза) содержания Т-клеток с высокой экспрессией молекулы WSX-1 (CD3<sup>+</sup>WSX-1<sup>hi</sup>), которая, как известно, в случае ее гиперэкспрессии на клетках

опосредует не активацию, а подавление Т-клеточной пролиферации [21, 25]. При этом у больных ТЛ отмечалось снижение числа Т-лимфоцитов, содержащих активные формы транскрипционных факторов T-bet, STAT1, STAT4 и тирозиновых киназ Jak1, Jak2, Tyk2, участвующих во внутриклеточной трансдукции (проведении) сигналов активации Т-клеток, опосредованной цитокинами семейства IL-12 [1, 26].

Таким образом, выявленное снижение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих gp130-субъединицу рецептора к IL-27, на фоне гипопродукции самого цитокина и высокой экспрессии на Т-клетках ингибиторной молекулы WSX-1 может являться причиной снижения активности тирозиновых киназ Jak1, Jak2 и транскрипционных факторов STAT1, T-bet, что способствует уменьшению экспрессии IL-12R $\beta_2$ . Низкая экспрессия IL-12R $\beta_2$  на Т-лимфоцитах в сочетании с высокой секрецией супрессорного гомодимера IL-12p40 ДК у больных ТЛ, очевидно, нивелирует активационные эффекты IL-12p70. Это приводит к еще большему снижению активности указанных тирозиновых киназ, а также киназы Tyk2, и, следовательно, к дефициту в клетках активируемых ими транскрипционных факторов STAT1, STAT4, T-bet и нарушению IL-12-опосредованной активации Th1-лимфоцитов в целом (рис. 3).

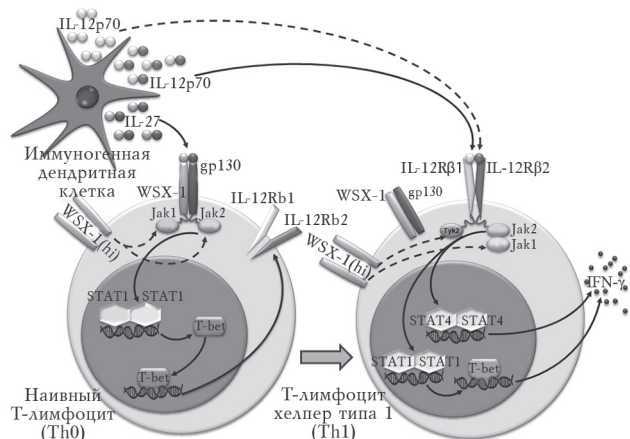


Рис. 3. Нарушения IL-12-опосредованной активации Th1-лимфоцитов при туберкулезе легких

### Клеточные и молекулярные механизмы формирования иммуносупрессии при туберкулезе легких

Наряду с нарушением механизмов презентации антигена и сигнальной трансдукции при туберкулезной инфекции продемонстрировано увеличение численности различных субпопуляций Treg и их функциональной активности у больных ТЛ.

Так, выявленное увеличение числа  $CD3^+CTLA4^+$  клеток при  $CD3/CD28$ -индукции Т-лимфоцитов *in vitro* свидетельствует об усилении супрессорной активности Тreg. Механизм супрессии Th1-ответа посредством CTLA4 определенно вносит свой вклад в развитие иммунологической толерантности при ЛУТЛ, при котором отмечалось более выраженное увеличение числа  $CD3^+CTLA4^+$  лимфоцитов. В данном случае мы можем судить о толерантности Т-клеток, индуцированной MBT, устойчивыми к противотуберкулезным средствам (ПТС), то есть с определенными биологическими свойствами, которые способствуют генерации Тreg на периферии [1, 27–29]. Косвенным доказательством этому может служить выявленная отрицательная взаимосвязь между общим содержанием  $CD3^+$  Т-лимфоцитов и количеством Т-клеток, имеющих фенотипы  $CD3^+CTLA4^+$  и  $CD3^+CD28IL-2$ , при лекарственно-устойчивом варианте ИТЛ ( $r = -0,68$ ;  $p = 0,0042$  и  $r = -0,56$ ;  $p = 0,0156$  соответственно) и ДТЛ ( $r = -0,81$ ;  $p = 0,011$  и  $r = -0,57$ ;  $p = 0,019$  соответственно). Кроме негативного активатора сигнальной трансдукции CTLA4, супрессорную активность регуляторных Т-клеток связывают с экспрессией внутриклеточного транскрипционного фактора  $Foxp3^+$  [30–33]. Результаты исследований показали, что количество  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Тreg-лимфоцитов в крови у больных ИТЛ и ДТЛ вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя в острую фазу заболевания возрастало относительно такового у здоровых добровольцев [1, 5].

Возможно, что выявленные изменения способствуют формированию супрессии Th1-зависимого иммунного ответа с целью предотвращения развития гиперергических иммунных реакций и повреждения ткани легких. Однако в конечном итоге эта, в определенной степени компенсаторная реакция, связанная с усиленной пролиферацией и дифференцировкой Тreg, приводит к негативным последствиям в виде ослабления эффективности протективного иммунного ответа, способствуя утяжелению клинического течения туберкулезной инфекции [5, 34, 35]. Очевидно, что повышение численности  $CD3^+CTLA4^+$  и  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Тreg в крови у больных ТЛ является прогностически неблагоприятным фактором. Известно, что одним из путей реализации эффекта Тreg считается тройное контактное взаимодействие (см. рис. 2), в которое, наряду с Тreg и клетками-мишенями, вовлекаются толерогенные ДК. Численность последних у больных ТЛ, по данным исследования, была значительно выше, чем у здоровых лиц. Возможно, Тreg препятству-

ют формированию иммунного синапса между толерогенной ДК и Т-клеткой. Как упоминалось выше, в основе этого механизма лежит конкурентное взаимодействие негативного активатора сигнальной трансдукции CTLA-4 с костимулирующими молекулами В7 (главным образом, CD80) на поверхности ДК, способствующее формированию Т-клеточной анергии [36–38]. Таким образом, возрастающее количество Тreg с иммунофенотипами  $CD3^+CTLA4^+$  и  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  практически при всех клинических формах и вариантах течения ТЛ позволяет предположить, что именно они осуществляют главную иммуносупрессорную функцию при туберкулезной инфекции [5, 6].

Отмечено, что кроме увеличения численности Тreg при ТЛ повышается и их функциональная активность. Наряду с механизмом тройного контактного взаимодействия регуляторные Т-клетки осуществляют свои иммуносупрессорные функции путем секреции цитокинов-ингибиторов иммунного ответа и активации апоптоза Т-лимфоцитов [30, 39].

Известно, что апоптоз и пролиферация иммунокомпетентных клеток обеспечивают поддержание иммунологического гомеостаза в организме и в норме протекают с приблизительно одинаковой интенсивностью. Как следует из полученных результатов, количество апоптотических и пролиферирующих клеток у больных с ЛЧТЛ не отличалось от соответствующих показателей в группе здоровых доноров. Выявлен тот факт, что у пациентов с лекарственной резистентностью MBT к ПТС, напротив, обнаруживалось более значительное (на 40–50%) увеличение количества апоптотических клеток; доля пролиферирующих клеток при этом снижалась [40].

Активацию апоптоза лимфоцитов на фоне угнетения их пролиферативной активности у больных ЛУТЛ (особенно выраженную при ДТЛ) можно связать со способностью лекарственно-резистентных MBT стимулировать апоптоз иммунокомпетентных клеток, а также с активацией и индукцией Тreg [27, 40, 41]. Немаловажным является и то обстоятельство, что иммуносупрессорные эффекты Тreg и лекарственно-устойчивых штаммов MBT являются однонаправленными в аспекте активации апоптоза и угнетения пролиферации лимфоцитов. В подтверждение этому анализ взаимосвязей между количеством  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  регуляторных Т-клеток и показателями пролиферации и апоптоза лимфоцитов крови у больных ТЛ установил наличие отрицательной корреляции между численностью Тreg и пролиферирующих лимфоцитов ( $r = -0,68$ ;

$p < 0,05$ ) и положительной корреляции между количеством Treg и лимфоцитов в состоянии апоптоза ( $r = 0,68$ ;  $p < 0,05$ ).

На основании результатов анализа секреции цитокинов *in vitro*, ассоциированных с Treg и обладающих иммуносупрессорной активностью, можно заключить, что у больных ТЛ имеют место разнонаправленные изменения их секреции в зависимости от клинической формы заболевания: при ДТЛ отмечается гиперпродукция IL-4 и TGF- $\beta$  на фоне дефицита секреции IL-10; при ИТЛ – повышение продукции IL-10 на фоне гипосекреции IL-4 и TGF- $\beta$ . При этом выраженность регистрируемых изменений ассоциируется с лекарственной устойчивостью возбудителя ТЛ к ПТС [1].

Известно, что активированные Treg-клетки сами по себе анергичны: *in vitro* они слабо пролиферируют и практически не секретируют цитокины, и лишь IL-10 и TGF- $\beta$  секретируются Treg-клетками в значительных количествах [39, 42–44]. Данный факт подтверждается установленной у больных ТЛ положительной корреляцией между секрецией *in vitro* TGF- $\beta$  и количеством в крови регуляторных Т-клеток с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ( $r = 0,90$ ;  $p < 0,01$ ).

### Роль Th17-лимфоцитов в реализации эффекторной фазы иммунного ответа при туберкулезе легких

В процессе реализации антигенспецифического адаптивного иммунного ответа, направленного на элиминацию инфекционных антигенов, Th1-лимфоциты работают в тандеме с Т-хелперами типа 17 (Th17), которые, в свою очередь, являются функциональными антагонистами регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью [45–51]. Имеются данные о важной роли Th17 в иммунопатогенезе инфекционных заболеваний с внутриклеточной локализацией возбудителя, в том числе ТЛ [52–56]. Исследования количества и функциональной активности Th17-лимфоцитов показали, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы (ИТЛ, ДТЛ) и варианта (ЛЧТЛ, ЛУТЛ) заболевания численность Т-клеток с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> (Th17) увеличивалась по сравнению с показателями у здоровых добровольцев. Что касается секреторной активности CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов, то продукция *in vitro* их ключевых цитокинов IL-17A и IL-22 у пациентов с ТЛ повышалась в 2,3 ( $p < 0,001$ ) и 2,7 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. При этом наиболее выраженное увеличение секреции IL-17A регистрировалось у

больных ДТЛ [57]. Обязательным фактором развития ДТЛ является гематогенное распространение инфекции. Вероятно, бактериемия вызывает более сильный ответ со стороны Th17-лимфоцитов, что и могло обуславливать более высокое значение показателя секреции IL-17A у пациентов с данной формой заболевания.

Таким образом, у больных ТЛ увеличение числа CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов, а также их функциональной активности (что подтверждает выявленная положительная взаимосвязь содержания CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов и секреции IL-17A ( $r = 0,413$ ;  $p = 0,029$ ) и IL-22 ( $r = 0,575$ ;  $p = 0,001$ ) при ТЛ) может рассматриваться как иммунная реакция, направленная на компенсацию функциональной недостаточности Th1-лимфоцитов. Происходящая под воздействием секретируемых медиаторов активация и привлечение в очаг воспаления нейтрофилов, макрофагов и Th1-лимфоцитов способствуют отграничению зоны повреждения в ткани легкого и элиминации *M. tuberculosis* [58–61].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя представленные данные (собственные и других авторов), можно сделать заключение, что при туберкулезной инфекции дисрегуляция иммунного ответа обусловлена патологическим течением как индуктивной, так и эффекторной фазы антигенспецифического ответа. С одной стороны, механизм указанных изменений связан с нарушением костимуляции сигналов, необходимых для полноценной активации Т-лимфоцитов. С другой, – формируются условия, благоприятные для реализации иммуносупрессорного действия регуляторных Т-клеток как при их взаимодействии с толерогенными ДК на индуктивной стадии иммунного ответа, так и в процессе дифференцировки и пролиферации эффекторных клеток с формированием супрессорного режима иммунорегуляции.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №11-04-98057-р\_сибирь\_а от 11.03.2011 г.) и Совета по грантам Президента РФ (НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7, НШ-7906.2016.7).

# ЛИТЕРАТУРА

1. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е. Вторичная иммунологическая недостаточность у больных туберкулезом легких. Иммунодиагностика и иммунотерапия. Томск: Печатная мануфактура, 2013: 84.
2. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Кононова Т.Е. Роль гамма-дельта-Т-клеток в иммунном ответе на *Mycobacterium tuberculosis* // *Туберкулез и болезни легких*. 2014; 3: 59–63.
3. Caramori G., Lasagna L., Casalini A.G. et al. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the parietal pleura of patients with tuberculous pleurisy // *PLoS One*. 2011; 6 (7): e22637.
4. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В. Регуляторные Т-клетки. Иммуносупрессорные эффекты при туберкулезе легких. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2012: 169.
5. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В. Регуляторные Т-клетки и противотуберкулезный иммунитет. Томск: Печатная мануфактура, 2014: 156.
6. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of foxp3-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis // *Tuberc. Res. Treat.* 2012; 2012. Article ID 931291. 9 pages.
7. Ярилин А.А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов // *Иммунология*. 2010; 31 (3): 152–166.
8. Yamazaki S., Morita A. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific natural and induced regulatory T-cells // *Front. Immunol.* 2013. Article ID 10.3389/fimmu. 2013. 00151. 13 pages.
9. Хаитова З.К., Уразова О.И., Воронкова О.В. и др. Особенности иммунофенотипа и цитокинсекреторной активности дендритных клеток у больных туберкулезом легких // *Фундаментальные исследования*. 2013; 9: 152–155.
10. Хаитова З.К., Уразова О.И., Хасанова Р.Р. и др. Особенности иммунофенотипа дендритных клеток и Т-лимфоцитов у больных туберкулезом легких // *Фундаментальные исследования*. 2012; 12: 386–390.
11. Хаитова З.К., Хасанова Р.Р., Воронкова О.В. и др. Роль дендритных клеток в противотуберкулезном иммунитете // *Российский иммунологический журнал*. 2012; 6 (2): 119–123.
12. Druszczyńska M., Włodarczyk M., Janiszewska-Drobinska B. et al. Monocyte signal transduction receptors in active and latent tuberculosis // *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013. Article ID 851452. 15 pages.
13. Balboa L., Romero M.M., Yokobori N. et al. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile // *Immunol. Cell Biol.* 2010; 88 (7): 716–726.
14. Geurtsen J., Chedammi S., Mesters J. et al. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation // *J. Immunol.* 2009; 183 (8): 5221–5231.
15. Chaudhry A., Rudensky A.Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T-cells // *J. Clin Invest.* 2013; 123 (3): 939–944.
16. Sallusto F., Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses // *Arthritis Research*. 2002; 4 (3): 127–132.
17. Oestreich K.J., Weinmann A.S. Transcriptional mechanisms that regulate T-helper 1 cell differentiation // *Curr Opin Immunol.* 2012; 24 (2): 191–195.
18. Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Воронкова О.В. и др. Продукция IL-12 $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови у больных туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* // *Иммунология*. 2013; 34 (2): 115–118.
19. Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Хаитова З.К. и др. Уровень продукции IL-12 $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами периферической крови в зависимости от клинической формы туберкулеза легких // *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 6: 218–220.
20. Кетлинский С.А. Роль гетеродимерных цитокинов семейства IL-12 в развитии и регуляции врожденного иммунитета и TH1 иммунного ответа // *Медицинский академический журнал*. 2005; 5 (3): 13–25.
21. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Издательство «Фолиант», 2008: 552.
22. Pompei L., Jang S., Zamylny B. et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs // *J. Immunol.* 2007; 178 (8): 5192–5199.
23. Писаренко М.С., Есимова И.Е., Новицкий В.В. и др. Нарушения IL-12/IL-27-зависимой активации Т-лимфоцитов при диссеминированном туберкулезе легких // *Туберкулез и болезни легких*. 2013; 11: 52–57.
24. Zhao Jingxian, Zhao Jincun, Perlman S. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T-cells: roles of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-2R // *PLoS One*. 2012; 7 (9): e46241. doi: 10.1371/journal.pone.0046241.
25. Villarino A., Hibbert L., Lieberman L. et al The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T-cell hyperactivity during infection // *Immunity*. 2003; 19 (5): 645–655.
26. Coskun M., Salem M., Pedersen J., Nielsen O.H. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Pharmacol Res*. 2013; 76: 1–8. doi: 10.1016/j.phrs.2013.06.007.
27. Сахно А.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю. и др. Роль PD-1/B7-H1-опосредованного пути в нарушении антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких // *Иммунология*. 2011; 2: 89–93.
28. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях // *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 4: 103–111.
29. Pinheiro R.O., de Oliveira E.B., Dos Santos G. et al. Different immunosuppressive mechanisms in multi-drug

- resistant tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria patients // *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 171 (2): 210–219.
30. Dhamne C., Chung Y., Alousi A.M. et al. Peripheral and thymic Foxp3(+) regulatory T-cells in search of origin, distinction and function // *Front. Immunol.* 2013; 4: 253.
  31. Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T-cells: mechanisms of differentiation and function // *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 531–564.
  32. Larson R.P., Shafiani S., Urdahl K.B. Foxp3(+) regulatory T-cells in tuberculosis // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 783: 165–180.
  33. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells in the human immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (7): 490–500.
  34. Semple P.L., Binder A.B., Davids M. et al. Regulatory T-cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 187 (11): 1249–1258.
  35. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T-cells work // *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8 (7): 523–532.
  36. Beyer M., Schultze J.L. Plasticity of T(reg) cells: is reprogramming of T(reg) cells possible in the presence of Foxp3? // *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11 (5): 555–560.
  37. Miyara M., Sakaguchi S. Human Foxp3(+)CD4(+) regulatory T-cells: their knowns and unknowns // *Immunol. Cell. Biol.* 2011; 89 (3): 346–351.
  38. Sakaguchi S., Vignali D.A., Rudensky A.Y. et al. The plasticity and stability of regulatory T-cells // *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13 (6): 461–467.
  39. Rudensky A.Y. Regulatory T-cells and Foxp3 // *Immunol. Rev.* 2011; 241 (1): 260–268.
  40. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* // *Медицинская иммунология.* 2012; 14 (1–2): 119–126.
  41. Сахно А.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В. и др. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // *Проблемы туберкулеза и болезней легких.* 2004; 5: 23–28.
  42. Lee D.C., Harker J.A., Tregoning J.S. et al. CD25<sup>+</sup> natural regulatory T-cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection // *J. Virol.* 2010; 84 (17): 8790–8798.
  43. Liu Y., Yu S., Li Z. et al. TGF- $\beta$  enhanced IL-21-induced differentiation of human IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T-cells via Smad3 // *PLoS One.* 2013; 8 (5): e64612. doi: 10.1371/journal.pone.0064612.
  44. Yadav M., Stephan S., Bluestone J.A. Peripherally induced Tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity // *Front. Immunol.* 2013; 4: 232.
  45. Кононова Т.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Чурина Е.Г. Опосредованная Т-лимфоцитами-хелперами типа 17 регуляция антибактериального (противотуберкулезного) иммунитета // *Молекулярная биология.* 2013; 47 (6): 883–890.
  46. Burgler S., Mantel P.Y., Bassin C. et al. RORC2 is involved in T-cell polarization through interaction with the Foxp3 promoter // *J. Immunol.* 2010; 184: 6161–6169.
  47. Eisenstein E.M., Williams C.B. The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity // *Pediatr Res.* 2009; 65: 26R–31R.
  48. Laurence A., Tato C.M., Davidson T.C. et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T-helper 17 cell generation // *Immunity.* 2007; 26: 371–381.
  49. Xu L., Kitani A., Fuss I., Strober W. Cutting edge: regulatory T-cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- $\beta$  // *J. Immunol.* 2007; 178 (11): 6725–6729.
  50. Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R. et al. T-helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR  $\alpha$  and ROR  $\gamma$  // *Immunity.* 2008; 28 (10): 29–39.
  51. Zheng S.G. Regulatory T-cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? // *Am. J. of Clin. Exp. Immunol.* 2013; 2 (1): 94–106.
  52. Khader S.A., Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens // *Virulence.* 2010; 1 (5): 423–427.
  53. McAleer J.P., Kolls J.K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense // *Immunol. Rev.* 2014; 260 (1): 129–144.
  54. Paidipally P., Periasamy S., Barnes P.F. et al. NKG2D-dependent IL-17 production by human T-cells in response to an intracellular pathogen // *J. Immunol.* 2009; 183 (3): 1940–1945.
  55. Scriba T.J., Kalsdorf B., Abrahams D.A. et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T-cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response // *J. Immunol.* 2008; 180 (3): 1962–1970.
  56. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease // *Immunol. Reviews.* 2008; 223: 87–113.
  57. Кононова Т.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В. и др. Функциональная активность Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013; 156 (12): 701–704.
  58. Awasthi A., Kuchroo V. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection // *Int. Immunol.* 2009; 21 (5): 489–498.
  59. Li L., Qiao D., Fu X. et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis – specific Th1, Th17 and Th22 cells using the expression of CD40L in tuberculous pleurisy // *PLoS One.* 2011; 6 (5): e20165. doi: 10.1371/journal.pone.0020165.
  60. Miossec P., Kolls J.K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2012; 11: 763–776.
  61. Yang J., Yang X., Zou H. et al. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T-cells as a treatment for systemic lupus erythematosus // *Rheumatology.* 2011; 50: 1366–1372.

Поступила в редакцию 30.09.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

**Чурина Елена Георгиевна**, д-р мед. наук, доцент кафедры патофизиологии СибГМУ, профессор кафедры органической химии НИ ТГУ, ведущий научный сотрудник лаборатории «Трансляционная клеточная и молекулярная биомедицина» НИ ТГУ, г. Томск.

**Новицкий Вячеслав Викторович**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки России, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

**Уразова Ольга Ивановна**, д-р мед. наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

**Есимова Ирина Евгеньевна**, канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

**Кононова Татьяна Евгеньевна**, канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

**Филинчук Ольга Владимировна**, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой фтизиатрии и пульмонологии СибГМУ, г. Томск.

**Колобовникова Юлия Владимировна**, д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

**Дмитриева Алла Ивановна**, д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, г. Томск.

(✉) Чурина Елена Георгиевна, e-mail: Lena1236@yandex.ru.

УДК 616.23/.24-002.2+616.248]-036.65:615.357:616.2-008.87

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-166-177

For citation: Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Yesimova I.Ye., Kononova T.Ye., Filinyuk O.V., Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I. The factors of imbalance of the immune response (at different stage it realization) at pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 166–177

## The factors of dysregulation of the immune response (at different stage of its implementation) in patients with pulmonary tuberculosis

Churina E.G.<sup>1,2</sup>, Urazova O.I.<sup>1</sup>, Novitskiy V.V.<sup>1</sup>, Yesimova I.Ye.<sup>1</sup>, Kononova T.Ye.<sup>1</sup>, Filinyuk O.V.<sup>1</sup>, Kolobovnikova Yu.V.<sup>1</sup>, Dmitrieva A.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University (NR TSU)

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

### ABSTRACT

The article provides an overview of scientific research to explain the mechanisms of inefficient implementation of antigen-specific immune response in patients with tuberculosis infection depending on the clinical form (infiltrative and disseminated pulmonary tuberculosis) and the course (drug-sensitive and drug-resistant pulmonary tuberculosis) of the disease. The mechanisms of immune imbalance in patients with pulmonary tuberculosis are associated with abnormal co-stimulation of a signal required for the activation of T-lymphocytes and immunosuppressive influence of regulatory T-cells both when they interact with dendritic cells at the inductive stage of the immune response, and in the process of differentiation and proliferation of effector cells with formation of suppressive mode of immune-regulation.

**Key words:** pulmonary tuberculosis, immune response, regulatory T-cells, immune-regulation.

### REFERENCES

1. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Esimova I.E. Vtorichnaya immunologicheskaya nedostatochnost' u bol'nykh tuberkulezom legkikh. *Immunodiagnostika i im-*

munoterapiya [Secondary immune deficiency in patients with pulmonary tuberculosis. Immunodiagnosics and immunotherapy]. Tomsk: Pechatnaya manufaktura Publ., 2013: 84 (in Russian).

2. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Kononova T.E. Rol' Gamma-Del'ta-T-kletok v immunnom otvete na *Mycobacterium tuberculosis* [Role of gamma delta T cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*] // *Tuberkulez i bolezni legkikh – Tuberculosis and Lung Diseases*. 2014; 3: 59–63 (in Russian).
3. Caramori G., Lasagna L., Casalini A.G. et al. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the parietal pleura of patients with tuberculous pleurisy // *PLoS One*. 2011; 6 (7): e22637.
4. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. Regulatornyye T-kletki. Immunosupressornyye efekty pri tuberkuleze legkikh [Regulatory T-cells. Immunosuppressive effects of pulmonary tuberculosis]. Saarbrücken, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012: 169 (in Russian).
5. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. Regulatornyye T-kletki i protivotuberkuleznyy immunitet [Regulatory T-cells and anti-TB immunity]. Tomsk: Pechatnaya manufaktura Publ., 2014: 156
6. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of foxp3-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis // *Tuberc. Res. Treat.* 2012; 2012. Article ID 931291: 9.
7. Yarin A.A. Transkriptsionnyye regulatory differentsirovki T-khelferov [Transcriptional regulators of differentiation of T-helper cells] // *Immunologiya – Immunology*. 2010; 31 (3): 152–166 (in Russian).
8. Yamazaki S., Morita A. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific natural and induced regulatory T cells // *Front. Immunol.* 2013. Article ID 10.3389 / fimmu. 2013. 00151: 13.
9. Khaitova Z.K., Urazova O.I., Voronkova O.V. i dr. Osobennosti immunofenotipa i tsitokinsekretornoy aktivnosti dendritnykh kletok u bol'nykh tuberkulezom legkikh [Features tsitokinsekretornoy immunophenotype and activity of dendritic cells in patients with pulmonary tuberculosis] // *Fundamental'nyye issledovaniya – Fundamental Research*. 2013; 9: 152–155 (in Russian).
10. Khaitova Z.K., Urazova O.I., Khasanova R.R. i dr. Osobennosti immunofenotipa dendritnykh kletok i T-limfotsitov u bol'nykh tuberkulezom legkikh [Features immunophenotype of dendritic cells and T-lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis] // *Fundamental'nyye issledovaniya – Fundamental Research*. 2012; 12: 386–390 (in Russian).
11. Khaitova Z.K., Khasanova R.R., Voronkova O.V. i dr. Rol' dendritnykh kletok v protivotuberkuleznom immunitete [The role of dendritic cells in the TB immunity] // *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal – Russian Journal of Immunology*. 2012; 6 (2): 119–123 (in Russian).
12. Druszczynska M., Włodarczyk M., Janiszewska-Drobinska B. et al. Monocyte signal transduction receptors in active and latent tuberculosis // *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013. Article ID 851452: 15.
13. Balboa L., Romero M.M., Yokobori N. et al. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile // *Immunol. Cell Biol.* 2010; 88 (7): 716–726.
14. Geurtsen J., Chedammi S., Mesters J. et al. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation // *J. Immunol.* 2009; 183 (8): 5221–5231.
15. Chaudhry A., Rudensky A.Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T-cells // *J. Clin Invest.* 2013; 123 (3): 939–944.
16. Sallusto F., Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses // *Arthritis Research*. 2002; 4 (3): 127–132.
17. Oestreich K.J., Weinmann A.S. Transcriptional mechanisms that regulate T-helper 1 cell differentiation // *Curr. Opin. Immunol.* 2012; 24 (2): 191–195.
18. Khasanova R.R., Urazova O.I., Voronkova O.V. i dr. Produktsiya IL-12 $\beta$  mononuklearnymi leykotsitami krovi u bol'nykh tuberkulezom legkikh v zavisimosti ot spektra lekarstvennoy ustoychivosti *Mycobacterium tuberculosis* [Production of IL-12 $\beta$  blood mononuclear leukocytes in patients with pulmonary tuberculosis, depending on the spectrum of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] // *Immunologiya – Immunology*. 2013; 34 (2): 115–118 (in Russian).
19. Khasanova R.R., Urazova O.I., Khaitova Z.K. i dr. Uroven' produktsii IL-12 $\beta$  mononuklearnymi leykotsitami perifericheskoy krovi v zavisimosti ot klinicheskoy formy tuberkuleza legkikh [The level of production IL-12 $\beta$  mononuclear leukocytes of peripheral blood, depending on the clinical form of pulmonary tuberculosis] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2012; 6: 218–220 (in Russian).
20. Ketlinskiy S.A. Rol' geterodimernykh tsitokinov semeystva IL-12 v razvitii i regulatsii vrozhdennogo immuniteta i TH1 immunnogo otveta [Role of heterodimeric IL-12 cytokine family, and in the development and regulation of innate immunity TH1 immune response] // *Meditsinskiy akademicheskiy zbur. – Medical Academic Journal*. 2005; 5 (3): 13–25 (in Russian).
21. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Tsitokiny [Cytokines]. Saint Petersburg, Foliant Publ., 2008: 552 (in Russian).
22. Pompei L., Jang S., Zamlynniy B. et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs // *J. Immunol.* 2007; 178 (8): 5192–5199.
23. Pisarenko M.S., Esimova I.E., Novitskiy V.V. i dr. Narusheniya IL-12/IL-27-zavisimoy aktivatsii T-limfotsitov pri disseminirovannom tuberkuleze legkikh [Disorders IL-12/IL-27-dependent activation of T-lymphocytes with disseminated pulmonary tuberculosis] // *Tuberkulez i bolezni legkikh – Tuberculosis and Lung Diseases*. 2013; 11: 52–57 (in Russian).

24. Zhao Jingxian, Zhao Jincun, Perlman S. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T-cells: roles of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-2R // *PLoS One*. 2012; 7 (9): e46241. doi: 10.1371/journal.pone.0046241.
25. Villarino A., Hibbert L., Lieberman L. et al. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T-cell hyperactivity during infection // *Immunity*. 2003; 19 (5): 645–655.
26. Coskun M., Salem M., Pedersen J., Nielsen O.H. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Pharmacol. Res.* 2013; 76: 1–8. doi: 10.1016/j.phrs.2013.06.007.
27. Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Leplina O.YU. i dr. Rol' PD-1/V7-N1-oposredovannogo puti v narushenii antigenspetsificheskogo otveta u bol'nykh tuberkulezom legkikh [The role of the PD-1 / B7-H1-mediated pathway in violation of an antigen specific response in patients with pulmonary tuberculosis] // *Immunologiya – Immunology*. 2011; 2: 89–93 (in Russian).
28. Churina E.G., Novitskiy V.V., Urazova O.I. Faktory immunosupressii pri razlichnykh patologiyakh [Factors immunosuppression with different pathologies] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2012; 4: 103–111 (in Russian).
29. Pinheiro R.O., de Oliveira E.B., Dos Santos G. et al. Different immunosuppressive mechanisms in multi-drug-resistant tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria patients // *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 171 (2): 210–219.
30. Dhamne C., Chung Y., Alousi A.M. et al. Peripheral and thymic foxp3(+) regulatory T-cells in search of origin, distinction, and function // *Front. Immunol.* 2013; 4: 253.
31. Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T-cells: mechanisms of differentiation and function // *Annu Rev. Immunol.* 2012; 30: 531–564.
32. Larson R.P., Shafiani S., Urdahl K.B. Foxp3(+) regulatory T-cells in tuberculosis // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 783: 165–180.
33. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells in the human immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (7): 490–500.
34. Semple P.L., Binder A.B., Davids M. et al. Regulatory T-cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 187 (11): 1249–1258.
35. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T-cells work // *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8 (7): 523–532.
36. Beyer M., Schultze J.L. Plasticity of T(reg)-cells: is reprogramming of T(reg)-cells possible in the presence of FOXP3? // *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11 (5): 555–560.
37. Miyara M., Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T-cells: their knowns and unknowns // *Immunol. Cell. Biol.* 2011; 89 (3): 346–351.
38. Sakaguchi S., Vignali D.A., Rudensky A.Y. et al. The plasticity and stability of regulatory T-cells // *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13 (6): 461–467.
39. Rudensky A.Y. Regulatory T-cells and Foxp3 // *Immunol. Rev.* 2011; 241 (1): 260–268.
40. Churina E.G., Novitskiy V.V., Urazova O.I. i dr. Pokazateli apoptoza i proliferativnoy aktivnosti limfotsitov u bol'nykh tuberkulezom legkikh s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivost'yu M. tuberculosis [Indicators of apoptosis and proliferative activity of lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant M. tuberculosis] // *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology*. 2012; 14 (1–2): 119–126 (in Russian).
41. Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Kurganova E.V. i dr. T-kletochnaya anergiya v patogeneze immunnogo nedostatochnosti pri tuberkuleze legkikh [T-cell anergy in the pathogenesis of immune deficiency in pulmonary tuberculosis] // *Problemy tuberkulëza i bolezney legkikh*. 2004; 5: 23–28 (in Russian).
42. Lee D.C., Harker J.A., Tregoning J.S. et al. CD25+ natural regulatory T-cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection // *J. Virol.* 2010; 84 (17): 8790–8798.
43. Liu Y., Yu S., Li Z. et al. TGF- $\beta$  enhanced IL-21-induced differentiation of human IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T-cells via Smad3 // *PLoS One*. 2013; 8 (5): e64612. doi: 10.1371/journal.pone.0064612.
44. Yadav M., Stephan S., Bluestone J.A. Peripherally induced Tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity // *Front. Immunol.* 2013; 4: 232.
45. Kononova T.E., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Churina E.G. Oposredovannaya T-limfotsitami-khelperami tipa 17 regulatsiya antibakterial'nogo (protivotuberkuleznogo) immuniteta [T-lymphocyte-mediated helper type 17 regulation of antibacterial (TB) immunity] // *Molekulyarnaya biologiya – Molecular Biology*. 2013; 47 (6): 883–890.
46. Burgler S., Mantel P.Y., Bassin C. et al. RORC2 is involved in T-cell polarization through interaction with the FoxP3 promoter // *J. Immunol.* 2010; 184: 6161–6169.
47. Eisenstein E.M., Williams C.B. The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity // *Pediatr. Res.* 2009; 65: 26R–31R.
48. Laurence A., Tato C.M., Davidson T.C. et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T-helper 17 cell generation // *Immunity*. 2007; 26: 371–381.
49. Xu L., Kitani A., Fuss I., Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta // *J. Immunol.* 2007; 178 (11): 6725–6729.
50. Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R. et al. T-helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma // *Immunity*. 2008; 28 (10): 29–39.
51. Zheng S.G. Regulatory T-cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? // *Am. J. of Clin. Exp. Immunol.* 2013; 2 (1): 94–106.
52. Khader S.A., Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens // *Virulence*. 2010; 1 (5): 423–427.

53. McAleer J.P., Kolls J.K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense // *Immunol. Rev.* 2014; 260 (1): 129–144.
54. Paidipally P., Periasamy S., Barnes P.F. et al. NKG2D-dependent IL-17 production by human T-cells in response to an intracellular pathogen // *J. Immunol.* 2009; 183 (3): 1940–1945.
55. Scriba T.J., Kalsdorf B., Abrahams D.A. et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T-cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response // *J. Immunol.* 2008; 180 (3): 1962–1970.
56. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease // *Immunol. Reviews.* 2008; 223: 87–113.
57. Kononova T.E., Urazova O.I., Novitskiy V.V. i dr. Funktsional'naya aktivnost' Th17-limfotsitov pri tuberkuleze legkikh [Functional activity of Th17 lymphocytes in pulmonary tuberculosis] // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013; 156 (12): 701–704 (in Russian).
58. Awasthi A., Kuchroo V. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection // *Int. Immunol.* 2009; 21 (5): 489–498.
59. Li L., Qiao D., Fu X. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* – specific Th1, Th17 and Th22 cells using the expression of CD40L in tuberculous pleurisy // *PLoS One.* 2011; 6 (5): e20165. doi: 10.1371/journal.pone.0020165.
60. Miossec P., Kolls J.K. Targeting IL-17 and TH17-cells in chronic inflammation // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2012; 11: 763–776.
61. Yang J., Yang X., Zou H. et al. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T-cells as a treatment for systemic lupus erythematosus // *Rheumatology.* 2011; 50: 1366–1372.

Received September 30.2016

Accepted December 01.2016

**Churina Yelena G.**, MD, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Professor of the Department of Organic Chemistry, NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

**Novitskiy Vyacheslav V.**, MD, Professor, Academician of RAS, Honored Scientist of Russia, Head of Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Urazova Olga I.**, MD, Professor, Corresponding Member of RAS, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Yesimova Irina Ye.**, PhD, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kononova Tatyana Ye.**, PhD, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Filinyuk Olga V.**, MD, Associate Professor, Head of the Department of Tuberculosis and Pulmonology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Kolobovnikova Yuliya V.**, MD, Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Dmitrieva Alla I.**, MD, Professor of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Churina Yelena G.**, e-mail: Lena1236@yandex.ru

УДК 616.24-002.5-097

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-178-183

Для цитирования: Валикова Т.А., Алифирова В.М., Королева Е.С., Филимонова М.Н., Пугаченко Н.В. Синдром Коуден – фактор риска развития ишемического инсульта. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 178–183

## Синдром Коуден – фактор риска развития ишемического инсульта

Валикова Т.А.<sup>1</sup>, Алифирова В.М.<sup>1</sup>, Королева Е.С.<sup>1</sup>,  
Филимонова М.Н.<sup>2</sup>, Пугаченко Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики (НИИМГ), Томский национальный  
исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)  
Россия, г. Томск, 634050, Набережная р. Ушайки, 10

### РЕЗЮМЕ

Синдром Коуден – это редкое генетическое заболевание, обусловленное аномалией развития всех трех зародышевых листков. Учитывая мезодермальное происхождение мезенхимальной ткани, из которой формируется сосудистая система, патология сосудов головного мозга может иметь место при данном заболевании и послужить фоном для развития у таких пациентов нарушений мозгового кровообращения.

**Ключевые слова:** синдром Коуден, ишемический инсульт, аутосомно-доминантное заболевание, аномалии зародышевых листков, множественные гамартомы, гиподенный очаг, постишемическая киста.

### ВВЕДЕНИЕ

Синдром Коуден (синдром множественных гамартром) – это генетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования и вариабельной экспрессивностью генов. Характерными признаками данной патологии являются множественные гамартомы, обусловленные аномалиями развития эктодермального, мезодермального, энтодермального зародышевых листков, и прогрессирующий рост доброкачественных и злокачественных новообразований. У 89% пациентов с синдромом Коуден диагностируют рак [1]. Злокачественные опухоли локализуются чаще всего в молочной железе (22–80% случаев) и щитовидной (7–35% случаев) железе. Рак толстого кишечника обнаруживают у 5% пациентов, почек – 4%, эндометрия – у 5% больных. Среди доброкачественных новообразований при болезни Ко-

уден первое место занимают полипы желудка и толстого кишечника (22% случаев), реже диагностируют липомы, гемангиомы и аденомы паращитовидных желез.

Синдром множественных гамартром был впервые описан Costello в 1940 г. [2]. В 1963 г. Lloyd и Dennis диагностировали данный симптомокомплекс у 20-летней больной Rachel Cowden, именно ее именем и была впоследствии названа болезнь. Частота встречаемости синдрома Коуден составляет 1 : 200 тыс. населения [3]. Дебютирует болезнь Коуден в возрасте 4–75 лет, в половине случаев – до 40 лет. Мужчины болеют чаще, чем женщины.

Заболевание ассоциировано с зародышевыми мутациями в локусе 10q23.3 на длинном плече хромосомы 10, где расположен ген-супрессор опухоли *PTEN*, управляющий ростом и дифференцировкой клеток [4]. На сегодняшний день известно более 80 мутаций, они не позволяют белку *PTEN* эффективно регулировать процессы

✉ Королева Екатерина Сергеевна, e-mail: kattorina@list.ru

дифференцировки клеток, что приводит к формированию опухолей [5].

Клиническая картина синдрома Коуден разнообразна. К патогномоничным симптомам относят гиперкератоз и папилломатоз кожи и слизистых оболочек. У 90% пациентов с болезнью Коуден высыпания на коже представлены трихолеммомами [6].

Папулы, похожие на плоские бородавки темного-розового или коричневого цвета, локализуются вокруг глаз, носа, рта, на губах в области спаек, на верхней части щек, ушных раковинах. Слизистые оболочки имеют вид булыжной мостовой из-за сливающихся беловатых папул размером 1–3 мм с гладкой поверхностью. Высыпания на тыльной поверхности кистей, предплечий, а также на ладонях и стопах в виде плоских ороговевающих папул представляют собой периферический гиперкератоз. Для постановки диагноза достаточно наличия у больного минимум шести папиллом кожи лица, три из которых являются трихолеммомами, папиллом слизистых оболочек полости рта, периферического гиперкератоза. Подтверждением наличия синдрома Коуден являются макроцефалия, или болезнь Лермитта – Дюкло, «птичье» лицо, гипоплазия верхней и нижней челюстей, кифосколиоз, асимметрия грудной клетки, гипоплазия мягкого нёба, хронический рецидивирующий синусит и ринофарингит, поражение центральной нервной системы в виде умственной отсталости, эпилепсии, невром, ганглионевром, менингеом височной кости.

В 1997 г. Международным консорциумом по изучению синдрома Коуден были опубликованы критерии диагностики этого заболевания [7]. К патогномоничным симптомам отнесены изменения кожи и слизистых. Наиболее важными диагностическими критериями являются рак молочной железы и рак щитовидной железы, опухоли мозжечка, макроцефалия (> 97-го перцентиля, 58 см для взрослых женщин, 60 см для мужчин). К минимальным диагностическим критериям относят: различные тиреоидные заболевания (аденомы или многоузловой зоб), фиброзно-кистозную мастопатию, желудочно-кишечные гамартомы, фибромы, липомы, различные опухоли органов малого таза, аутизм, снижение интеллекта (незначительное, IQ < 75).

На сегодняшний день основная тактика лечения синдрома Коуден – хирургическая. Она включает в себя лазеротерапию, электрокоагуляцию. Учитывая высокий риск развития рака молочной железы, иногда требуется проведение профилактической двухсторонней мастэктомии. Прогноз зависит от злокачественного заболевания, его

стадии на момент постановки диагноза и лечения. Принимая во внимание редкость данной патологии, представляется актуальным описание клинического случая у взрослой пациентки с синдромом Коуден, у которой возник ишемический инсульт.

*Клинический пример.* Больная Т., 20 лет, проходила лечение в неврологической клинике с 30.08.2015 по 14.09.2015. При поступлении жаловалась на общую слабость, быструю утомляемость. Пациентку также беспокоили периодические головокружения несистемного характера.

*Анамнез жизни.* Пациентка родилась в Казахстане. При рождении был поставлен диагноз: гемолитическая болезнь новорожденных, врожденный вывих бедра справа. В родильном доме было проведено переливание крови, осложнившееся сепсисом. В последующем девочка наблюдалась у ортопеда с диагнозом: врожденная аномалия развития позвоночника – синостоз С3–С4, прогрессирующий S-образный сколиоз 2-й степени. Челюстно-лицевой дизостоз. Артроз правого тазобедренного сустава, *cox-a-vara* справа. Укорочение правой нижней конечности на 1,5 см. Укорочение левой верхней конечности на 3 см. У невролога наблюдалась с диагнозом: аномалия развития шейного, грудного отделов позвоночника, цервикальная миелопатия, рефлекторный тетрапарез, больше выраженный слева. Сопутствующий диагноз: киста надгортанной области.

Девочка отставала от сверстников в физическом развитии: голову начала держать с 5 мес, сидеть – с 7 мес, ходить – в 1,5 года. В школу пошла в 7 лет, закончила 11 классов. Поступила в ТУСУР, сейчас учится на 4-м курсе. В 12 лет девочка была обследована у врача-генетика.

*Результаты магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга от 11.02.2008.* Нарушение оттока ликвора из задних рогов боковых желудочков без признаков окклюзии. Гиперплазия шишковидной железы. Мелкие кисты в шишковидной железе (диаметром не более 1 мм).

*Результаты МРТ шейного отдела позвоночника от 11.02.2008.* Искривление в шейном отделе позвоночника. Нестабильность тел позвонков С3 и С4. Снижена высота межпозвонкового диска С3–С4. Отмечается незаращение зуба с телом 2-го шейного позвонка. Зуб 2-го шейного позвонка смещен кзади и вызывает резкую компрессию спинного мозга. Спинной мозг на данном уровне значительно уменьшен в диаметре, до 2 мм. Задняя продольная связка на уровне зуба гипертрофирована. Патологических образований в структурах спинного мозга не выявлено.

**Результаты электроэнцефалографии (ЭЭГ)** от 18.02.2008. На фоне умеренно дезорганизованной ЭЭГ регистрируются признаки амплитудной асимметрии, снижение порога судорожной готовности, возможный очаг патологической неэпилептиформной активности в височной области справа; ирритация стволовых структур на гипоталамическом уровне.

Консультация гинеколога: дисменорея.

После проведенного обследования в НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН в 2008 г. был поставлен диагноз основной: «синдром множественных гамартом (синдром Коуден)». Осложнения основного диагноза: «миелопатия (компрессия спинного мозга зубом 2-го шейного позвонка)». Сопутствующий диагноз: «врожденные аномалии развития: опущение правой почки, дефицит массы тела 2-й степени, аплазия лимфоидной ткани небных миндалин». Установлена инвалидность в марте 2008 г.

**Анамнез заболевания.** Заболела остро 27.09.2014 г. Появились головокружение, онемение левой половины лица. Самостоятельно прошла МРТ-исследование головного мозга. Заключение: МРТ-картина гиподенсного очага в проекции моста справа наиболее соответствует подострой стадии нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу (рис. 1). Результаты МРТ сосудов головного мозга: гиподенсный очаг в проекции моста справа. Стеноз позвоночного канала. Локальное расширение V3-сегмента левой позвоночной артерии с турбулентным током крови. Гипоплазия правой позвоночной артерии с признаками снижения кровотока в ней. Вариант строения Вилизиева круга в виде неполной задней трифуркации обеих внутренних сонных артерий (рис. 2).

Пациентка была госпитализирована в Региональный сосудистый центр Томской областной клинической больницы с диагнозом: ишемический инсульт, гемодинамический подтип в вертебрально-базиллярном бассейне от 27.09.2014 г., вестибулоатаксия. Фон заболевания определен не был.

**Соматический статус.** Пациентка астенического телосложения, пониженного питания. Кожные покровы: обычного цвета, умеренно влажные. Выраженная деформация позвоночника – S-образный сколиоз, «птичье» лицо (рис. 3). Язык влажный, видимые слизистые чистые. Артериальное давление 110 / 70 мм рт. ст. Дыхание везикулярное, хрипов не слышно. Живот мягкий, безболезненный.

**Неврологический статус** при поступлении. Глазные щели D = S. Движения глазных яблок в полном объеме.

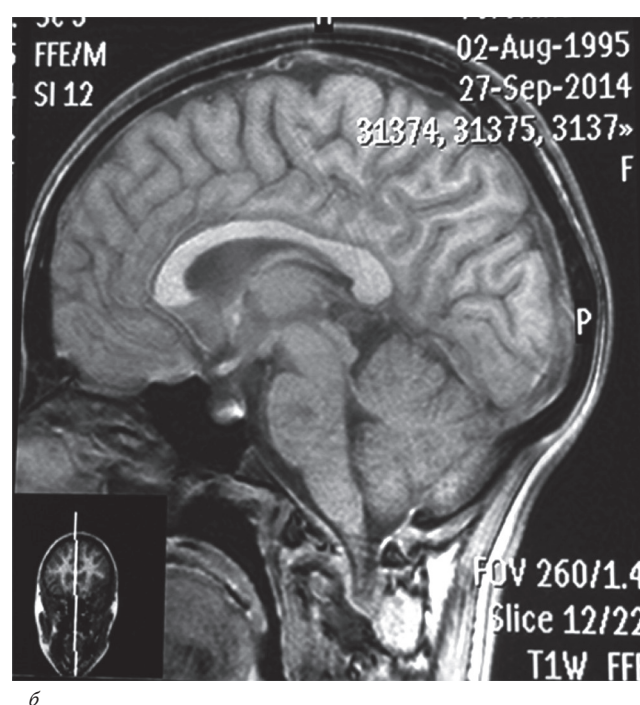
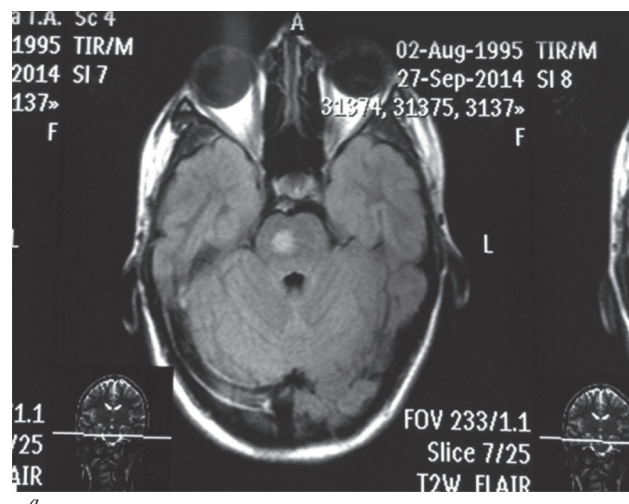


Рис. 1. МРТ-картина гиподенсного очага в проекции моста справа (а), стеноз позвоночного канала (б) у пациентки с болезнью Коуден

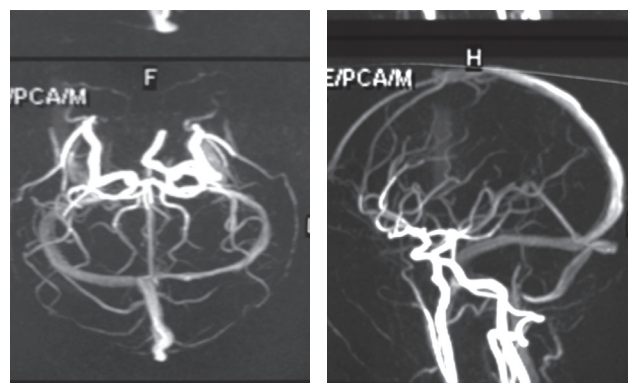


Рис. 2. МРТ-картина сосудов головного мозга у пациентки с болезнью Коуден



а



б

Рис. 3. Аномалия развития позвоночника (а), «птичье» лицо (б) у пациентки с болезнью Коуден

Нистагма и диплопии нет, конвергенция сохранена. Носогубные складки равные. Язык по средней линии. Глоточный рефлекс живой. Мягкое нёбо фонирует. Симптомов орального автоматизма нет. Сила мышц конечностей 5 баллов, сухожильные рефлексы оживлены, равные. Патологические стопные знаки: симптомы Россолимо и Бабинского слева. Чувствительных нарушений не выявлено. Диффузная гипотония. Походка обычная. В позе Ромберга – покачивание. Координаторные пробы выполняет уверенно. Менингеальных знаков нет. Функция тазовых органов не нарушена.

*Данные дополнительных обследований.* Общий, биохимический анализ крови, общий анализ мочи – без патологии. Электрокардиограмма (ЭКГ) – без выраженных изменений.

*Данные ультразвукового исследования сосудов шеи.* Гипоплазия позвоночной артерии справа, дефицит кровотока по позвоночным артери-

ям с обеих сторон. Асимметрия кровотока по сонным артериям с преобладанием слева.

*Результаты эхоЭКГ.* Пролабирование передней створки в полость левого предсердия на 5 мм. Незначительная митральная и трикуспидальная регургитация. Кровь на гомоцистеин 7,63; АФС-scrin IgM 2,6; IgG 3,2. Больной назначена терапия аспирином кардио (125 мг/сут), витаминотерапия. Больная выписана с клиническим улучшением.

В январе 2015 г. проведено повторное МРТ-исследование головного мозга. Заключение: единичная постишемическая киста в стволе мозга размером 0,6 x 0,5 x 0,3 см (рис. 4).

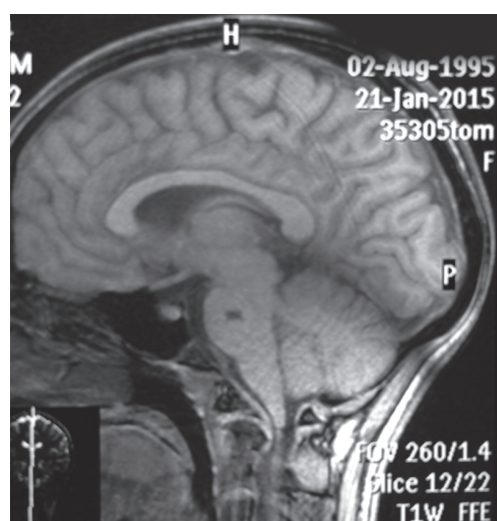


Рис. 4. МРТ-картина единичной постишемической кисты в стволе мозга, единичного супратенториального очага глиоза, более вероятно сосудистого генеза, нерезко выраженных арахноидальных изменений ликворокистозного характера

Неврологический осмотр в динамике не выявил каких-либо изменений. Активных жалоб пациентка не предъявляла.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное клиническое наблюдение показывает, что болезнь Коуден может являться фоном для развития нарушений мозгового кровообращения. Согласно литературным данным, синдром множественных гамартом является довольно редким генетически обусловленным заболеванием, которое характеризуется аномалией всех трех зародышевых листков. Учитывая мезодермальное происхождение мезенхимальной ткани, из которой формируется сосудистая система, патология сосудов головного мозга не исключена в данном клиническом случае. Следовательно, в качестве фонового заболевания у нашей пациентки может быть определена болезнь Коуден.

## 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Riegert-Johnson D.L., Gleeson F.C., Roberts M. et al. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients // *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2010; 8: 1–6.
2. Scheper M.A., Nikitakis N.G., Sarlani E. et al. Cowden syndrome: report of a case with immunohistochemical analysis and review of literature // *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. and Endod.* 2006; 101: 625–631.
3. Farooq A., Walker L.J., Bowling J., Audisio R.A. Cowden syndrome // *Cancer Treat. Rev.* 2010; 36: 577–583.
4. Waite K.A., Eng C. Protean PTEN: from and function // *Am. J. Human. Genet.* 2002; 70: 829–844.
5. Eng C. Cowden syndrome // *J. Genet. Counseling.* 1997; 6: 181–192.
6. Ильин А.А., Васильков С.В., Семин Д.Ю., Медведев В.С. Синдром Каудена // *Вопросы онкологии.* 2013; 59 (6): 785–788.
7. Hildenbrand C., Burgdorf W.H., Lautenschlager S. Cowden syndrome: diagnostic skin signs // *Dermatology.* 2001; 202: 362–366.

Поступила в редакцию 29.08.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Валикова Татьяна Андреевна, канд. мед наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.  
Алифиров Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск.

Королева Екатерина Сергеевна, канд. мед наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.  
Филимонова Маргарита Николаевна, зав. отделением наследственных болезней НИИ МГ, ТНИМЦ РАН, г. Томск.  
Пугаченко Наталья Викторовна, канд. мед наук, доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Королева Екатерина Сергеевна, e-mail: kattorina@list.ru

УДК 616.24-002.5-097

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-178-183

For citation: Valikova T.A., Alifirova V.M., Koroleva E.S., Filimonova M.N., Pugachenko N.V. Cowden syndrome is a risk factor for ischemic stroke. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (5): 178–183

## Cowden syndrome is a risk factor for ischemic stroke

Valikova T.A.<sup>1</sup>, Alifirova V.M.<sup>1</sup>, Koroleva E.S.<sup>1</sup>, Filimonova M.N.<sup>2</sup>, Pugachenko N.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> The Research Institute for Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Sciences (RAS)  
10, Nab. Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

## ABSTRACT

Cowden syndrome is a rare genetic disorder caused by the abnormal development of all three germ layers. Taking into consideration the mesodermal origin of mesenchymal tissue that gives rise to the vascular system, the pathology of cerebral blood vessels can occur in conjunction with this disease and cause the development of cerebrovascular disease in such patients.

**Key words:** Cowden syndrome, ischemic stroke, autosomal dominant disease, abnormalities of germ layers, multiple hamartomas, hypodense lesion, postischemic cyst.

## REFERENCES

1. Riegert-Johnson D.L., Gleeson F.C., Roberts M. et al. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients // *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2010; 8: 1–6.
2. Scheper M.A., Nikitakis N.G., Sarlani E. et. al. Cowdensyndrome: report of a case with immunohistochemical analisis and review of literature // *Oral Surg., Oral Med., Oral Patbol., Oral Radiol. and Endod.* 2006; 101: 625–631.
3. Farooq A., Walker L.J., Bowling J., Audisio R.A. Cowden syndrome // *Cancer Treat. Rev.* 2010; 36: 577–583.
4. Waite K.A., Eng C. Protean PTEN: from and function // *Am. J. Human. Genet.* 2002; 70: 829–844.
5. Eng C. Cowden syndrome // *J. Genet. Counseling.* 1997; 6: 181–192.
6. Ilin A.A., Vasilcov S.V., Semin D.U., Medvedev V.S. Sindrom Kaudena [Cowden syndrome] // *Voprosy onkologii – Problems of Oncology.* 2013; 59 (6): 785–788 (in Russian).
7. Hildenbrand C., Burgdorf W.H., Lautenschlager S. Cowden syndrome: diagnostic skin signs // *Dermatology.* 2001; 202: 362–366.

Received August 29.2016

Accepted December 01.2016

**Valikova Tatyana A.**, PhD, Associate Professor of the Department of Neurology and Neurosurgery, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Alifirova Valentina M.**, MD, Professor, Head of the Department of Neurology and Neurosurgery, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Koroleva Ekaterina S.**, PhD, Associate Professor of the Department of Neurology and Neurosurgery, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Filimonova Margarita N.**, Head of Department Hereditary Diseases, Research Institute of Medical Genetics, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Pugachenko Nataliya V.**, PhD, Associate Professor of the Department of Neurology and Neurosurgery, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Koroleva Ekaterina S.**, e-mail: kattorina@list.ru

УДК 616.718.41-018.3-002.4-089.85:615.832.9

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-184-187

Для цитирования: Слизовский Г.В., Кужеливский И.И., Ситко Л.А., Аникина Е.Ю. Туннелизация шейки бедренной кости с регенеративным криовоздействием на очаг некроза при болезни Легг – Кальве – Пертеса у детей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 184–187

## Туннелизация шейки бедренной кости с регенеративным криовоздействием на очаг некроза при болезни Легг – Кальве – Пертеса у детей

Слизовский Г.В.<sup>1</sup>, Кужеливский И.И.<sup>1</sup>, Ситко Л.А.<sup>2</sup>, Аникина Е.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Омский государственный медицинский университет (ОмГМУ)  
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

### РЕЗЮМЕ

Проведено субдеструктивное охлаждение очагов остеонекроза головки бедренной кости у детей при второй степени болезни Легг – Кальве – Пертеса с активацией репаративных процессов костной ткани, что обеспечило восстановление функции опорной способности конечности, на 23% сократило сроки восстановительного лечения и госпитализации, что улучшило качество жизни больных. Одномоментная биостимулирующая операция туннелизации и криовоздействия на некротизированную головку бедренной кости является операцией выбора у детей на ранних стадиях болезни Легг – Кальве – Пертеса.

**Ключевые слова:** стеохондропатия, болезнь Легг – Кальве – Пертеса, костная регенерация, субдеструктивное криовоздействие.

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день остеохондропатия головки бедренной кости (болезнь Легг – Кальве – Пертеса) относится к одной из наиболее актуальных проблем детской ортопедии. Среди заболеваний тазобедренного сустава у детей болезнь Легг – Кальве – Пертеса составляет 25–30%, а структуре общей ортопедической патологии 0,17–1,9%. Мальчики болеют в 4–5 раз чаще девочек. Высокая распространенность заболевания и угроза инвалидности не только в работоспособном возрасте, потребность в длительном и дорогостоящем лечении являются основными факторами, определяющими медицинскую и социальную значимость данного заболевания [1, 2].

Основные компоненты лечения болезни Легг – Кальве – Пертеса – это предупреждение дефор-

мации головки бедренной кости, восстановление микроциркуляции, лимфооттока и кровообращения, оптимизация остеогистогенеза с последующим восстановлением объема движений и опорной функции сустава. В среднем продолжительность болезни занимает 4 года, а доля неудовлетворительных результатов по данным некоторых авторов достигает 42%. Одной из основных причин неблагоприятных исходов заболевания наряду с поздней диагностикой является отсутствие эффективной разгрузки сустава и значительные микроциркуляторные нарушения головки бедренной кости [2, 3].

Эффективность лечения складывается из нескольких составляющих. Общепринятая патогенетически обоснованная схема лечения состоит из аппаратной динамической разгрузки компонентов сустава, биостимуляции шеечно-эпифизарной области бедренной кости и проведения коррекции нарушенного метаболизма. Ранняя

✉ Кужеливский Иван Иванович, e-mail: kuzhel@rambler.ru

разгрузка сустава (ограничение нагрузки, манжеточное вытяжение, ходьба с костылями или тростью) является неотъемлемой частью комплексного лечения болезни Легг – Кальве – Пертеса и встречается практически у всех авторов. Одновременно с наложением дистракционной системы проводятся реабилитационные мероприятия [3].

Поэтому вполне объяснимы намерения детских хирургов разработать эффективный алгоритм комплексного хирургического лечения, которое позволило бы не только уменьшить число неудовлетворительных результатов в целом, но и значительно увеличить длительность субклинического периода до появления выраженных необратимых признаков коксартроза.

*Цель работы.* Улучшить результаты лечения детей с болезнью Легг – Кальве – Пертеса с применением криотехнологий.

*Задачи исследования:*

1. Клиническая апробация способа лечения асептического некроза головки бедренной кости путем проведения туннелизации шейки и субдеструктивного криовоздействия, обеспечивающего оптимизацию процессов оссификации и регенерации некротических участков.

2. Исключение вероятности гнойных осложнений за счет проведения одномоментной процедуры с закрытием операционной раны.

3. Сокращение сроков лечения путем непосредственного воздействия на костную ткань некротизирующейся головки и ее восстановления.

4. Улучшение качества жизни больных с болезнью Легг – Кальве – Пертеса.

В данной статье представлен первый опыт лечения болезни Легг – Кальве – Пертеса путем криотуннелизации. Новым в предложенном методе лечения является то, что после проведения туннеля вертельной шейки и головки бедренной кости, устанавливается оригинальная трубка диаметром наружным 4 мм и внутренним 3,5 мм из никелида титана с двойными стенками (патент на полезную модель «Устройство для хирургического лечения болезни Легг – Кальве – Пертеса» № 153023 от 03.06.2015). Впервые предложена процедура туннелизации и последующего субдеструктивного охлаждения костной ткани жидким азотом. Выполняется при помощи портативного криоаппарата «Криоиней» (компания «Криотек», Россия) в очаги деструкции головки бедренной кости в течение 3 с.

В работах ученых НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы при Томском государственном университете разраба-

тывается научное направление криорегенеративной медицины. Экспериментально изучена грань криодеструктивного и субдеструктивного отведения тепла с использованием устройства для субдеструктивного криовоздействия (патент РФ на полезную модель № 153023 03.06.2015). После криовоздействия оригинальное устройство легко извлекается, поскольку двойная конструкция стенок из никелида титана не охлаждается снаружи, легко проводит жидкий азот и не засоряется (обледеневает) внутри. Таким образом, опасность адгезии (прилипания) в ране и деструктивное поражение исключается.

Экспозиция воздействия хладагентом подобрали после обширного экспериментального исследования на 30 лабораторных животных и научных результатах данного коллектива авторов. Степень деструкции любой живой ткани зависит от скорости охлаждения ткани, температуры хладагента и длительности экспозиции. Благодаря уменьшению экспозиции появилась возможность отграничить деструктивное отведение тепла и проводить воздействие на ткани в субдеструктивной (криостимулирующей) дозировке. Криостимулирующий эффект субдеструктивного охлаждения с целью оптимизации репаративных процессов описан и обоснован в диссертационном исследовании И.И. Кужеливского и защищен патентом РФ «Способ лечения переломов длинных трубчатых костей у детей» № 2328241 от 10.07.2008.

*Клинический пример.* Больной Т., 9 лет, 12.06.2016 г. поступил в отделение детской ортопедии БСМП № 2 г. Томска с диагнозом: «болезнь Легг – Кальве – Пертеса справа второй степени». Из анамнеза известно, что ребенок уже 3-й мес ощущает дискомфорт в области правого тазобедренного сустава и 2-й мес боль при нагрузке во время уроков физкультуры. Точно боль не локализовывалась, иррадиации не было. Родители лечили ребенка препаратом «Найз», эффект длился недолго. В поликлинике по месту жительства 01.06.2016 г. были выполнены рентгенограммы тазобедренных суставов в прямой проекции. Ортопедом выставлен диагноз: «остеохондропатия головки правой бедренной кости 2 стадии». Ребенок получил направление на госпитализацию с диагнозом: «болезнь Легг – Кальве – Пертеса справа, 2 стадия» в отделение ортопедии хирургического стационара. В отделении детской ортопедии БСМП № 2 была наложена система демпферной разгрузки сустава манжеточным вытяжением грузом 1 кг сроком на 2 нед. После согласования с родителями

о намерениях использования нового способа лечения была проведена операция: туннелизация правой шейки бедренной кости и криоорошение очагов остеонекроза жидким азотом с экспозицией 3 с при помощи оригинального проводника хладагента и универсального криоаппарата «Криоиней».

**Ход операции.** Общее обезболивание. Положение больного лежа на спине. Под ягодицу на стороне поражения подложен валик. Перед началом операции и в конце кожа обработана раствором хлоргексидина. Выполнен разрез длиной 2 см в подвертельной области, 2,5 см дистальнее от большого вертела. С помощью рентгеновского электронно-оптического преобразователя интраоперационно проведена направляющая спица в сторону головки бедренной кости без повреждения ростковой зоны. По проведенной спице сверлом с торцевым отверстием сделан туннель в направлении головки бедренной кости. Спицу и сверло извлекли и через втулку троакара в просверленный туннель установлена оригинальная трубка-проводник хладагента. Подсоединен универсальный криоаппарат «Криоиней». Произведено криовоздействие головки бедренной кости через сформированный туннель хладагентом температурой  $-196^{\circ}\text{C}$  с экспозицией 3 с, что является субдеструктивным охлаждением. После удаления проводника и контроля гемостаза рана ушита послойно. Наложена асептическая повязка. Послеоперационный период протекал гладко, швы сняты на 10-е сут после операции.

Разгрузка сустава продолжалась в течение 3 мес после операции. Сначала – первые 2 нед после операции путем манжеточного вытяжения, далее в течение 6 нед при осевой нагрузке использовали костыли и еще 1 мес – ходьба с тростью. Далее ребенку рекомендовалась дозированная нагрузка на конечность еще в течение 4 мес (ходьба не более 1 ч в день). В последующем проводился курс реабилитации с использованием массажа, лечебной физкультуры и дозированных умеренных нагрузок на велотренажере. Полная осевая нагрузка на конечность разрешена через 8 мес. На рентгенограммах, произведенных через 12 мес после оперативного лечения, наблюдалось полное восстановление структуры и формы головки бедренной кости, костный рисунок четкий, плотный, без очагов разряжения, прослеживалась трабекулярная сеть. Контуры головки бедренной кости сохранены. Деформация не определяется. Проявлений остеоартроза не выявлено. Исход лечения по клинической шкале Любошица –

Маттиса – Шварцберга составил 4,5 баллов из 5 возможных, что соответствует очень хорошему результату.

Больному рекомендовано динамическое наблюдение у ортопеда поликлиники по месту жительства один раз в 6 мес до 12 лет и далее один раз в год до 16 лет.

## ВЫВОДЫ

Получен первый опыт биостимулирующей операции путем туннелизации шейки и криовоздействия на некротизированную головку бедренной кости. Удалось активировать репаративные процессы в кости с восстановлением структуры костной ткани и сократить течение болезни, что предупредило возможную деформацию головки и, возможно, послужит профилактикой развития коксартроза (наблюдение в анамнезе продолжается).

Предложенная одномоментная биостимулирующая операция позволяет восстановить головку бедренной кости из состояния «уязвимости» в стойкую регенерацию, что обеспечивает опорную способность конечности, и добиться сокращения продолжительности процедур реабилитации, сроков пребывания в стационаре, что влияет на качество жизни больных.

Авторы не настаивают на исключительности и достоверности предложенного способа, поскольку это первый клинический случай. Однако есть все основания в перспективности способа для дальнейшего применения при лечении болезни Легг – Кальве – Пертеса.

## 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гюнтер В.Э. Биосовместимые материалы с памятью формы и новые технологии в медицине. Томск: Изд-во «НПП МИЦ», 2014: 342.
2. Ревелл П.А. Патология кости. М.: Медицина, 1993: 367.
3. Крестьяшин И.В., Коварский С.А., Крестьяшин В.М., Шафранов В.В. Современные стационарзамещающие технологии в работе детского центра амбулаторной хирургии, травматологии-ортопедии // *Детская хирургия*. 2014; 5: 53–56.

Поступила в редакцию 24.10.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Кужеливский Иван Иванович, канд. мед. наук, доцент кафедры детских хирургических болезней, СибГМУ, г. Томск.  
Слизовский Григорий Владимирович, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой детских хирургических болезней, СибГМУ, г. Томск.

Ситко Леонид Александрович, д-р мед. наук, профессор кафедры детской хирургии, ОмГМУ, г. Омск.

Аникина Елена Юрьевна, канд. мед. наук, ассистент кафедры анатомии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Кужеливский Иван Иванович, e-mail: kuzhel@rambler.ru

УДК 616.718.41-018.3-002.4-089.85:615.832.9

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-184-187

For citation: Kuzhelivskiy I.I., Slizovskiy G.V., Sitko L.A., Anikina E.J. Tunneling of the femoral head with regenerative cryotherapy in children with Legg – Calve – Perthes disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 184–187

## Tunneling of the femoral head with regenerative cryotherapy in children with Legg – Calve – Perthes disease

Kuzhelivskiy I.I.<sup>1</sup>, Slizovskiy G.V.<sup>1</sup>, Sitko L.A.<sup>2</sup>, Anikina E.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Omsk State Medical University

12, Lenina Str., Omsk, 644099, Russian Federation

### ABSTRACT

A subdestructive cooling of osteonecrosis of femoral head in children with Perthes disease (II) followed by activation of reparative processes in bone tissue was performed. It ensured the functional recovery of supporting limb capacity, reduced rehabilitation period by 23%, and improved the quality of patients' life. Simultaneous biostimulating operation of tunneling and cryotherapy in management of necrotized femoral head is operation of choice for children with Perthes disease.

**Key words:** osteochondropathy, Perthes disease, bone regeneration, subdestructive cryotherapy.

### REFERENCES

1. Gunter V.E. Biomaterials and new medicine technologies. Tomsk: NPP MIC Publ., 2014: 342. (in Russian).
2. Revell P.A. Bone pathology. M.: Medicine Publ., 1993: 367 (in Russian).
3. Krestyashin I.V., Kovarskiy S.L., Krestyashin V.M., Shafranov V.V. Modern ambulance technology in the surgery, traumatology, orthopedics outpatient Pediatric Center // *Pediatric Surgery*. 2014; 5: 53–56 (in Russian).

Received October 24.2016

Accepted December 01.2016

Kuzhelivskiy Ivan I., PhD, Associate Professor of the Department of Paediatric Surgical Diseases, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Slizovskiy Grigoriy V., MD, Associate Professor, Head of the Department of Paediatric Surgical Diseases, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Sitko Leonid A., MD, Professor of the Department of Paediatric Surgical, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation.

Anikina Elena U., PhD, Assistant of the Department Anatomy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Kuzhelivskiy Ivan I., e-mail: kuzhel@rambler.ru

УДК 616.1/.4(091)(092)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-188-192

Для цитирования: Карпов Р.С. Воспоминания об учителе (к 120-летию со дня рождения академика АМН СССР Д.Д. Яблокова) *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 188–192

## Воспоминания об учителе (к 120-летию со дня рождения академика АМН СССР Д.Д. Яблокова)

**Карпов Р.С.**

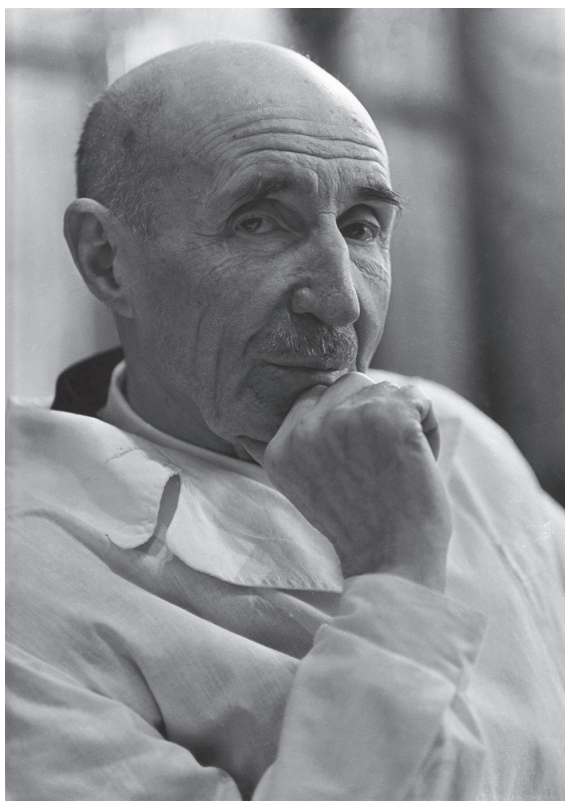
<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)  
Россия, г. Томск, 634012, ул. Киевская, 111а

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

В статье представлен анализ творческого наследия выдающегося врача, педагога, ученого, академика АМН СССР Д.Д. Яблокова в связи со 120-летием со дня рождения.

**Ключевые слова:** Д.Д. Яблоков, история медицины, внутренние болезни.



Выдающемуся российскому врачу, педагогу и ученому, академику Академии медицинских наук СССР Дмитрию Дмитриевичу Яблокову 13 ноября 2016 г. исполнилось бы 120 лет. Мне выпала честь более 30 лет быть рядом с этим замечательным человеком, с гордостью считать себя одним из его ближайших учеников.

Редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины» обратилась ко мне с просьбой написать статью о Дмитрии Дмитриевиче Яблокове. С благодарностью принимая это предложение, позволю себе начать его словами, обращенными к молодому поколению врачей: «Выпускники должны знать своих великих соотечественников, внесших огромный вклад в мировую сокровищницу медицинских знаний. Это, несомненно, будет способствовать еще большему воспитанию в них чувства веры, любви и уважения к нашей отечественной медицинской науке. Это будет также могучим стимулом к их культурному росту и к оформлению высокого морального облика врача-патриота, гуманиста, общественника, образ которого не только ярко рисовался в лекциях и трудах великих представителей русской науки, но и реально воплотился в их личности, деятельности и жизни». Дмитрий Дмитриевич перечисляет великие

✉ Карпов Ростислав Сергеевич, e-mail: karpov@cardio-tomsk.ru

имена С.П. Боткина, Н.И. Пирогова, И.П. Павлова и других, мы же с полным основанием можем дополнить этот список Д.Д. Яблоковым.

Д.Д. Яблоков родился 13 ноября 1896 г. в Уфе в семье учителей. В 1916 г. он окончил Уфимскую духовную семинарию и поступил на физико-математический факультет Пермского отделения Петроградского императорского университета. В 1918 г. был мобилизован в Белую армию, где служил лекарским помощником. В 1919 г. перешел на сторону революции, работал в г. Новосибирске в так называемом Коммунистическом госпитале, где больных тифом было больше, чем раненых, заболел сам. В 1920 г. по приказу Наркомздрава, как и другие студенты-медики, был откомандирован в Томский университет для продолжения образования. Здесь Дмитрий Дмитриевич слышал блестящие лекции выдающегося клинициста М.Г. Курлова. В последующем он вспоминал, что «каждая лекция была новым творением высококвалифицированного «художника»-клинициста. Она расширяла наш кругозор, рождала новые мысли, стремления к дальнейшему изучению медицины и любовь к научно-исследовательской работе». После окончания медицинского факультета Д.Д. Яблоков собирался работать на сельском врачебном участке, посвятить себя земской медицине, но П.А. Ломовицкий убедил его остаться в клинике. И с тех пор практически вся 70-летняя трудовая жизнь врача, педагога, ученого была связана с кафедрой факультетской терапевтической клиники, где он прошел путь от сверхштатного ординатора до профессора, заведующего кафедрой.

Круг научных интересов Дмитрия Дмитриевича был очень широк: гематология, пульмонология (туберкулез, пневмоконозы, неспецифические заболевания легких, бронхиальная астма), краевая патология (описторхоз, эхинококкоз), лекарственные растения Сибири, военная травма легких и плевры, история медицины. Его перу принадлежит 250 печатных работ, 17 монографий. Все монографии Дмитрия Дмитриевича – фундаментальные работы, основанные на многолетних клинических наблюдениях автора. За монографию «Бронхолегочные кровотечения и кровохарканья в клинике туберкулеза и внутренних болезней» в 1971 г. Президиум АМН СССР присудил ему премию и медаль имени С.П. Боткина.

С первых дней Великой Отечественной войны 1941–1945 гг. центр сибирской медицины – Томск – превратился в город-госпиталь. Д.Д. Яблоков был назначен главным терапевтом эвакогоспиталей Томска. «Многие медики ушли на фронт, – вспоминал он. – Те, что остались, трудились с огром-

ным напряжением. Откуда брались силы – не знаю... Почти половину тяжелораненых удалось возвратить в строй, свыше 99 процентов – вылечить». Большое государственное значение имели разработка, изучение и внедрение в клиническую практику новых лекарственных препаратов из флоры Сибири. За цикл этих работ в 1947 г. томские ученые Н.В. Вершинин, В.В. Ревердатто и Д.Д. Яблоков были удостоены Государственной премии СССР (в то время это была Сталинская премия II степени).

Авторитет Дмитрия Дмитриевича на кафедре и в клинике был абсолютным. Он никогда не повышал голоса, не любил делать замечания. Вместе с тем его поручения всегда выполнялись оперативно. Дмитрий Дмитриевич не занимался опекой своих учеников. Нас воспитывал сам образ замечательного врача-труженика, который знал практически всех пациентов клиники, ежедневно консультировал больных и два раза в неделю делал обход женского и мужского отделений, при этом всегда старался поддержать авторитет лечащего доктора, никогда не высказывал замечания в присутствии больного. Если возникали вопросы, они обсуждались уже в кабинете. Дмитрий Дмитриевич очень деликатно представлял свое видение диагноза и лечения пациента. Часто рекомендовал литературу по обсуждаемой проблеме, нередко из своей личной библиотеки. Особенно запоминающимися были клинические разборы диагностически сложных пациентов или больных с относительно редкими заболеваниями. Вспоминаются, в частности, пациенты с диагнозами: «саркаидоз», «лимфогрануломатоз», «узелковый полиартериит», «констриктивный перикардит» и др. К разборам он тщательно готовился. Компьютерной техники не было, поэтому он заказывал таблицы, схемы терапии и другие иллюстрации. Работу художников, так же как и тиражирование статей, методических пособий, оплачивал сам.

При осмотре пациента Дмитрий Дмитриевич всегда проводил подробные физикальные обследования (осмотр, пальпация, аускультация), любил подчеркивать приоритеты российских ученых, особенно часто ссылаясь на работы своего учителя М.Г. Курлова. Несмотря на возраст и проблемы со здоровьем, он очень щадяще осматривал тяжелых больных, нередко опускался перед ними на колени, пальпируя, например, селезенку. Придавал большое значение этической составляющей осмотра, особенно, когда это касалось обследования пациенток.

Консультации профессора оказывали большое психологическое воздействие, и мы нередко были

свидетелями значительного улучшения состояния больных после его консультаций. Помню, один из молодых коллег с некоторой обидой удивлялся: «Я назначил самое современное лечение, Дмитрий Дмитриевич лишь добавил малозначимую микстуру Бехтерева, после чего наступило существенное улучшение».

К глубококому сожалению, в век высоких технологий, высочайших достижений лекарственной терапии, мы стали слишком мало уделять внимания этой важнейшей составляющей лечения – психологическому воздействию врача на пациента. Эта проблема постоянно волновала Дмитрия Дмитриевича. В одной из своих статей он писал: «В нашу эпоху в клинику все больше и больше вливаются небывалые достижения техники ..., врач, увлекаясь инструментальной информацией, может недооценить, потерять личность больного с его богатым миром переживаний, эмоций, частых неповторимых индивидуальных оттенков. Поэтому со студенческой скамьи врач должен всегда помнить завет основоположников отечественной медицины: ближе к постели больного. И хорошо понимая инструментальные методы, чутко относиться к больному. То есть нужно сочетание старого и нового – гипократизма и техницизма».

Именно поэтому наши учителя всегда обращали внимание на необходимость широкого образования, высокой общей культуры медицинских работников. «Истинно хороший врач – человек высокой культуры и духовности», – часто повторял в своих встречах со студентами Дмитрий Дмитриевич. По его мнению, врач «... должен также расширять свой кругозор, черпая ценные данные из художественной литературы, прекрасной музыки и живописи. Это позволит ему лучше и глубже понимать психологию людей, их сложные переживания и, благодаря этому, усилить свое благотворное влияние на больных. Высокий культурный уровень врача, как правило, сочетается с чистотой его нравственного облика».

Сам Д.Д. Яблоков был высокообразованным человеком, владел греческим, французским и немецким языками, свободно ориентировался в философских трудах И. Канта, увлекался трудами философа-идеалиста В.А. Соловьева, хорошо знал древнегреческую мифологию, классическую русскую и европейскую литературу. Особенно любил А. Пушкина, Л. Толстого, Г. Гейне, восхищался полотнами великих мастеров живописи (И. Репина, И. Левитана, В. Поленова, А. Саврасова и др.). Любил классическую музыку (П. Чайковского, Л. Бетховена, В. Моцарта), романсы; сам обладал приятным баритоном.

Наш учитель придавал большое значение взаимоотношениям врача и больного. Его основной принцип: «Пациент всегда прав». Помню один случай. Мне пришлось курировать психологически очень сложную пациентку, по профессии – учителя средней школы. Она была недовольна практически всем. Посещение палаты, где она лечилась, было всегда испытанием. Мне пришлось обратиться к Дмитрию Дмитриевичу с надеждой на участие. Однако профессор сказал приблизительно следующее: «Настоящий врач в подобной ситуации просто обязан быть сильнее пациента, а Вы, Ростислав Сергеевич, хороший врач». И мне стало как-то стыдно, ведь я оторвал учителя от работы над очередной рукописью. Это был урок на всю последующую практику и врача, и педагога.

Дмитрий Дмитриевич был очень настойчив в доказательстве правильности диагноза. Вспоминается пациент с большой эозинофилией – рабочий одного из томских заводов, увлекавшийся рыбалкой. Диагноз описторхоза никак не подтверждался лабораторными исследованиями, что существенно осложняло дифференциальный диагноз. Дмитрий Дмитриевич на очередном осмотре вновь и вновь рекомендовал повторные дуоденальные зондирования и исследования кала. И в конце концов диагноз описторхоза был подтвержден, проведена успешная дегельминтизация.

Сложных и тяжелых пациентов Дмитрий Дмитриевич активно осматривал многократно, нередко приходил в вечернее время, в выходные и праздничные дни, интересовался их состоянием и после выписки из клиники при необходимости рекомендовал повторно госпитализировать. Обычно же ставилась задача – достигнуть успеха лечения в клинике, особенно, если пациент был из сельской местности, поскольку сроки пребывания больного в стационаре не были столь определяющими, как сейчас. Это касалось и пациентов с редкой патологией, важных для обучения студентов. Клиника в те времена полностью служила преподаванию, и решающее слово было всегда за заведующим кафедрой.

Дмитрий Дмитриевич постоянно обращал внимание на то, что в терапевтической клинике пациенты редко болеют одной болезнью, поэтому важно выявить и соответственно лечить пациента комплексно, при этом уметь выделить главное на каждом этапе лечения, чтобы избежать полипрагмазии. Строгих стандартов лечения тогда не было, и главным всегда был пациент со всем многообразием патологии. Дмитрий Дмитриевич

любил повторять слова великого М.Я. Мудрова: «Лечить надо не болезнь, а больного».

Совершенно очевидно, что сейчас много изменилось в нашей профессии. Колоссальный технологический прогресс отмечается во всех сферах деятельности врача. Крайне дорогостоящие технологии диагностики и лечения пациентов. Мы не можем, естественно, уходить в сторону от экономики здравоохранения. Стандарты диагностики и лечения в современных условиях необходимы, но врач не должен быть полностью связан ими, он обязан быть профессионалом и оставаться достаточно свободным в своем индивидуальном подходе (обоснованном, конечно) к лечению конкретного пациента.

Дмитрий Дмитриевич многие годы руководил работой клинко-анатомических конференций. Проходили они очень интересно, привлекали не только врачебную, но и многочисленную студенческую аудиторию. Каждая клинко-анатомическая параллель активно обсуждалась, нередко высказывались противоположные мнения. В основном не совпадали мнения клиницистов и патологоанатомов, к примеру, профессоров Б.М. Шершевского и И.В. Торопцева. Мы имели возможность слушать выступления таких известных клиницистов, как Д.Д. Яблоков, А.А. Ковалевский, Б.М. Шершевский, А.Г. Савиных, Б.А. Альбицкий, С.П. Ходкевич, Н.В. Беляев и многие др. В качестве прозекторов в дискуссии участвовали доценты Д.А. Грацианов, О.М. Ордина, Г.В. Борисова и др. Клиницисты нередко пытались обосновать свои ошибки. Дмитрий Дмитриевич же всегда предлагал внимательно обсудить все возможности правильного диагноза, что должно помочь избежать диагностических ошибок в последующем. Анализ расхождений диагнозов он проводил очень деликатно. Вспоминается история болезни больной системной красной волчанкой в сочетании с туберкулезом легких. Пациентке был назначен стрептомицин, что нежелательно при данной патологии. Очень резко выступил Н.В. Беляев, сказав, что в Болгарии, например, такое лечение закончилось бы судебным разбирательством. Дмитрий Дмитриевич успокоил аудиторию, привел литературные данные, свидетельствующие о том, что стрептомицин при системной красной волчанке действительно не следует назначать, но при сочетании с туберкулезом легких это вполне допустимо.

Д.Д. Яблоков был исключительно талантливым педагогом, блестящим лектором. На конкурсе лекторов среди профессоров всех вузов г. Томска его признали лучшим лектором. Многие

годы он читал полный курс лекций по факультетской терапии. Его лекции нередко заканчивались аплодисментами, их сравнивали с музыкой. Говорили, что профессор Д.Д. Яблоков преподавал не только медицину, но и саму любовь к ней. Лекции всегда сопровождались демонстрацией пациента; историю болезни, как правило, представлял студент-куратор. Крайне интересно проводились практические занятия, клинические разборы больных. Особенно запоминающимися были заключительные занятия по курации больных. Профессор предварительно знакомился с историями болезни всех студентов-кураторов, которые защищали их в присутствии всей группы и преподавателя. Группа нередко разделялась на кардиологов, эндокринологов, пульмонологов и т.д., что придавало особую живость занятию. Это был одновременно урок и для преподавателя, так как Дмитрий Дмитриевич обязательно вносил определенные коррективы в диагноз, терминологию, особое внимание обращал на грамматические неточности. В связи с этим преподаватели просто вынуждены были очень тщательно готовиться к данному занятию. Истории болезни в целом придавалось большое значение на уровне дипломного проекта, к ней обязательно возвращались на курсовом экзамене по терапии.

Дмитрий Дмитриевич уделял большое значение повышению уровня медицинских знаний населения, был активным членом областного общества «Знание», выступал с лекциями и публиковал статьи в газетах «Красное Знамя», «За медицинские кадры». В течение многих лет он был председателем Томского областного общества терапевтов и фтизиатров, членом Международной ассоциации терапевтов, почетным членом правления Всесоюзного общества фтизиатров, действительным членом Международного противотуберкулезного Союза, членом Ученого медицинского совета МЗ РСФСР и СССР, депутатом Верховного Совета СССР (двух созывов) и Томского городского Совета депутатов трудящихся.

Д.Д. Яблоков относится к той категории крупных деятелей медицины, которые получили признание общества и государства при жизни. Академик АМН СССР, заслуженный деятель науки Российской Федерации, лауреат Государственной премии, почетный гражданин г. Томска, Герой Социалистического Труда. И вместе с тем, когда его спрашивали, каким званием он больше всего дорожит, Дмитрий Дмитриевич неизменно отвечал: «Званием врача, в нем смысл моей жизни».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Карпов Р.С. Актовая речь на Чтениях, посвященных 100-летию со дня рождения Д.Д. Яблокова. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1996: 21.
2. Карпов Р.С. Профессор медицины на рубеже двух столетий. Преемственность поколений // *Сибирский медицинский журнал (Томск)*. 2001; 1: 4–7.
3. Карпов Р.С. К 110-летию со дня рождения академика РАМН Д.Д. Яблокова (1896–1993) // *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 7: 8–13.
4. Карпов Р.С. Пятьдесят лет в медицине. Томск: Изд-во «СТТ», 2007: 60.
5. Истоки сибирской терапевтической школы. Томск: Изд-во «Иван Федоров», 2010: 138.

Поступила в редакцию 25.11.2016

Утверждена к печати 01.12.2016

Карпов Ростислав Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, руководитель научного направления ТНИМЦ РАН; научный руководитель НИИ кардиологии ТНИМЦ РАН; зав. кафедрой факультетской терапии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Карпов Ростислав Сергеевич, e-mail: karpov@cardio-tomsk.ru

УДК 616.1/.4(091)(092)

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-188–192

For citation: Karpov R.S. Memories of the teacher (on the 120th anniversary of the birth of Academician of the USSR Academy of medical sciences D.D. Yablokov). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 184–187

## Memories of the teacher (on the 120th anniversary of the birth of Academician of the USSR Academy of medical sciences D.D. Yablokov)

Karpov R.S.

<sup>1</sup> Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Sciences (RAS) 111a, Kievskaya, Tomsk, 634012, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

The article presents the analysis of the creative heritage of the outstanding physician, teacher, scientist, Academician of the USSR Academy of Medical Sciences D.D. Yablokov in connection with the 120th anniversary of his birth.

**Key words:** D.D. Yablokov, history of medicine, internal medicine.

## REFERENCES

1. Karpov R.S. Aktovaya rech na chteniyah, posvyashchen-nuh 100-letiu so dnu rogdeniu D.D. Yablokov [Act speech on Reading sanctified to the 100year from the day of birth of D.D. Yablokov]. Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta Publ., 1996: 21 (in Russian).
2. Karpov R.S. Professor medicine na rubege dvuh stoletiy [Professor of medicine at the turn of two centuries. The continuity of generations] // *Sibirskiyu Meditsinsky Jurnal – Siberian Medical Journal*. 2001; 1: 4–7 (in Russian).
3. Karpov R.S. K 110-letiu so dnu rogdeniu Academica RAMN D.D. Yablokov (1896–1993) [To the 110 anniversary from the birthday of Academician Dmitry Yablokov (1896–1993)] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2006; 7: 8–13 (in Russian).
4. Karpov R.S. Putdesut let v medicine [Fifty years in medicine]. Tomsk: Izd-vo STT Publ., 2007: 60 (in Russian).
5. Istoki sibirskoy terapevticeskoy shkolu [The origins of the Siberian therapeutic school]. Tomsk: Izd-vo «Ivan Fedorov» Publ., 2010: 138 (in Russian).

Received November 25.2016

Accepted December 01.2016

Karpov Rostislav S., MD, Professor, Academician of RAS, Head of Research Area, TNRMC; Scientific Adviser of Cardiology Research Institute, TNRMC; Head of the Department Faculty Therapy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Karpov Rostislav S., e-mail: karpov@cardio-tomsk.ru

---

## Указатель статей и кратких сообщений, опубликованных в журнале «Бюллетень сибирской медицины» за 2016 г.

---



### № 1

#### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Бахлов М.М., Лагуткина Т.П.<br>Анализ деятельности фармацевтических компаний в Египте, направленной на специалистов .....                                                                                                                                                                         | 5  |
| Богатырева Е.М., Новик Г.А., Кутушева Г.Ф.<br>Гиперандрогения пубертатного возраста как фактор снижения фертильности.....                                                                                                                                                                         | 14 |
| Заринова Т.Н., Сереброва М.А., Антипова И.И.<br>К вопросу о целесообразности использования вибрации с частотой 100 Гц в лечении и реабилитации больных<br>хронической обструктивной болезнью легких.....                                                                                          | 22 |
| Котлярова А.А., Летягин А.Ю., Толстикова Т.Г., Попова Т.В., Рачковская Л.Н.<br>Влияние литийсодержащего сорбента на параметры условно-рефлекторной активности на модели хронической алкогольной<br>интоксикации .....                                                                             | 30 |
| Тепляков А.Т., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Шилов С.Н., Копьева К.В., Калужин В.В.<br>Ранние маркеры прогрессирования сердечной недостаточности и апоптоза: роль в прогнозировании риска развития неблагопри-<br>ятных сердечно-сосудистых событий у больных, перенесших инфаркт миокарда ..... | 37 |
| Попова Т.В., Толстикова Т.Г., Летягин А.Ю., Жукова Н.А., Бгатова Н.П.,<br>Рачковская Л.Н., Котлярова А.А., Бурмистров В.А.<br>Влияние новой мазевой композиции Ag/ТАГА и хитозан-геля на лечение экспериментальных ран различной этиологии .....                                                  | 47 |
| Чистякова В.А., Катаева Н.Г.<br>Особенности динамики моторных и тревожно-депрессивных расстройств в восстановительном периоде инсульта.....                                                                                                                                                       | 55 |

#### ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Бахлов М.М., Лагуткина Т.П.<br>Анализ научных исследований по продвижению фармацевтической продукции в зарубежных странах:<br>практические рекомендации для фармацевтических компаний .....              | 60 |
| Розенштейн М.Ю., Розенштейн А.З., Кондаков С.Э., Черевко Н.А.<br>Современные лабораторные методы диагностики пищевой непереносимости.....                                                                | 69 |
| Смоль Т.С., Завадовская В.Д., Деев И.А.<br>Возможности телемедицинских технологий в лучевой диагностике .....                                                                                            | 79 |
| Суковатых Б.С., Валуйская Н.М., Пашков В.М., Алименко О.В., Григорьян А.Ю.<br>Экспериментальное обоснование применения иммобилизированной формы хлоргексидина биглюконата<br>в лечении гнойных ран ..... | 89 |

#### ЗНАЧИМЫЕ СОБЫТИЯ И РОЛЬ ЛИЧНОСТИ В ИСТОРИИ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Мендрина Г.И., Мочалина А.А.<br>Алексей Иванович Макушин – выдающийся врач и общественный деятель (к 150-летию со дня рождения) ..... | 98 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### № 2

#### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Авдеева Е.Ю., Сапрыкина Э.В., Слизовский Г.В., Краснов Е.А., Степанов М.Ю., Пехенько В.Г.<br>Биохимическое исследование активности экстрактов <i>Saussurea controversa</i> DC. и <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.<br>при экспериментальном остеомиелите..... | 5  |
| Боков А.Е., Млявях С.Г., Алейник А.Я., Булкин А.А., Растеряева М.В.<br>Факторы риска нарушения стабильности транспедикулярной фиксации у пациентов с дегенеративной патологией поясничного<br>отдела позвоночника.....                                             | 13 |
| Демина А.В., Терновой В.А., Карташов М.Ю., Локтев В.Б.<br>Эпидемиологическое расследование вспышки серозных менингитов в Новосибирской области .....                                                                                                               | 20 |
| Заринова Т.Н., Антипова И.И., Смирнова И.Н.<br>Циркадный профиль артериального давления у больных бронхиальной астмой при коморбидной гипертонической болезни.....                                                                                                 | 28 |
| Калаева Г.Ю., Хохлова О.И., Деев И.А.<br>Способ скрининга дисплазии соединительной ткани у подростков .....                                                                                                                                                        | 35 |
| Кемоклидзе К.Г., Александров Ю.К., Тюмина Н.А., Пухов Д.Э.<br>Сканирующая электронная микроскопия надпочечника крысы после воздействия хирургическим лазером .....                                                                                                 | 45 |
| Куркин В.А., Куркина А.В., Зайцева Е.Н., Дубищев А.В., Афанасьева П.В.<br>Диуретическая активность препаратов на основе цветков календулы лекарственной.....                                                                                                       | 51 |
| Микилев Ф.Ф., Корнетова Е.Г., Лобачева О.А., Корнетов А.Н., Семке А.В.<br>Психометрическая оценка симптомов и клиническая динамика шизофрении в зависимости от конституционально-<br>морфологического типа больных.....                                            | 58 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Скворцов А.В., Медведев М.А., Студницкий В.Б., Ковалёв И.В., Позудин Ю.А., Гусакова С.В., Антонов О.И., Бирулина Ю.Г.<br>Роль $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $2\text{Cl}^-$ -котранспорта и калиевой проводимости в осуществлении эффектов монооксида углерода<br>в гладких мышцах висцеральных органов..... | 65 |
| Филиппова Е.О., Кривошеина О.И., Запускалов И.В.<br>Локальное применение аутологичных мононуклеаров крови в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы.....                                                                                                                                      | 70 |
| Шейкин В.В., Шелихова Е.А., Москвитина Е.Н., Осипов А.Н., Ермаков В.В., Чучалин В.С., Мелентьева А.Н.<br>Технологические основы создания имплантатов с фармацевтической композицией ципрофлоксацина<br>и их антимикробная активность в экспериментах <i>in vitro</i> .....                                   | 76 |

## ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| След О.Н., Мерзликин Н.В., След Н.Ю., Попов А.Е., Менделеева Л.Я., Космаченко С.П., Тумаков И.О.<br>Хирургическое лечение хронического кистозного панкреатита..... | 85  |
| Сысолятин П.Г., Сысолятин С.П., Байдик О.Д., Ильенок О.В.<br>История развития хирургии височно-нижнечелюстного сустава .....                                       | 98  |
| Тигунцев В.В., Иванова С.А., Серебров В.Ю., Бухарева М.Б.<br>Малые некодирующие РНК как перспективные биомаркеры: биогенез и терапевтические стратегии .....       | 112 |

## СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Щаденко С.В., Топольницкий Е.Б.<br>Применение метода 3D-визуализации и моделирования в торакальной онкологии..... | 127 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## № 3

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Байков А.Н., Толтекин В.Е., Медведев М.А., Семичев Е.В., Иванов С.Д.<br>Регуляторные механизмы адаптации сердца реципиента и донорского сердечно-легочного комплекса при гетеротопической<br>трансплантации .....            | 5  |
| Баньков В.И.<br>Визуализация параметров импеданса биотканей .....                                                                                                                                                            | 10 |
| Гостюхина А.А., Замощина Т.А., Светлик М.В., Жукова О.Б., Зайцев К.В., Абдулкина Н.Г.<br>Поведенческая активность крыс в «открытом поле» после световой или темновой деприваций и физического переутомления ....             | 16 |
| Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Дмитриева Л.А., Хмель А.А., Сафина Т.В., Хлусов И.А.<br>Характеристика маркеров нормального и патологического ремоделирования костной ткани в крови детей и подростков.....                 | 24 |
| Задниряный И.В., Третьякова О.С., Кубышкин А.В., Сатаева Т.П.<br>Кардиопротекторный эффект отечественных антигипоксантов при экспериментальной кобальтовой кардиомиопатии.....                                               | 33 |
| Климов В.М., Айзман Р.И.<br>Оценка физического здоровья выпускников школ, поступающих в вузы.....                                                                                                                            | 41 |
| Ковалёв И.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Носарев А.В., Медведев М.А., Орлов С.Н.<br>Влияние гипоксии на электрические и сократительные свойства гладких мышц мочеоточника морской свинки..... | 48 |
| Коршунов С.Д., Давлетьярова К.В., Капилевич Л.В.<br>Биомеханические принципы физической реабилитации детей с детским церебральным параличом .....                                                                            | 55 |
| Кудря О.Н.<br>Вегетативное обеспечение сердечной деятельности у спортсменов с разным антропометрическим профилем .....                                                                                                       | 63 |
| Логинов С.И., Солодилов Р.О.<br>Влияние гонартроза на кинематику коленного сустава .....                                                                                                                                     | 70 |
| Петрова И.В., Розенбаум Ю.А., Бирулина Ю.Г., Ковалёв И.В., Гусакова С.В.<br>Влияние сероводорода на $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов человека.....                                    | 79 |
| Разуванова А.В., Кошельская Е.В., Смердова О.С., Кафтова И.А., Медведева Е.В., Капилевич Л.В.<br>Закономерности формирования двигательного стереотипа управления телом в фазе полета у спортсменов.....                      | 87 |
| Янина А.С.<br>Особенности альфа-активности головного мозга на фоне медитативного психологического тренинга .....                                                                                                             | 95 |

## ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Козлов И.А.<br>Профилактика осложнений, обусловленных ишемией-реперфузией миокарда,<br>при экстракардиальных оперативных вмешательствах ..... | 102 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## ЗНАЧИМЫЕ СОБЫТИЯ И РОЛЬ ЛИЧНОСТИ В ИСТОРИИ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Бушов Ю.В., Медведев М.А., Фоминых С.Ф.<br>А.А. Кулябко – выдающийся русский физиолог (к 150-летию со дня рождения) ..... | 120 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## № 4

### ЛИЦО НОМЕРА

|                                                                                                |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Уразова О.И., Некрылов С.А.<br>Новицкий Вячеслав Викторович (к 70-летию со дня рождения) ..... | 5 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Брюханов В.М., Мирошниченко А.Г.<br>Возможности метилэтилпиридинола в комплексном лечении бактериальной инфекции, вызванной <i>Klebsiella pneumoniae</i> (экспериментальное исследование).....                                                                                                                                                                                                           | 11  |
| Гузева В.И., Гузева О.В., Гузева В.В., Духанина Д.О., Касумов В.Р.<br>Создание и устойчивое развитие специализированных центров как способ повышения качества медицинской помощи .....                                                                                                                                                                                                                   | 20  |
| Зверев Я.Ф., Кудинов А.В., Момот А.П., Федорев С.А., Замятина С.В., Кулеш Н.И., Лычева Н.А., Федоров Д.В.<br>Антиагрегантная и антикоагулянтная активность 7-О-гентиобиозида формонетина в условиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....                                                                                                                                                               | 30  |
| Звонарева О.И., Куликов Е.С., Деев И.А., Кобякова О.С., Федорова О.С., Кириллова Н.А., Старовойтова Е.А., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Есип В.В., Счастный Е.Д., Хурхурова Н.В., Никитина Л.Ю., Голосова Т.Г., Пименов И.Д., Нетаева М.А., Федосенко С.В.<br>Роль информированного согласия в принятии решения об участии в исследовании: данные многоцентрового исследования в России «Лицом к лицу» ..... | 40  |
| Калиниченко Ю.А., Сиротченко Т.А., Луганский Д.Е.<br>Оценка факторов риска снижения минеральной плотности костной ткани у подростков с зубочелюстными аномалиями .....                                                                                                                                                                                                                                   | 52  |
| Кочеров С.Н.<br>Сравнительная оценка эффективности восстановления перфораций барабанной перепонки в зависимости от их локализации .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 59  |
| Кунцевич А.К., Симонова Г.И., Мустафина С.В., Верёвкин Е.Г., Березовикова И.П., Влошинский П.Е., Рымар О.Д.<br>Гликемический индекс рационов фактического питания и риск развития метаболического синдрома у мужского городского населения Новосибирска (популяционное исследование).....                                                                                                                | 67  |
| Куприянова И.И., Петров И.А., Тихоновская О.А., Мустафина Л.Р., Фатеева А.С., Окозов А.О., Логвинов С.В.<br>Морфология яичников после сальпингэктомии (экспериментальное исследование).....                                                                                                                                                                                                              | 77  |
| Раткин А.В., Пфаргер Ю.А., Кайдаш О.А., Иванов В.В., Цыганов М.М., Чучалин В.С., Адекенов С.М., Новицкий В.В.<br>Влияние ахиллина на экспрессию генов метаболизма липидов в культуре клеток.....                                                                                                                                                                                                         | 84  |
| Савельев И.Н., Фролова И.Г., Афанасьев С.Г., Величко С.А., Тузиков С.А., Миллер С.В.<br>Роль УЗИ и КТ в лучевой диагностике кардиоэзофагеального рака .....                                                                                                                                                                                                                                              | 91  |
| Талалаева О.С., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М.<br>Влияние гистохрома на физическую выносливость крыс .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 97  |
| Филина Н.Ю., Болотова Н.В., Скучаева Л.В.<br>Субкомпенсация и декомпенсация углеводного обмена у детей с сахарным диабетом 1 типа .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 104 |

## ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Зенкина В.Г.<br>Факторы ангиогенеза при развитии физиологических и патологических процессов женской гонады .....                                                                                                                                                                                                                                             | 111 |
| Калюжин В.В., Тепляков А.Т., Соловцов М.А., Калюжина Е.В., Беспалова И.Д., Терентьева Н.Н.<br>Ремоделирование левого желудочка: один или несколько сценариев? .....                                                                                                                                                                                          | 120 |
| Намазова-Баранова Л.С., Деев И.А., Кобякова О.С., Куликова К.В., Куликов Е.С., Желев В.А., Деева Е.В., Колосеев И.А., Беляева И.А., Давыдова И.В., Мамедъяров А.М.<br>Особенности соматической патологии у детей с низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении в различные возрастные периоды жизни (обзор мировой литературы) ..... | 140 |

## СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Емельянова Ю.А., Бикбаева Г.Р., Третьякова Т.В., Павлов А.В., Мартыненко О.В.<br>Глютеновая энтеропатия: клинические наблюдения..... | 150 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## № 5

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Белоусова Т.В., Маринкин И.О., Плюшкин В.А., Леонова А.А.<br>Взаимосвязи в системе мать – ребенок – ребенок при состоянии тромботической готовности и гематогенных тромбофилиях.....                                                                                                                                 | 5  |
| Дружинина Т.В., Талалаев С.Я., Закиров Н.П., Щаденко С.В., Хабибуллин Ш.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.<br>Клеточные реакции на трехмерные матрицы из полимолочной кислоты и гидроксипатита, полученные методом 3D-печати .....                                                                                      | 16 |
| Кабанец Н.Н., Филинук О.В., Уразова О.И., Морозова К.С., Колоколова О.В.<br>Сравнительная оценка эффективности иммунологических тестов у детей из групп риска в Томской области .....                                                                                                                                | 30 |
| Колмогоров В.Г., Коновалов В.К., Леонов С.А., Лобанов М.Н.<br>Роль прицельных 3D-реконструкций при анализе качественных характеристик поверхности шаровидных образований легких .....                                                                                                                                | 39 |
| Комлева Ю.К., Горина Я.В., Черных А.И., Лопатина О.А., Шабалова А.А., Труфанова Л.В., Оловянников Р.Я., Ендржевецкая-Шурыгина В.Ю., Салмина А.Б.<br>Особенности пролиферации и миграции клеток головного мозга при когнитивном тренинге животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера .....                      | 56 |
| Кострокова Е.С., Алифиров В.М., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Ижболдина О.П., Петров В.А., Миронова Ю.С., Латыпова А.В., Никитина М.А., Титова М.А., Тяхт А.В., Дорофеева Ю.Б., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э.<br>Обонятельная дисфункция и изменение микробиоты как ранние немоторные проявления болезни Паркинсона ..... | 66 |
| Кулакова К.В., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н.<br>Совместное использование разработанных коллаген-содержащих комплексов и культуры клеток для создания новых тканевых эквивалентов .....                                                                                                                                 | 75 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Марусин А.В., Корнетов А.Н., Сваровская М.Г., Вагайцева К.В., Павленюк Е.С., Степанов В.А.<br>Ассоциация генов подверженности к алкоголизму, шизофрении и болезни Альцгеймера<br>с психодиагностическими признаками в популяции русских.....                                                                                                                       | 83  |
| Мустафина А.Р., Журавлева А.Д., Логвинов С.В., Карпова М.Р., Ласукова Т.В., Суханова Г.А., Ильинских Н.Н.<br>Морфология экзоорбитальных слезных желез беспородных белых крыс при высокоинтенсивном световом воздействии.....                                                                                                                                       | 97  |
| Орлов С.Н., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Рыдченко В.С., Бирулина Ю.Г., Байков А.Н., Васильев В.Н.,<br>Суханова Г.А., Федорова Т.С., Ласукова Т.В.<br>Роль калиевой проводимости мембраны в механизмах действия внеклеточного АТФ на сократительную активность<br>сосудистых гладкомышечных клеток .....                                                            | 105 |
| Петров В.А., Алифиров В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Алтухов И.А.,<br>Кострюкова Е.С., Титова М.А., Мионова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Перевозчикова Т.В., Файт Е.А., Сазонов А.Э.<br>Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях .....            | 116 |
| Титова О.Н., Кузубова Н.А., Волчков В.А., Козырев А.Г., Гичкин А.Ю., Скляр Д.Б.<br>Функциональное состояние диафрагмы у больных хронической обструктивной болезнью легких<br>на фоне проведения длительной кислородотерапии .....                                                                                                                                  | 126 |
| Тяхт А.В., Алифиров В.М., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Латыпова А.В., Мионова Ю.С., Петров В.А., Ижболдина О.П.,<br>Титова М.А., Никитина М.А., Кострюкова Е.С., Дорофеева Ю.Б., Салтыкова И.В., Сазонов А.Э.<br>Связана ли микрофлора кишечника с болезнью Паркинсона? .....                                                                                         | 134 |
| Федорова О.С., Ковицирина Ю.В., Ковицирина А.Е., Федотова М.М., Деев И.А., Петровский Ф.И.,<br>Филимонов А.В., Дмитриева А.И., Кудряков А.А., Салтыкова И.В., Михалев Е.В., Одерматт П., Огородова Л.М.<br>Анализ заболеваемости инвазией <i>Opisthorchis felineus</i> и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы<br>в Российской Федерации..... | 147 |
| Федосенко С.В., Карнаушкина М.А., Огородова Л.М., Петров В.А., Деев И.А., Куликов Е.С., Сазонов А.Э.<br>Влияние курсового назначения системных глюкокортикостероидов при обострении бронхиальной астмы<br>и хронической обструктивной болезни легких на состав респираторной микробиоты в стабильный период.....                                                   | 159 |

#### ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

|                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Филинчук О.В.,<br>Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И.<br>Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких..... | 166 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

#### СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

|                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Валикова Т.А., Алифиров В.М., Королева Е.С., Филимонова М.Н., Пугаченко Н.В.<br>Синдром Коуден – фактор риска развития ишемического инсульта .....                                                      | 178 |
| Слизовский Г.В., Кужеливский И.И., Ситко Л.А., Аникина Е.Ю.<br>Туннелизация шейки бедренной кости с регенеративным криовоздействием на очаг некроза при болезни<br>Легг – Кальве – Пертеса у детей..... | 184 |

#### ЗНАЧИМЫЕ СОБЫТИЯ И РОЛЬ ЛИЧНОСТИ В ИСТОРИИ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ

|                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Карпов Р.С.<br>Воспоминания об учителе (к 120-летию со дня рождения академика АМН СССР Д.Д. Яблокова) ..... | 188 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|



## А

Абдулкина Н.Г., 3  
Авдеева Е.Ю., 2  
Адекенов С.М., 4  
Айзман Р.И., 3  
Алейник А.Я., 2  
Алейник Д.Я., 5  
Александров Ю.К., 2  
Алименко О.В., 1  
Алифинова В.М., 5  
Алтухов И.А., 5  
Аникина Е.Ю., 5  
Антипова И.И., 1, 2  
Антонов О.И., 1  
Афанасьев С.Г., 4  
Афанасьева П.В., 2

## Б

Байдик О.Д., 2  
Байков А.Н., 3, 5  
Баньков В.И., 3  
Бахлал М.М., 1  
Бгатова Н.П., 1  
Белоусова Т.В., 5  
Беляева И.А., 4  
Березикова Е.Н., 1  
Березовикова И.П., 4  
Беспалова И.Д., 4  
Бикбавова Г.Р., 4  
Бирулина Ю.Г., 2, 3, 5  
Богатырева Е.М., 1  
Боков А.Е., 2  
Болотова Н.В., 4  
Брюханов В.М., 4  
Булкин А.А., 2  
Бурмистров В.А., 1  
Бухарева М.Б., 2  
Бушов Ю.В., 3

## В

Вагайцева К.В., 5  
Валикова Т.А., 5  
Валуйская Н.М., 1  
Васильев В.Н., 5  
Величко С.А., 4  
Верёвкин Е.Г., 4  
Влошинский П.Е., 4  
Волчков В.А., 5

## Г

Гичкин А.Ю., 5  
Голосова Т.Г., 4  
Горина Я.В., 5  
Гостюхина А.А., 3

Гракова Е.В., 1  
Григорьян А.Ю., 1  
Гузева В.В., 4  
Гузева В.И., 4  
Гузева О.В., 4  
Гусакова С.В., 2, 3, 5

## Д

Давлетьярова К.В., 3  
Давыдова И.В., 4  
Дворниченко М.В., 3  
Деев И.А., 1, 2, 4, 5  
Деева Е.В., 4  
Демина А.В., 2  
Дмитриева А.И., 5  
Дмитриева Л.А., 3  
Дорофеева Ю.Б., 5  
Дружинина Т.В., 5  
Дубищев А.В., 2  
Духанина Д.О., 4

## Е

Емельянова Ю.А., 4  
Ендржеевская-Шурыгина В.Ю., 5  
Ермаков В.В., 2  
Есимова И.Е., 5  
Есип В.В., 4

## Ж

Желев В.А., 4  
Жукова И.А., 4, 5  
Жукова Н.А., 1  
Жукова Н.Г., 4, 5  
Жукова О.Б., 3  
Журавлева А.Д., 5

## З

Завадовская В.Д., 1  
Заднипрыйный И.В., 3  
Зайцев К.В., 3  
Зайцева Е.Н., 2  
Закиров Н.П., 5  
Замощина Т.А., 3  
Замятина С.В., 4  
Запускалов И.В., 2  
Зарипова Т.Н., 1, 2  
Зверев Я.Ф., 4  
Звонарева О.И., 4  
Зенкина В.Г., 4

## И

Иванов В.В., 4  
Иванов С.Д., 3

Иванова С.А., 2  
Ижболдина О.П., 5  
Ильенок О.В., 2  
Ильинских Н.Н., 5

## К

Кабанец Н.Н., 5  
Кайдаш О.А., 4  
Калаева Г.Ю., 2  
Калининченко Ю.А., 4  
Калюжин В.В., 1, 4  
Калюжина Е.В., 4  
Каплевич Л.В., 3  
Карнаушкина М.А., 5  
Карпов Р.С., 5  
Карпова И.А., 3  
Карпова М.Р., 5  
Карташов М.Ю., 2  
Касумов В.Р., 4  
Катаева Н.Г., 1  
Кемоклидзе К.Г., 2  
Кириллова Н.А., 4  
Климов В.М., 3  
Кобякова О.С., 4  
Ковалёв И.В., 2, 3  
Ковширина А.Е., 5  
Ковширина Ю.В., 5  
Козлов И.А., 3  
Козырев А.Г., 5  
Колмогоров В.Г., 5  
Колобовникова Ю.В., 5  
Колоколова О.В., 5  
Колмеец И.А., 4  
Комлева Ю.К., 5  
Кондаков С.Э., 1  
Коновалов В.К., 5  
Кононова Т.Е., 5  
Копьева К.В., 1  
Корнетов А.Н., 2, 5  
Корнетова Е.Г., 2  
Королева Е.С., 5  
Коршунов С.Д., 3  
Космаченко С.П., 2  
Кострюкова Е.С., 5  
Котлярова А.А., 1  
Кочеров С.Н., 4  
Кошельская Е.В., 3  
Краснов Е.А., 2  
Кривошеина О.И., 2  
Кубышкин А.В., 3  
Кудинов А.В., 4  
Кудря О.Н., 3  
Кудяков Л.А., 5  
Кужеливский И.И., 5  
Кузубова Н.А., 5

Кулакова К.В., 5  
Кулеш Н.И., 4  
Куликов Е.С., 4, 5  
Куликова К.В., 4  
Кунцевич А.К., 4  
Куприянова И.И., 4  
Куркин В.А., 2  
Куркина А.В., 2  
Кутушева Г.Ф., 1

## Л

Лагуткина Т.П., 1  
Ласукова Т.В., 5  
Латыпова А.В., 5  
Леонов С.Л., 5  
Леонова А.А., 5  
Летягин А.Ю., 1  
Литвинова Л.С., 5  
Лобанов М.Н., 5  
Лобачева О.А., 2  
Логвинов С.В., 4, 5  
Логинов С.И., 3  
Локтев В.Б., 2  
Лопатина О.А., 5  
Луганский Д.Е., 4  
Лычева Н.А., 4

## М

Мамедьяров А.М., 4  
Маринкин И.О., 5  
Мартыненко О.В., 4  
Марусин А.В., 5  
Медведев М.А., 2, 3  
Медведева Е.В., 3  
Мелентьева А.Н., 2  
Менделеева Л.Я., 2  
Мендрин Г.И., 1  
Мерзликин Н.В., 2  
Микилев Ф.Ф., 2  
Миллер С.В., 4  
Миронова Ю.С., 5  
Мирошниченко А.Г., 4  
Михалев Е.В., 5  
Млявых С.Г., 2  
Момот А.П., 4  
Морозова К.С., 5  
Москвитина Е.Н., 2  
Мочалина Л.А., 1  
Мустафина Л.Р., 4, 5  
Мустафина С.В., 4

## Н

Намазова-Баранова Л.С., 4  
Некрылов С.А., 4  
Нетаева М.А., 4

Никитина Л.Ю., 4  
Никитина М.А., 5  
Новик Г.А., 1  
Новицкий В.В., 4, 5  
Носарев А.В., 3

**О**

Огородова Л.М., 5  
Одерматт П., 5  
Окроков А.О., 4  
Оловянная Р.Я., 5  
Орлов С.Н., 3, 5  
Осипов А.Н., 2

**П**

Павленюк Е.С., 5  
Павлов А.В., 4  
Пашков В.М., 1  
Перевозчикова Т.В., 5  
Петров В.А., 5  
Петров И.А., 4  
Петрова И.В., 3  
Петровский Ф.И., 5  
Пехенько В.Г., 2  
Пименов И.Д., 4  
Плюшкин В.А., 5  
Погудин Ю.А., 2  
Попов А.Е., 2  
Попова Т.В., 1  
Пугаченко Н.В., 5  
Пугов Д.Э., 2  
Пфаргер Ю.А., 4

**Р**

Разуванова А.В., 3  
Растеряева М.В., 2  
Раткин А.В., 4  
Рачковская Л.Н., 1

Розенбаум Ю.А., 3  
Розенштейн А.З., 1  
Розенштейн М.Ю., 1  
Рыдченко В.С., 5  
Рымар О.Д., 4

**С**

Савельев И.Н., 4  
Сазонов А.Э., 5  
Салмина А.В., 5  
Салтыкова И.В., 5  
Саприна Т.В., 3  
Сапрыкина Э.В., 2  
Сатаева Т.П., 3  
Сваровская М.Г., 5  
Светлик М.В., 3  
Семичев Е.В., 3  
Семке А.В., 2  
Серебров В.Ю., 2  
Сереброва М.А., 1  
Сизикова А.Е., 3  
Симонова Г.И., 4  
Сиротченко Т.А., 4  
Ситко Л.А., 5  
Скворцов А.В., 2  
Склярова Д.Б., 5  
Скучаева Л.В., 4  
След Н.Ю., 2  
След О.Н., 2  
Слизовский Г.В., 2, 5  
Смаглий Л.В., 3, 5  
Смаль Т.С., 1  
Смердова О.С., 3  
Смирнова И.Н., 2  
Соловцов М.А., 4  
Солодилов Р.О., 3  
Старовойтова Е.А., 4  
Степанов В.А., 5  
Степанов М.Ю., 2

Студницкий В.Б., 2  
Суковатых Б.С., 1  
Суханова Г.А., 5  
Счастный Е.Д., 4  
Сысолятин П.Г., 2  
Сысолятин С.П., 2

**Т**

Талалаев С.Я., 5  
Талалаева О.С., 4  
Тепляков А.Т., 1, 4  
Терентьева Н.Н., 4  
Терновой В.А., 2  
Тигунцев В.В., 2  
Титова М.А., 5  
Титова О.Н., 5  
Тихоновская О.А., 4  
Толпекин В.Е., 3  
Толстикова Т.Г., 1  
Топольницкий Е.Б., 2  
Третьякова О.С., 3  
Третьякова Т.В., 4  
Труфанова Л.В., 5  
Тузинов С.А., 4  
Тумаков И.О., 2  
Тюмина Н.А., 2  
Тягт А.В., 5

**У**

Уразова О.И., 4, 5

**Ф**

Файт Е.А., 5  
Фатеева А.С., 4  
Федорев С.А., 4  
Федоров Д.В., 4  
Федорова О.С., 4, 5  
Федорова Т.С., 5

Федосенко С.В., 4, 5  
Федотова М.М., 5  
Филимонов А.В., 5  
Филимонова М.Н., 5  
Филина Н.Ю., 4  
Филинчук О.В., 5  
Филиппова Е.О., 2  
Фоминих С.Ф., 3  
Фролова И.Г., 4

**Х**

Хабибуллин Ш.А., 5  
Хлусов И.А., 3, 5  
Хмель А.А., 3  
Хохлова О.И., 2  
Хурхурова Н.В., 4

**Ц**

Цыганов М.М., 4

**Ч**

Чарыкова И.Н., 5  
Черевко Н.А., 1  
Черных А.И., 5  
Чистякова В.А., 1  
Чурина Е.Г., 5  
Чучалин В.С., 2, 4

**Ш**

Шабалова А.А., 5  
Шейкин В.В., 2  
Шелихова Е.А., 2  
Шилов С.Н., 1  
Щаженко С.В., 2, 5

**Я**

Янина А.С., 3